



HAL
open science

**Survie d'Escherichia coli génétiquement modifiée et
mobilisation de plasmides recombinants par : des
souches isolées de l'environnement ou des populations
naturelles mixtes**

Nadine Frank

► **To cite this version:**

Nadine Frank. Survie d'Escherichia coli génétiquement modifiée et mobilisation de plasmides recombinants par : des souches isolées de l'environnement ou des populations naturelles mixtes. Microbiologie et Parasitologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1996. Français. NNT : 1996METZ041S . tel-01777150

HAL Id: tel-01777150

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777150v1>

Submitted on 24 Apr 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE METZ

CENTRE DES SCIENCES
DE L'ENVIRONNEMENT

THESE DE DOCTORAT
PRESENTEE LE 3 DECEMBRE 1996
PAR NADINE FRANK

SURVIE D'*Escherichia coli* GENETIQUEMENT MODIFIEE ET
MOBILISATION DE PLASMIDES RECOMBINANTS PAR :
DES SOUCHES ISOLEES DE L'ENVIRONNEMENT OU DES
POPULATIONS NATURELLES MIXTES

MEMBRES DU JURY : J.-F. FERARD, PRESIDENT
P. BAUDA
J.-C. BLOCK
J.-C. HUBERT

6108 053

UNIVERSITE DE METZ

CENTRE DES SCIENCES
DE L'ENVIRONNEMENT

THESE DE DOCTORAT
PRESENTEE LE 3 DECEMBRE 1996
PAR NADINE FRANK

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	1996 082 S
Cote	S/M3 96/41
Loc	Magasin

SURVIE D'*Escherichia coli* GENETIQUEMENT MODIFIEE ET
MOBILISATION DE PLASMIDES RECOMBINANTS PAR :
DES SOUCHES ISOLEES DE L'ENVIRONNEMENT OU DES
POPULATIONS NATURELLES MIXTES

MEMBRES DU JURY : J.-F. FERARD, PRESIDENT

P. BAUDA

J.-C. BLOCK

J.-C. HUBERT

Cette thèse a fait l'objet d'une convention (n° R91/50), notifiée le 29 octobre 1991 entre le MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA FORET et CHIMIE ET ECOLOGIE.

Madame Pascale BAUDA, Présidente de ce Jury a été l'instigatrice de ce travail et en a assuré la direction. Sa rigueur intellectuelle et ses conseils avisés m'ont permis de mener a bien ce travail. Je tiens à lui exprimer ici, un témoignage de mon amitié et de ma sincère gratitude.

Je suis particulièrement sensible à la présence dans mon Jury de Messieurs Jean-Claude BLOCK, Jean-Claude HUBERT et Jean-François FERARD et les remercie pour s'être déplacés afin de juger ce travail.

Je suis reconnaissante à Mesdames Marie-Andrée DOLLARD et Chantal BOUZZENDORFER pour leur collaboration technique et avisée.

Enfin, je tiens également à témoigner mon amitié et mes encouragements à Anne-Marie SIMAO-BEAUNOIR, Pierre GENEVAUX et Véronique CRUCIANI, ainsi qu'à tous les camarades de laboratoire qui ont su à des titres divers m'apporter leur aide.

1) INTRODUCTION :

L'utilisation croissante d'organismes génétiquement modifiés (OGMs) en biotechnologie pour la production d'outils thérapeutiques comme l'insuline humaine, les hormones de croissance, les interférons et les vaccins en utilisant des souches *Escherichia coli* (MARTIAL *et al.*, 1979 ; KEEN *et al.*, 1980 ; NAGATA *et al.*, 1980 ; MAC KAY *et al.*, 1981) illustre le potentiel d'applications de cette technologie. Les OGMs sont généralement utilisés en milieux confinés au laboratoire, mais on ne peut exclure la possibilité d'un rejet accidentel dans l'environnement. Le comportement des OGMs dans l'environnement doit donc pouvoir être apprécié, de façon à estimer l'impact de cette technologie sur le milieu naturel en cas de rejet. Les événements susceptibles de générer des modifications écologiques sont la survie des OGMs et les possibilités de dissémination et d'expression des gènes génétiquement modifiés par les souches autochtones.

Les OGMs peuvent être modifiés soit au niveau de l'ADN chromosomique pour des raisons de stabilité, soit au niveau plasmidique pour des raisons de facilité et de meilleure expression. Dans ce dernier cas, et pour limiter leur dissémination, les plasmides recombinés sont généralement dépourvus par construction des gènes mobilisateurs (*mob*) et des gènes de transfert (*tra*), par conséquent ils ne sont pas autotransférables, mais peuvent être mobilisés.

La mobilisation de plasmides à ADN recombiné (ADN_r : ADN modifié par insertion d'un fragment d'ADN exogène) par des souches de l'environnement a été étudiée et mise en évidence aussi bien avec des souches isolées de rivières (ROUX *et al.*, 1993), d'épilithon (HILL *et al.*, 1992 ; HILL *et al.*, 1994), des eaux usées (MAC PHERSON & GEALT, 1986 ; MANCINI *et al.*, 1987) que du sol (GLEW *et al.*, 1993 ; HENSCHKE & SCHMIDT, 1990). Toutefois, l'importance dans l'environnement de ce mode de dissémination d'ADN reste très discutée, essentiellement parce que les données expérimentales acquises proviennent d'expériences de transfert réalisées avec des souches isolées, en boîtes de Pétri ou en erlen dans des conditions de type "batch" alors que les micro-organismes dans les milieux naturels sont généralement soumis à des flux. Les transferts génétiques dans l'environnement sont le plus

souvent estimés au niveau de microcosmes qui correspondent à des systèmes artificiels gnotobiotiques multiespèces ou portions isolées de systèmes naturels. Les microcosmes aquatiques utilisés pour étudier la dissémination d'ADN_r ne sont pas systématiquement analysés au niveau de la phase biofilm qui s'y forme (LESER, 1995). Or, la formation des biofilms est rencontrées dans beaucoup d'environnements naturels : aussi bien dans les sols qu'en milieu aquatiques (SIEBEL & CHARACKLIS, 1991) et le contact entre bactéries au sein de biofilms doit permettre les échanges d'ADN par conjugaison.

Nous avons donc décidé d'étudier la survie d'OGMs, ainsi que le transfert de plasmides recombinants dans différents systèmes expérimentaux de laboratoire mettant en oeuvre une biomasse fixée ou partiellement agrégée. Notre choix concernant les OGMs s'est porté sur une souche *Escherichia coli* porteuse d'un plasmide recombinant pCE325 (*tra⁺ mob⁺ oriT⁺*) ou pCE328 (*tra⁻ mob⁻ oriT⁻*) dérivés respectivement des plasmides pBR325 (BOLIVAR, 1978) et pBR328 (SOBERON *et al.*, 1980) par insertion du gène de la thymidine kinase du virus de la vaccine ("tk-vacc"). Ces pBR font partie des premiers vecteurs utilisés en génie génétique et sont faciles à sélectionner de part leurs résistances aux antibiotiques. La présence de la séquence eucaryote "tk-vacc" permet une détection plus spécifique de ces plasmides recombinants nécessaire pour estimer le transfert vers des populations mixtes de l'environnement.

La première partie de nos travaux a consisté à valider et à standardiser un système expérimental permettant la production de biofilms bactérien dans un réacteur à lit fixe alimenté en continu pour étudier la survie d'OGMs et le transfert de plasmides recombinants.

Ensuite, afin de nous placer dans une situation plus réaliste de rejet accidentel d'OGMs, notre étude s'est portée sur la mobilisation du plasmide pCE328 par des souches isolées de boues activées susceptibles de contenir des éléments mobilisateurs, comparativement à celle du plasmide conjugatif R388. Les études de mobilisation et de survie ont été effectuées au sein de deux dispositifs expérimentaux

mettant en oeuvre des souches isolées de boue activée, provenant du traitement d'eaux usées. Dans ces dispositifs, la biomasse est soit fixée sur un support et cultivée en continu, soit en suspension et cultivée dans des conditions de culture semi-continues dans un réacteur à alimentation séquencée avec recyclage de biomasse (réacteur "batch-séquencé"). Les deux systèmes sont représentatifs de procédés de traitements biologiques d'eaux usées et, de plus, dans ces deux dispositifs, la biomasse fixée et/ou en suspension atteignent après un certain temps un état d'équilibre apparent évalué par le niveau constant des populations donatrices et/ou réceptrices, qui permet de minimiser l'influence du temps sur les résultats, à la différence des systèmes fermés ou limités de type "batch".

Toujours dans le souci de mieux estimer la mobilisation d'ADN_r par des populations naturelles, nous avons décidé d'utiliser la biomasse totale des boues activées. Le transfert a été étudié sur boîtes de Pétri, ce système étant plus facile à mettre en oeuvre et les conditions à priori plus favorables au transfert.

L'analyse bibliographique qui va suivre porte sur les différents modes de transferts horizontaux dans l'environnement, y compris dans les biofilms et les boues activées.

**2) ANALYSE
BIBLIOGRAPHIQUE :**

2.1-LES DIFFERENTS MODES DE TRANSFERTS HORIZONTAUX DE L'ADN BACTERIEN DANS L'ENVIRONNEMENT.

2.1.1-Introduction.

Le transfert horizontal d'ADN étranger définit comme le transfert d'une cellule bactérienne à une autre peut se faire par trois types de mécanismes que nous avons schématisés sur la figure 1 : la transformation naturelle, la transduction et la conjugaison. Ces transferts horizontaux de l'ADN sont à distinguer des transferts verticaux de l'ADN qui correspondent à la transmission de l'ADN d'une cellule mère à une cellule fille.

HANAHAN (1987) décrit la transformation comme le processus par lequel, un fragment d'ADN double brin isolé est adsorbé à la surface d'une cellule bactérienne dite compétente. L'ADN simple brin pénètre dans la cellule grâce à l'énergie fournie par la digestion de l'autre brin par une endonucléase, sauf pour les bactéries *Hemophilus* où l'ADN transfère dans la cellule comme de l'ADN double brin avec des régions simples brins qui peuvent se trouver aux extrémités de cette structure duplex. Si cet ADN possède des homologies avec l'ADN de la cellule compétente, il devra s'intégrer par recombinaison au sein du génome de la cellule réceptrice, pour être répliqué avec celui-ci. Les limitations de la transformation sont : la maintenance de l'ADN double brin isolé, cette survie est facilitée quand l'ADN est adsorbé sur du sable ou de l'argile, car il est ainsi protégé des dégradations enzymatiques et/ou par des agents physiques (LORENTZ & WACKERNAGEL, 1990 ; PAUL *et al.*, 1991), la nécessité d'une cellule compétente, d'une recombinaison pour l'intégration dans un réplicon, ainsi que la restriction modification.

La transduction est un mécanisme faisant intervenir un bactériophage qui s'adsorbe à la surface d'une bactérie réceptrice sur un récepteur spécifique et lui injecte son ADN phagique. La transduction spécialisée permet d'encapsider une

Figure 1: Représentation schématique des mécanismes de transfert horizontal d'ADN chez les bactéries.

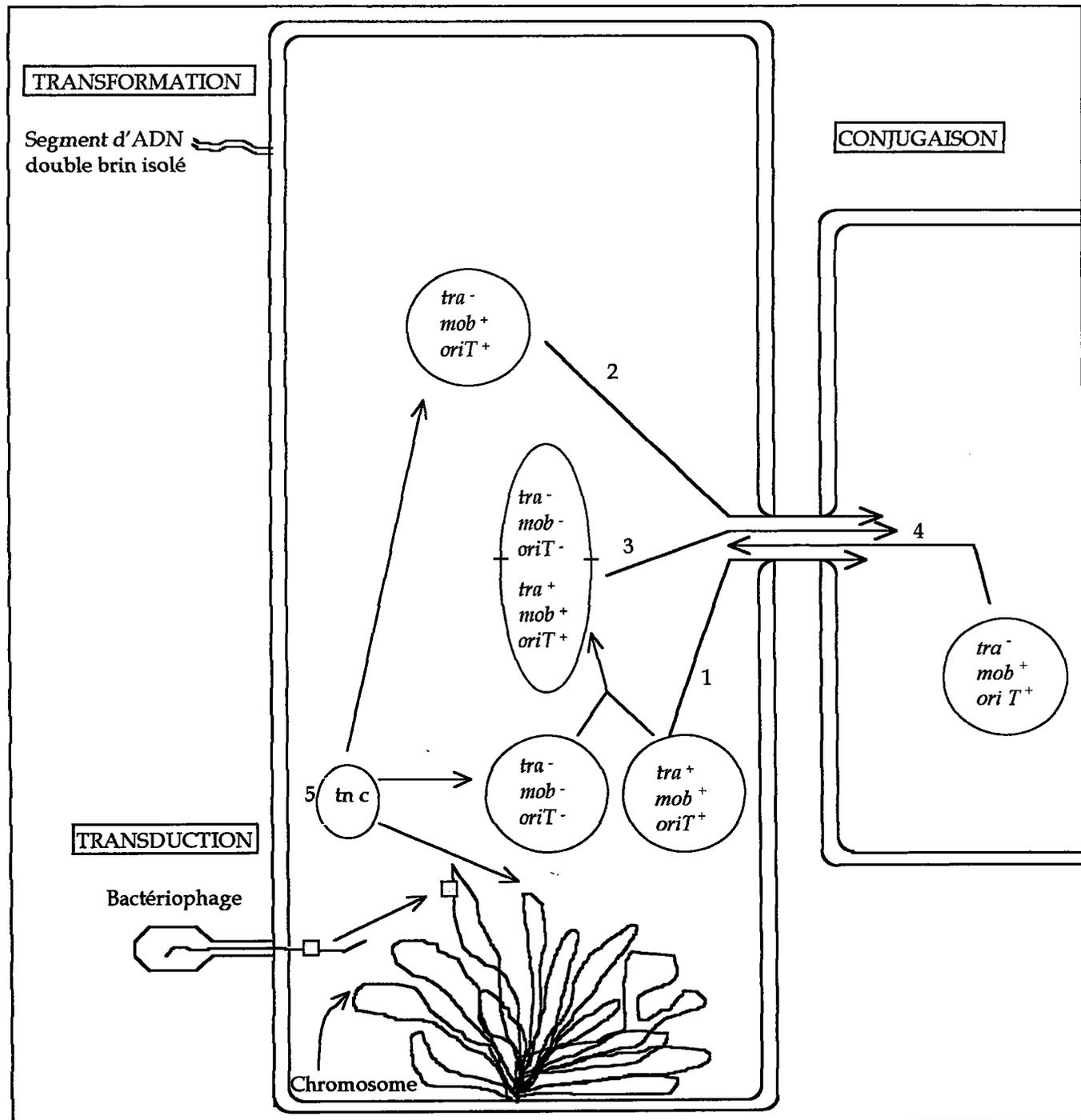
1 = transfert d'un plasmide conjugatif $tra^+ mob^+ oriT^+$

2 = mobilisation par donation d'un plasmide $tra^- mob^+ oriT^+$ par le plasmide conjugatif

3 = mobilisation par conduction d'un plasmide $tra^- mob^- oriT^-$ par formation d'un cointégrat avec le plasmide conjugatif

4 = rétromobilisation d'un plasmide mobilisable par un plasmide conjugatif avec passage en sens inverse des deux plasmides

5 = la transposition conjugative par l'intermédiaire d'un transposon conjugatif ($tn\ c$) qui est autotransférable $tra^+ mob^+ oriT^+$ et peut mobiliser les plasmides non conjugatifs).



partie du chromosome de la bactérie infectée après s'y être intégré puis excisé (phage λ). Lors de la transduction généralisée des coupures du chromosome bactérien de la taille du génome phagique sont effectuées et les fragments chromosomiques peuvent être encapsidés par le phage (phage P1 ou P22). Lorsque le phage va à nouveau infecter une bactérie, l'ADN chromosomique encapsidé pourra s'intégrer par recombinaison dans le chromosome bactérien. A l'exception du bactériophage P1, les bactériophages ont une spécificité d'hôte très stricte qui limite leur action en tant que vecteur dans le transfert horizontal d'ADN entre bactéries d'espèces différentes (TREVORS *et al.*, 1987). Ce transfert est également réduit par les systèmes de restriction modification et par la recombinaison pour l'intégration dans le génome de la réceptrice.

La transduction et la transformation se rencontrent essentiellement entre des souches d'espèce identique ou proche (pour des revues détaillées sur la transduction et la transformation voir STOTZKY & BABICH, 1986 ; HANAHAN, 1987 ; TREVORS *et al.*, 1987), alors que la conjugaison peut concerner un plus large spectre d'espèces bactériennes. De plus, il n'est pas nécessaire qu'il y ait recombinaison et intégration pour la persistance de l'ADN transféré. Cependant, la conjugaison est également limitée par différents mécanismes : les systèmes de restriction et de modification des souches parentales et/ou du plasmide et l'incompatibilité des plasmides entre eux qui est un critère pour leur classification. Les organismes génétiquement modifiés (OGMs) sont conçus de façon à limiter leur dissémination, c'est pourquoi, nous avons porté notre choix sur des plasmides recombinants dérivés des pBR à spectre d'hôte étroit, car ils ne transfèrent que vers un petit groupe de la famille des *Enterobacteriaceae* (BOLIVAR, 1978). De plus, ce sont les premiers vecteurs utilisés en génie génétique, ils sont donc représentatifs des plasmides recombinés.

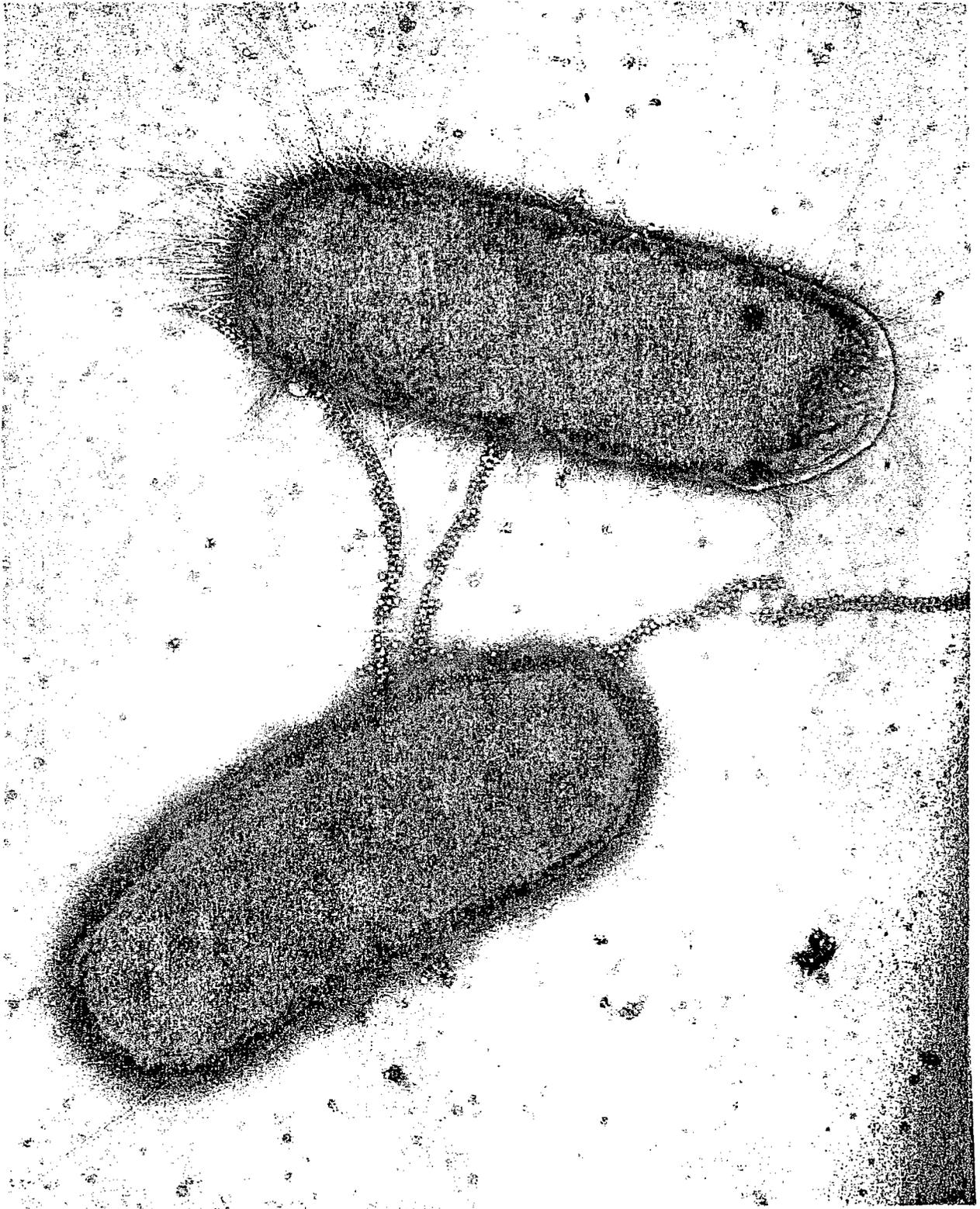
La conjugaison est aussi le mode de transfert le plus étudié, nous avons donc décidé de nous y intéresser en priorité dans le cadre de l'étude des transferts horizontaux de l'ADN recombinant dans l'environnement.

Le mécanisme de conjugaison bactérienne dépend d'un contact cellulaire établi par un pilus (voir figure 2). Un pont cytoplasmique est alors formé et permet le transfert de plasmide d'un organisme donneur (ou cellule mâle) à un organisme récepteur (ou cellule femelle) (NOVICK *et al.*, 1976). La cellule réceptrice qui a acquis l'ADN provenant de la cellule donatrice est appelée transconjugant. Ce transfert d'ADN débute au niveau de l'origine de transfert : site *oriT* et nécessite la présence des gènes *tra* et *mob* appelés respectivement gènes de transfert et gènes mobilisateurs. Suite à la découverte du facteur F (ou plasmide F) : prototype du facteur de fertilité responsable de la conjugaison bactérienne dans la souche *Escherichia coli* K12 par LEDERBERG & TATUM en 1946, de nombreuses études ont porté sur la conjugaison.

La conjugaison correspond à un mode de transfert génétique qui a principalement été étudié entre bactéries, mais ce processus existe entre des organismes procaryotes et des organismes eucaryotes comme *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae* (HEINEMANN & SPRAGUE, 1991) et *Escherichia coli* et *Saccharomyces kluyveri* (INOMATA *et al.*, 1994). Des transferts d'ADN entre bactéries et plantes ont également été observés, comme les plasmides Ti et Ri chez *Agrobacterium tumefaciens* (ZAMBRISKI *et al.*, 1989 ; CARLOS & CHICURELL, 1992 ; COOK & FARRAND, 1992).

Afin de limiter la dissémination des OGMs dans l'environnement, les plasmides recombinants utilisés sont dépourvus des gènes de transfert *tra* et dans certains cas ils sont également dépourvus des gènes mobilisateurs *mob*. Leur transfert n'est possible que par mobilisation lorsque les gènes *tra* et *mob* sont présents sur une autre molécule d'ADN.

Figure 2: Micrographie électronique d'une cellule réceptrice et d'une cellule donatrice reliées par des pili F. (La donatrice (en bas) a trois pili F, lesquels sont entourés par le phage MS2 qui s'adsorbe à la surface. On peut voir de nombreux fimbriae communs s'étendre à partir de la réceptrice (en haut) (MILLER, 1992)).



2.1.1.a-La mobilisation.

La mobilisation est une forme de conjugaison dans laquelle un plasmide non conjugatif (ou un fragment chromosomique) peuvent être transférés en présence d'un plasmide conjugatif (FROST, 1992).

Le rôle des plasmides conjugatifs serait de fournir les pili pour le rapprochement cellulaire et la formation du pore membranaire nécessaire au passage de l'ADN (CARLOS & CHICURELL, 1992). Différents types de mobilisation ont été décrits.

•1) La donation :

Dans ce type de mobilisation, le plasmide conjugatif et l'ADN mobilisé sont transférés séparément. C'est une mobilisation en *trans* (KILBANE & MALAMY, 1980). Le terme utilisé pour décrire ce processus est la donation (STEELE & MAC KAY, 1989). Les plasmides mobilisables par donation contiennent les gènes *mob*, ainsi que le site origine de transfert *oriT*. Ces gènes *mob* codent pour des protéines qui vont permettre la coupure du site "nic" au niveau d'*oriT*. Ces plasmides *mob* + comprennent Col E1, les plasmides Inc Q, pSC101 et d'autres encore (GUINEY & LANKA, 1989).

La mobilisation par donation en *trans* est également possible quand le plasmide non conjugatif ne possède que l'origine de transfert. En effet, des mutants *mob* - *oriT* + du plasmide Col E1 sont mobilisables, mais dans ce cas les gènes *mob* doivent être apportés en *trans*, c'est-à-dire sur un autre plasmide présent dans la même cellule (SMIT *et al.*, 1993).

•2) La conduction :

Ce deuxième processus de mobilisation nécessite la formation d'un cointégrat entre le plasmide conjugatif et le plasmide mobilisé. La fusion des deux plasmides permet une mobilisation en *cis*. Certains cointégrats formés sont stables et ont pu être étudiés, mais dans certains cas, ils se dissocient rapidement après le transfert par conjugaison. Le terme utilisé pour décrire ce type de mobilisation est la conduction (STEELE & MAC KAY, 1989). La conduction permet de mobiliser des plasmides qui ne possèdent pas d'origine de transfert.

Les transposons conjugatifs contiennent les gènes *tra*, les gènes *mob* et une origine de transfert (*oriT*), ils peuvent également mobiliser des plasmides non conjugatifs dépourvus des gènes *tra* en *cis* ou en *trans* (JOHNSON & WILLETS, 1980 ; SALYERS *et al.*, 1995).

Les OGMs ne contiennent pas d'éléments *tra*, pour que l'ADN soit mobilisé, il faut donc que les gènes nécessaires au transfert se trouvent dans la population réceptrice.

•3) La rétromobilisation :

Un plasmide conjugatif qui passe d'une cellule donatrice vers une cellule réceptrice peut faire passer en même temps et en sens inverse, un plasmide mobilisable *tra⁻ mob⁺*. Ce phénomène peut être décrit comme la capacité d'une donatrice à recevoir un plasmide par rétromobilisation (TOP *et al.*, 1992).

2.1.2-Importance de la conjugaison bactérienne dans l'environnement.

Des études publiées montrent que la conjugaison peut être un important mécanisme de transfert de gènes dans l'environnement (tableau 1). Cependant la conjugaison est un processus énergie - dépendant. Lors du transfert par conjugaison,

la séparation des deux brins d'ADN plasmidique de la cellule donatrice s'accompagne d'une hydrolyse d'ATP qui fournirait l'énergie nécessaire au passage de l'ADN simple brin vers la réceptrice (PANICKER & MINCKLEY, 1992). Ainsi, la constante cinétique de transfert varie suivant le stade de développement des cellules en phase exponentielle de croissance: 3×10^{-2} à 2×10^{-4} (litre x Transconjugants)/(Donatrices x Réceptrices x jour) entre le début et la fin de la phase exponentielle (MAC DONALD *et al.*, 1992). Dans l'environnement, les bactéries en phase exponentielle de croissance sont rares et les nutriments limités, la faible charge énergétique des bactéries dans les milieux naturels limiteraient la conjugaison.

La comparaison des études de transfert dans l'environnement est difficile, car, les conditions environnementales (pH, température, nutriments, concentration et nature des bactéries donatrices et réceptrices, rapport donatrices/réceptrices, la présence de surfaces colonisables, le contenu plasmidique des souches réceptrices autochtones) sont variables et non contrôlées, ce qui fait que les fréquences de transfert varient beaucoup comme on s'en rend compte dans le tableau 1 où quelques exemples de transfert par conjugaison dans divers types d'eaux et de sols ont été rapportés. De plus, il est probable que les fréquences de transfert observées soient surestimées par rapport à la fréquence de transfert réelle. En effet, généralement :

- les transferts de plasmides des donatrices aux réceptrices de ceux des transconjugants aux réceptrices ne sont pas distingués.

- les transconjugants dénombrés peuvent provenir à la fois du transfert et de leur croissance. Les transferts de plasmides des donatrices aux réceptrices ne sont généralement pas différenciés de la croissance des transconjugants. Si l'on émet l'hypothèse ou si l'on démontre que les souches réceptrices croissent de la même manière que les transconjugants, l'estimation des fréquences de transfert par le rapport transconjugants/réceptrices élimine le paramètre croissance. Toutefois, cette

Tableau 1: Exemples de transfert par conjugaison dans l'environnement. (TC = transconjugants, D = donatrices).

Donatrice + Réceptrice	Plasmides	Milieus et conditions de transfert	Fréquences de TC/D	Références
<i>Escherichia coli</i> + <i>Pseudomonas</i>	RP4 (<i>tra</i> ⁺) ou facteur R (<i>tra</i> ⁺)	sols non stériles 30°C	6.3 × 10 ⁻⁵ à 7.6 × 10 ⁻³	BERG & TREVORS, 1990
<i>Escherichia coli</i> + <i>Alcaligenes eutrophus</i>	pDN705 (<i>tra</i> - <i>mob</i> ⁺ <i>oriT</i> ⁺) en présence d'un plasmide "helper" : pULB113 (<i>tra</i> ⁺)	sols stériles 20°C - pH 5.2 sols stériles 20°C - pH 6.3 sols stériles 20°C - pH 7.0 sols non stériles 20°C - sans nutriments sols non stériles 20°C - avec nutriments	2.6 × 10 ⁻⁵ 1.6 × 10 ⁻⁴ 1.0 × 10 ⁻⁴ 4.8 × 10 ⁻⁷ 6.9 × 10 ⁻⁷ à 7.7 × 10 ⁻⁶	TOP <i>et al.</i> , 1990
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + bactéries du sol	R68.45 (<i>tra</i> ⁺)	sols non stériles - 28 °C	1.0 × 10 ⁻⁵ à 1.0 × 10 ⁻²	GLEW <i>et al.</i> , 1993
<i>Escherichia coli</i> + <i>Escherichia coli</i>	pBR325 (<i>tra</i> - <i>mob</i> - <i>oriT</i> ⁺) en présence d'un plasmide "helper" : R100-1 (<i>tra</i> ⁺)	eaux usées	4.8 × 10 ⁻⁴ à 7.5 × 10 ⁻¹	GEALT <i>et al.</i> , 1985
<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterobacter cloacae</i>	pHSV106 (<i>tra</i> - <i>mob</i> ⁺ <i>oriT</i> ⁺) en présence d'un plasmide "helper" : R100-1 (<i>tra</i> ⁺)	eau - 15°C eau - 25°C eau - 35°C	1.4 × 10 ⁻⁷ 3.5 × 10 ⁻⁷ 4.6 × 10 ⁻⁷	SANDT & HERSON, 1991
<i>Escherichia coli</i> + <i>Pseudomonas salmonicida</i>	plasmides R (<i>tra</i> ⁺)	eau de mer - 6°C eau de mer - 20°C	5.0 × 10 ⁻⁵ 2.0 × 10 ⁻⁵	KRUSE & SORUM, 1994
<i>Escherichia coli</i> + <i>Aeromonas</i>	pCE328 (<i>tra</i> - <i>mob</i> - <i>oriT</i> ⁻)	eau de mer stérile - 20°C	8.5 × 10 ⁻⁶	LEBARON <i>et al.</i> , 1994

vérification n'est pas toujours effectuée, surtout quand les fréquences sont estimées en transconjugants/donatrices.

- des transconjugants peuvent se former sur le milieu sélectif utilisé pour les dénombrer. En effet, les donatrices et les réceptrices sont déposées en même temps que les transconjugants à sélectionner et elles sont en nombre, très supérieures aux transconjugants. Le transfert par conjugaison peut se produire pendant l'incubation des milieux sélectifs. Les transconjugants produits durant l'incubation sont indiscernables des transconjugants initiaux à dénombrer. Ils entraînent donc une surestimation des transconjugants produits dans l'environnement.

Nous avons analysé quelques exemples de transfert par conjugaison dans les différents compartiments de l'environnement : sols et milieux aquatiques décrits dans la littérature.

2.1.2.a- Transfert génétique par conjugaison dans le sol.

SMIT & VAN ELSAS (1990) ont étudié le transfert par conjugaison du plasmide RP4 (conjugatif, de groupe d'incompatibilité Inc P1, à large spectre d'hôte : pouvant transférer vers les α , β , δ protéobactéries) entre *Pseudomonas fluorescens* R2f isolé de racines d'herbe de prairies, utilisé comme souche donatrice, et deux mutants de cette souche obtenus par des incubations répétées avec des concentrations croissantes en antibiotiques et utilisés comme réceptrices. Les deux souches réceptrices portent les résistances à la rifampicine et à la streptomycine (Rif^R - Sm^R) ou à la rifampicine et à l'acide nalidixique (Rif^R - Nal^R). La conjugaison est étudiée dans un échantillon de 40 g de terreau supplémenté par 10% d'argile ou par 10% de milieu nutritif (VAN ELSAS *et al.*, 1990). Dans un premier temps, les bactéries donatrices sont introduites et ensuite les réceptrices, le tout est mis à incuber à 20°C pendant 2 à 8 jours. Les donatrices étant introduites dans le sol avant les réceptrices,

cette étude n'est pas représentative de ce qui peut se passer dans le cas d'un rejet de bactéries dans l'environnement.

La sélection des transconjugants a été réalisée sur boîtes de milieux sélectifs, les transconjugants ainsi isolés sont vérifiés par hybridation sur colonie en utilisant comme sonde le plasmide RP4. Des transconjugants sont détectés, mais une partie pourrait être attribuée au transfert sur le milieu sélectif des transconjugants. Les auteurs ont décidé d'utiliser les souches réceptrices Nal^R, ce qui leur permet d'utiliser de l'acide nalidixique pour la sélection des transconjugants sur milieu gélosé. L'acide nalidixique interfère avec la réplication de l'ADN en inhibant l'activité de la gyrase de la souche donatrice qui y est sensible, les donatrices déposées en même temps que les réceptrices et les transconjugants sur le milieu sélectif des transconjugants ne pourront donc plus ou moins transférer leur plasmide. Ce procédé favorise donc la distinction entre les transferts sur milieu sélectif et la conjugaison dans le sol. Par exemple, lorsque 10^8 donatrices et 10^8 réceptrices sont inoculées en même temps dans le sol, après deux jours, 2.1×10^4 UFC transconjugants g^{-1} de sol en l'absence d'acide nalidixique et 1.0×10^4 UFC transconjugants g^{-1} de sol en présence d'acide nalidixique sont dénombrés. Les transconjugants dus au transfert sur boîtes seraient de l'ordre de 1.1×10^4 , soit 50% du nombre d'UFC. Les transconjugants qui sont produits sur le milieu sélectif sont donc du même ordre de grandeur que ceux produits au sein des sols et doivent donc être pris en compte. Ils peuvent être plus importants selon les conditions expérimentales utilisées, car la température et les nutriments sont très favorables pendant l'incubation, voire optimales par rapport au microcosme étudié.

Les mêmes auteurs ont également étudié le transfert du plasmide RP4 sur milieu sélectif en utilisant en parallèle avec les sols où l'on introduit les donatrices et les réceptrices, des sols où l'on introduit de façon séparée les donatrices et les réceptrices et après le même temps d'incubation (2 à 8 jours), les deux populations sont déposées ensemble sur le milieu sélectif des transconjugants afin d'estimer parallèlement à l'expérimentation les transferts qui peuvent se produire sur le milieu sélectif. Pour des solsensemencés avec des concentrations estimées à 5×10^7 UFC de

donatrices ou de réceptrices g^{-1} de sol, les transconjugants formés sont de 3.5×10^2 UFC g^{-1} de sol.

L'utilisation de souches réceptrices résistantes à l'acide nalidixique est un outil intéressant pour avoir une évaluation des transconjugants produits sur milieu sélectif et dans le cas d'une utilisation de réceptrices sensibles à l'acide nalidixique, l'utilisation en parallèle de microcosmes contenant les réceptrices et les donatrices séparément permet également de déterminer les transconjugants qui peuvent se former sur le milieu sélectif. L'efficacité des deux techniques dépend des conditions expérimentales. Aussi, nous avons décidé d'utiliser des souches réceptrices résistantes à l'acide nalidixique et/ou de réaliser un témoin avec des donatrices et des réceptrices pures rassemblées lors du dénombrement des transconjugants qui peuvent se former sur milieu sélectif.

TOP *et al.*(1990) ont étudié le transfert des gènes de résistance aux métaux dans trois types de sol : un sol sableux de pH 5.2 (type 1), un sol sableux argileux de pH 7.0 (type 2) et un sol argileux de pH 6.3 (type 3). Les souches parentales utilisées sont les suivantes : *Alcaligenes eutrophus* (souche réceptrice) contenant un plasmide auxiliaire conjugatif pULB113 (*tra* +, Inc P1, à large spectre d'hôte), *Escherichia coli* K12 (souche donatrice) contenant le plasmide mobilisable pDN705 (*tra* - *mob* + *oriT* +, Inc P1, à large spectre d'hôte) qui possède les gènes *czc* codant pour la résistance au cadmium, zinc et cobalt, ces gènes ne s'expriment pas dans la souche donatrice *E. coli* mais seulement dans la souche réceptrice *Alcaligenes eutrophus*, c'est un plasmide non conjugatif, mobilisable. Le plasmide pULB113 correspond au plasmide pRK290 dans lequel les gènes *czc* du plasmide pMOL30 ont été clonés. Les expériences sont réalisées en sols stériles ou non, à 20°C ou 28°C, avec ou sans nutriments. Les souches parentales sont introduites simultanément à des concentrations approximatives de 10^7 et 10^6 UFC g^{-1} de sol respectivement pour les réceptrices et les donatrices, ce qui n'est pas représentatif de ce qui peut se passer dans le cas d'un rejet accidentel d'OGMs.

Les transconjugants sont sélectionnés sur milieu gélosés contenant les différents métaux et sont ensuite vérifiés par extraction plasmidique et comparaison

du profil plasmidique obtenu après électrophorèse avec celui du plasmide pDN705 extrait de la souche donatrice.

Après 14 jours, en sols stériles, la réceptrice *A. Eutrophus* (originaire du sol) survit dans les trois types de sol, en absence et en présence de nutriments, à plus de 10^8 UFC g^{-1} de sol. La donatrice *E. coli* K12 en l'absence de nutriments, présente seulement la meilleure survie dans le sol de type 2 : sol de type 1 : 10^4 UFC g^{-1} de sol, sol de type 2 : 10^7 UFC g^{-1} de sol, sol de type 3 : 10^3 UFC g^{-1} de sol. Ainsi, le nombre de transconjugants par donatrice est plus important dans le sol de type 2 (1.0×10^4 transconjugants par donatrice), et, de plus, c'est le seul sol dans lequel des transferts sont détectés en l'absence d'apport de nutriments. Toujours dans le sol de type 2, non stérile, après un jour, on observe des rapports transconjugants par donatrice de 7.7×10^{-6} transconjugants par donatrice en présence de nutriments, à $20^\circ C$. Ces rapports sont supérieurs à ceux obtenus à $28^\circ C$: 1.8×10^{-7} transconjugants par donatrice. Dans les sols de type 1 et 2 non stériles, la population d'*E. coli* diminue rapidement. Le faible taux de survie de la donatrice par rapport aux sols stériles est probablement dû à la compétition avec les micro-organismes autochtones et à la prédation par les nématodes et les protozoaires. Tous ces résultats révèlent que certains sols (type 2 : pH=7), certaines conditions environnementales (la température de $20^\circ C$) et particulièrement le niveau de nutriments contribuent au transfert de gènes par conjugaison.

Enfin BERG & TREVORS (1990) ont étudié le transfert entre *Escherichia coli* K12 C600 (souche réceptrice qui porte une résistance à l'acide nalidixique) et *Escherichia coli* MA527 (souche donatrice qui porte une résistance à la tétracycline et qui contient un plasmide naturel conjugatif, portant les résistances à la streptomycine et à la tétracycline : facteur R).

Les travaux ont été réalisés à $30^\circ C$ en sols stériles ou non. Les donatrices et les réceptrices sont introduites simultanément à des concentrations comprises entre 10^5 et 10^6 UFC g^{-1} de sol. Les transconjugants *E. coli* ont été sélectionnés sur milieu contenant de l'acide nalidixique permettant ainsi d'inhiber le transfert sur boîte. Tous les transconjugants ont été isolés sur milieux contenant les antibiotiques

sélectifs de la réceptrice et du plasmide transféré, et leur contenu a ensuite été vérifié par extraction plasmidique, migration électrophorétique et comparaison des profils plasmidiques obtenus sur gel d'agarose avec celui de la souche donatrice.

Les nombres de transconjugants *E. coli* obtenus par donatrice sont similaires en sols stériles et non stériles, mais ils sont plus lents à apparaître en sols non stériles. En effet, en sols stériles les transconjugants apparaissent déjà après 6 heures et sont de 1.7×10^{-3} transconjugants par donatrice, et après 24 heures, ils sont de 4.7×10^{-3} transconjugants par donatrice, alors qu'en sols non stériles les transconjugants n'apparaissent qu'après 24 heures : et sont de 1.7×10^{-3} transconjugants par donatrice. Cette différence de transfert est en fait due à une implantation beaucoup plus difficile pour les souches donatrices et réceptrices *E. coli* en sols non stériles qu'en sols stériles. Ainsi à titre d'exemple, en sols non stériles, le nombre de donatrices est de 7.6×10^5 UFC g^{-1} de sol et le nombre de réceptrices est de 5.9×10^5 UFC g^{-1} de sol après 24 heures alors qu'en sols stériles, le nombre de donatrices est de 3.5×10^8 UFC g^{-1} de sol et le nombre de réceptrices est de 4.1×10^7 UFC g^{-1} de sol après 24 heures. Les donatrices *Escherichia coli* en sols non stériles se maintiennent donc, alors qu'en sols stériles, les donatrices croissent d'un facteur 10^3 en 24 heures. Ce qui est certainement dû à la compétition avec les micro-organismes autochtones.

BERG & TREVORS (1990) ont également étudié le transfert en sols non stériles et stériles entre un *Pseudomonas* (RP4) qui produit un pigment fluorescent jaune et un *Pseudomonas* mutant, résistant à la rifampicine et à la streptomycine. Les donatrices et les réceptrices sont introduites simultanément à des concentrations variant entre 10^5 et 10^6 UFC g^{-1} de sol.

Pour le transfert entre ces deux souches de *Pseudomonas*, les fréquences de transfert observées sont du même ordre de grandeur en sols non stériles et en sol stériles : 2.6×10^{-3} transconjugants par donatrices après 24 heures et 7.6×10^{-3} transconjugants par donatrices après 24 heures respectivement en sols stériles et non stériles. De même pour les donatrices qui se maintiennent à une concentration de 10^6 UFC g^{-1} de sols stériles ou non.

Les sols agricoles qui peuvent être fertilisés avec les déchets des animaux et les eaux usées qui sont susceptibles de contenir une forte densité de cellules bactériennes seraient des milieux propices aux transferts par conjugaison (TREVORS *et al.*, 1990).

Les études de transfert dans le sol montrent l'influence des paramètres environnementaux comme le pH, la température et la présence de nutriments sur les fréquences de transfert, ainsi que la compétition avec les micro-organismes autochtones. Nous avons décidé de contrôler les paramètres comme la température, le pH et les nutriments dans nos expériences. Ces études sont réalisées avec introduction simultanée des donatrices et des réceptrices, ce qui n'est pas représentatif d'un rejet d'OGMs dans l'environnement. Dans nos systèmes expérimentaux, l'introduction des donatrices est effectuée après atteinte d'un équilibre apparent des bactéries réceptrices au sein du microcosme étudié. Enfin, le transfert dans les sols n'a été étudié qu'avec des plasmides conjugatifs ou avec des plasmides mobilisables associés un plasmide mobilisateur. Aussi, nous avons choisi d'étudier le transfert de plasmides recombinants *mob* par des souches mobilisatrices de l'environnement.

2.1.2.b-Transfert génétique par conjugaison en milieu aquatique.

Les transferts par conjugaison en milieu liquide sont favorisés par la présence de pili flexibles (pili fins et flexibles et les gros pili flexibles) pour permettre le contact entre la souche donatrice et la souche réceptrice en mouvement, sans casser les pili. En effet, trois types de pili conjugatifs ont été mis en évidence (BRADLEY, 1980) :

- Les pili fins et flexibles qui sont synthétisés par les plasmides des groupes d'incompatibilité Inc I, Inc B, Inc K et Inc Z sont toujours associés à l'expression de pili rigides codés par ces mêmes plasmides (BRADLEY, 1983) alors que pour les plasmides d'incompatibilité Inc X et Inc P-13 les pili fins et flexibles sont

associés à l'expression de gros pili flexibles codés par ces mêmes plasmides (BRADLEY, 1980).

Les pili fins et flexibles ont un diamètre d'environ 6 nm et permettent la formation de couples donatrice - réceptrice aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide, ils auraient un rôle dans la stabilisation de ces couples (BRADLEY, 1984).

- Les gros pili flexibles sont synthétisés par beaucoup de groupes plasmidiques d'incompatibilité comme Inc F, Inc HI 1 et 2, Inc II, Inc P-13, etc... (BRADLEY, 1981).

Les gros pili flexibles ont un diamètre de 8 nm. Tout comme pour les pili fins et flexibles, la conjugaison avec ces pili est possible en milieu liquide et en milieu solide (BRADLEY, 1981).

- Les pili rigides sont synthétisés par les plasmides des groupes d'incompatibilité Inc I, Inc W et d'autres encore, ils ont un diamètre de 10 à 11 nm et sont spécifiques des transferts en milieu solide (BRADLEY *et al.*, 1980).

TREVORS *et al.* (1990) ont étudié le transfert du plasmide RP4 par conjugaison entre les cellules donatrices et réceptrices de *Pseudomonas fluorescens* dans des échantillons non stériles d'eaux prélevés à la surface d'un sol riche en terreau (eaux de surface agricole) à 22°C durant une période de 10 jours. Les donatrices et les réceptrices sont introduites simultanément à des concentrations variant entre 10^6 et 10^7 UFC cm^{-3} . Les transconjugants ont été sélectionnés sur milieu gélosé contenant les antibiotiques sélectifs de la souche réceptrice et du plasmide transféré, les transconjugants ainsi isolés ont ensuite été vérifiés par extraction plasmidique, migration électrophorétique et comparaison sur gel d'agarose du profil obtenu avec celui du plasmide RP4.

Dés transconjugants ont été détectés, si l'eau est prélevée après 3 à 10 jours d'incubation et que des nutriments sont apportés sous forme d'un extrait de tryptone et d'extrait de levure en présence de 0.1% (v/v) d'argile. Le transfert du plasmide

RP4 n'a pas été observé pour des échantillons d'eaux filtrés et non complétés en nutriments ce qui confirme que les nutriments favorisent la conjugaison.

SANDT & HERSON (1991) ont étudié des croisements triparentaux en présence d'une souche donatrice *Escherichia coli* HB101 contenant le plasmide non conjugatif pHSV106 mobilisable (*tra* - *mob* + *oriT* +) et génétiquement modifié par insertion d'un gène eucaryote (thymidine kinase de *Herpes simplex*), d'une souche réceptrice *Enterobacter cloacae* ne contenant pas de plasmides et d'une souche "helper" *Escherichia coli* ED2149 contenant un plasmide conjugatif R100-1 permettant de mobiliser le plasmide non conjugatif en deux étapes. Dans un premier temps, le plasmide conjugatif est transféré dans la souche réceptrice et dans un deuxième temps, le plasmide mobilisable et le plasmide conjugatif contenus dans la donatrice sont transférés dans la réceptrice. Cette étude a été effectuée sur des filtres stériles ou non en eau potable, et à différentes températures. Les trois souches sont introduites simultanément à des concentrations de 10^8 à 10^9 UFC cm⁻³.

Des sondes oligonucléotidiques pour détecter l'ADN recombinant ont été utilisées afin de vérifier la nature des transconjugants isolés sur milieu contenant les antibiotiques sélectifs de la réceptrice et du plasmide pHSV106. Elles correspondent aux gènes : eucaryote *tk* (thymidine kinase) et *amp* (résistance à l'ampicilline) du plasmide pHSV106.

La mobilisation du plasmide pHSV106 a été détectée en eau potable stérile à 15, 25 et 35°C et le nombre de transconjugants augmente avec la température. En effet, on passe de 1.4×10^{-7} transconjugants par donatrice à 15°C à 4.6×10^{-7} transconjugants par donatrice à 35°C.

Durant une semaine d'incubation en eau potable, les nombres de cellules parentales et de transconjugants restent constants en l'absence d'organismes indigènes et diminuent en 9 jours en leur présence d'un facteur 10^2 , 10^4 , 10^5 et 10^7 respectivement pour les souches transconjugantes, donatrices, réceptrices et "helpers".

Tout comme pour les études de transfert réalisées dans le sol, les expériences effectuées en milieu aquatique montrent que la température, les nutriments, ainsi que les souches autochtones ont une influence sur la conjugaison et la mobilisation. La mobilisation d'un plasmide recombinant (*tra - mob⁺ oriT⁺*) est observable, même en conditions non stériles. Cependant, les concentrations en donatrices et réceptrices introduites sont importantes et les donatrices et les réceptrices sont introduites simultanément, ce qui n'est pas représentatif d'un rejet accidentel d'OGMs. L'utilisation du gène eucaryote *tk* comme marqueur est un outil intéressant pour la détection des OGMs. Nous avons adopté ce marqueur pour nos études de dissémination des OGMs.

2.2-TRANSFERT AU SEIN DE BIOFILMS BACTERIENS.

Un biofilm correspond à une accumulation de cellules bactériennes et de composés inorganiques et organiques maintenus ensemble dans une matrice polymérique et attachés à un matériau support. La formation de biofilms est rencontrée dans beaucoup d'environnements naturels : aussi bien dans les sols qu'en milieux aquatiques (SIEBEL & CHARACKLIS, 1991). En milieu aquatique, une importante proportion de bactéries sont fixées sur des supports organiques ou inorganiques constitués de végétaux, d'animaux, d'autres micro-organismes ou de pierres... (ELWOOD *et al.*, 1982). Les biofilms bactériens produits en milieu aquatique sont susceptibles de constituer des niches permettant les transferts génétiques. Nous avons choisi de les prendre comme modèle d'étude, en les produisant au laboratoire dans des conditions standardisées.

Les biofilms sont utilisés dans beaucoup d'applications comme : la production de vinaigre avec des biofilms formés par des espèces d'*Acetobacter*, l'extraction du cuivre par lixiviation aux Etats-Unis concerne 10 à 20% des mines de cuivre, l'utilisation de bactéries immobilisées ou fixées comme biosenseurs pour détecter des

polluants par exemple et les systèmes de traitements d'eaux usées à lit fixe ou à lit fluidisé (BRYERS, 1994).

Toutefois, dans de nombreux domaines, le développement spontané de biofilms peut apporter certains inconvénients. En effet, la contamination biologique des eaux potables liée à l'érosion de biofilms dans le réseau de distribution est un sujet majeur d'inquiétude pour les consommateurs aussi bien que pour les distributeurs d'eaux potables (BLOCK, 1992).

2.2.1-Croissance et évolution des biofilms.

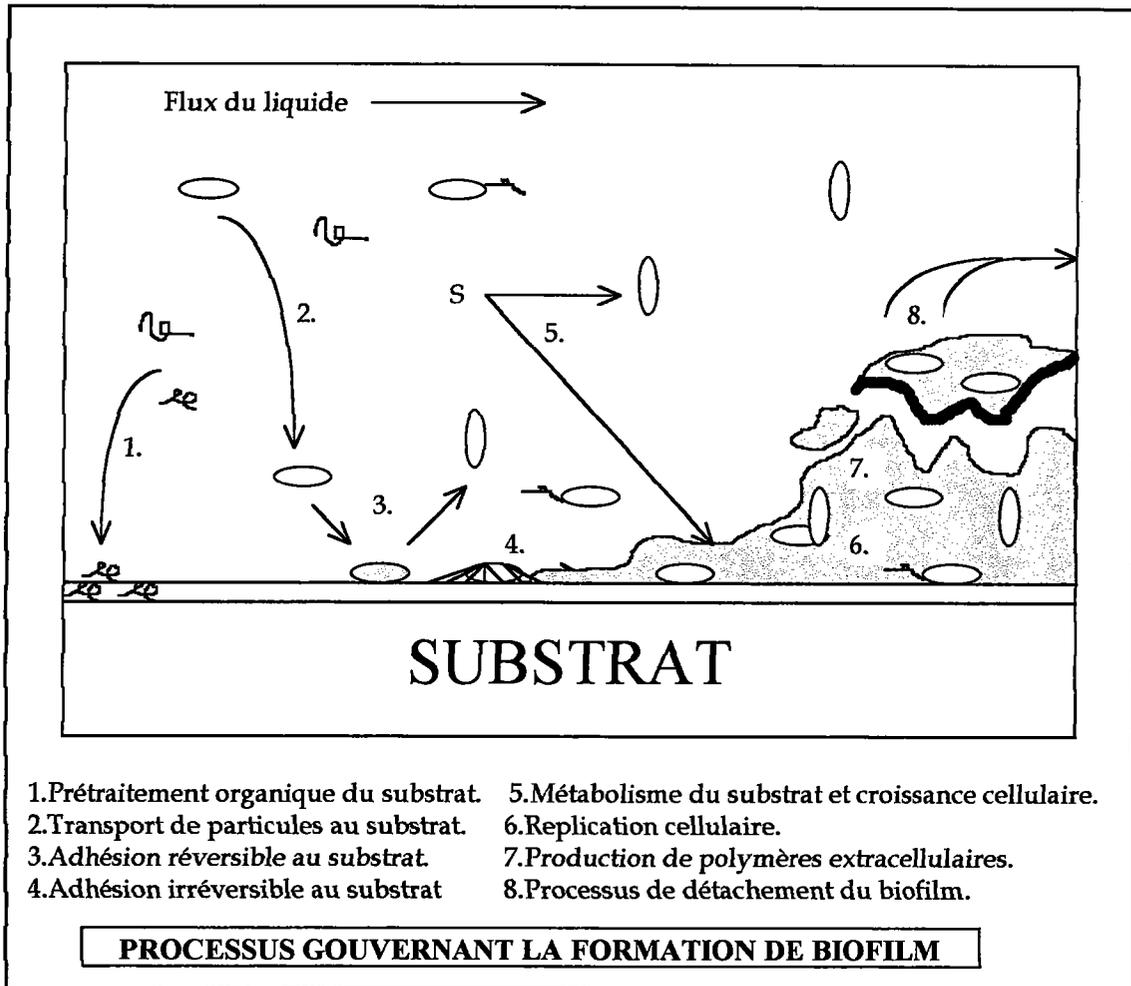
Les processus gouvernant la croissance de biofilms sont aussi bien physiques, chimiques que biologiques, ils incluent : le transport de cellules vers le substrat, l'adhésion, la croissance cellulaire, la production de polymères extracellulaires, les processus de détachement et d'érosion du biofilm (voir figure 3) (BRYERS, 1994).

Les conditions de croissance peuvent affecter l'adhésion. Par exemple, en culture "batch" l'adhésion peut varier suivant la phase de croissance. Cependant, il n'y a pas de règles générales quand à savoir si les cellules adhèrent plus en phase exponentielle ou en phase stationnaire (ROSENBERG & ROSENBERG, 1985).

L'érosion de biofilms est un processus continu à la surface externe du biofilm, alors que le détachement est un événement aléatoire, sporadique où de larges quantités ou sections entières de biofilms quittent la surface du support et sont entraînées dans la phase liquide. Ce détachement peut s'expliquer par un taux limite en oxygène dans le biofilm, par la formation de bulles d'azote, par une libération soudaine du calcium accumulé dans la matrice du biofilm (le calcium jouant un rôle chélateur pour les polysaccharides extracellulaires) ou encore par un changement rapide du pH (APPLEGATE & BRYERS, 1991).

A partir d'un certain stade, un état d'équilibre apparent du biofilm peut être atteint, dans lequel on observe une balance entre la croissance, l'érosion et la lyse (STAL *et al.*, 1989). La croissance des bactéries en biofilms à l'équilibre peut être caractérisée par un taux de croissance égal à la constante d'arrachage (BAUDA *et al.*,

Figure 3: Schéma du processus contribuant à la formation de biofilms bactériens (BRYERS, 1994).



1993), permettant ainsi, de s'affranchir du paramètre temps pour les analyses de transfert en biomasse fixée.

La croissance d'un biofilm épais peut être limitée par la diffusion des nutriments (STAL *et al.*, 1989). La croissance des bactéries n'est donc pas toujours la même suivant l'épaisseur du biofilm, le transfert de plasmides en profondeur des biofilms pourrait donc être limité par l'énergie disponible.

2.2.2-Interactions entre les populations bactériennes au sein de biofilms.

SIEBEL & CHARACKLIS (1991) ont réalisé des expériences en biofilms monopopulation de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* puis avec des mélanges binaires de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* réalisés par introduction simultanée des deux populations bactériennes.

Les biofilms sont produits dans des réacteurs annulaires (deux cylindres concentriques : un cylindre stationnaire externe et un cylindre interne en rotation) complètement mélangés et alimentés en continu, dans lesquels 12 parties coulissantes forment l'intégralité de la paroi interne du cylindre et permettent ainsi d'échantillonner le biofilm développé à la surface. Dans ces expériences, le temps de résidence hydraulique est maintenu à 10 minutes (temps nécessaire au renouvellement de la phase aqueuse), ce qui fait que la croissance des bactéries en suspension est négligeable et que toute l'activité du réacteur peut être attribuée au biofilm. Leur analyse des biofilms obtenus indique que ni le taux spécifique de formation des produits cellulaires, ni la proportion stoechiométrique glucose - oxygène dans le biofilm de *K. Pneumoniae* ou de *P. Aeruginosa* ne sont affectés par la présence de l'autre espèce. Ils en concluent qu'il n'y a pas d'interaction entre ces deux souches bactériennes. Cependant, il existe tout de même une certaine compétition entre les deux souches bactériennes pour la colonisation du support.

Toutefois, BRYERS & BANKS (1990) ont étudié un autre type de biofilm mixte où deux types de bactéries métabolisent des donneurs d'électrons différents mais

entrent en compétition pour l'oxygène. Dans ce biofilm mixte, *Pseudomonas putida* ATCC 11172 métabolise exclusivement le glucose tandis qu'*Hyphomicrobium spp* ZV 620 utilise le méthanol. Le développement de ce biofilm mixte est limité par l'oxygène.

SANTOS *et al.* (1992) ont étudié les possibilités d'utilisation de billes d'un gel avec un système de populations mixtes co-immobilisées pour les stations d'épuration appliqué à la nitrification et la dénitrification des eaux usées. La souche *Pseudomonas denitrificans* se concentre à l'intérieur des particules de gel et permet la dénitrification en anaérobiose et la souche *Nitrosomonas europaea* se localise en surface des billes de gel et permet la nitrification en aérobiose. Les deux souches bactériennes n'entrent donc pas en compétition pour leur substrat, l'une des bactéries utilisant les nitrates en absence d'oxygène et l'autre bactérie utilisant l'ammonium en présence d'oxygène. De plus, les deux souches bactériennes se complètent pour la transformation de l'ammonium en azote.

En biofilm comme en suspension, tous les types d'interactions peuvent exister. Il peut y avoir compétition entre les espèces bactériennes au sein d'un biofilm mixte pour un même substrat, mais les espèces bactériennes peuvent également se compléter en métabolisant des substrats différents.

2.2.3-Stabilités des plasmides au sein des biofilms.

Les plasmides sont dits stables dans une population bactérienne, lorsqu'à travers les cycles successifs de divisions cellulaires, leur nombre reste constant.

Deux types d'instabilité plasmidique sont généralement définis :

- L'instabilité structurale : des délétions ou des insertions se produisent dans l'ADN plasmidique, pouvant conduire à des modifications des produits des

gènes plasmidiques. Dans tous les cas, elle conduit à une modification de la taille des plasmides.

- L'instabilité ségrégationnelle, en relation avec le cycle de division cellulaire, peut résulter d'une mauvaise répartition des plasmides au cours de la division cellulaire, mais aussi d'un décalage entre les vitesses de réplication de l'ADN chromosomique et de l'ADN plasmidique. L'instabilité ségrégationnelle entraîne des modifications dans le nombre de copies des plasmides pouvant conduire, après un certain nombre de divisions cellulaires, à la production de bactéries dépourvues de plasmides.

La régulation du nombre de copies dans les plasmides pBR est obtenue par l'intermédiaire d'une protéine codée par le gène *rep* (réplication) (MAGUIN *et al.*, 1992). Le plasmide recombinant pCE328 utilisé dans notre étude étant dépourvu de ce gène, son nombre de copies n'est plus contrôlé et est trois fois plus important que pour le plasmide pCE325 qui contient le gène *rep* (COVARRUBIAS *et al.*, 1981).

La stabilisation des plasmides peut également être due à d'autres gènes portés par les plasmides, comme le gène *par* de pBR327-*par* (ZURITA *et al.*, 1984) impliqué dans le mécanisme de partition du plasmide et qui permet la répartition correcte des copies de plasmides dans les cellules filles au cours de la division cellulaire. Différentes séquences *par* existent dans différents plasmides et *par* n'étant pas réplicon spécifique, son introduction dans un plasmide instable permet d'augmenter sa stabilité. Les deux plasmides recombinants pCE325 et pCE328 utilisés dans notre étude portent tous deux ce gène *par*, permettant ainsi une meilleure stabilité de ces plasmides.

D'autres considérations telles que les conditions de culture, l'existence d'une pression de sélection en faveur du plasmide et la fixation sur un support peuvent influencer la stabilité plasmidique et doivent être prises en compte.

DE TAXIS DU POET *et al.* (1987) ont étudié la stabilité du plasmide pKK 223-200 dans *Escherichia coli* JM 105 pour des bactéries fixées et libres. Cette étude indique que la stabilité du plasmide serait meilleure pour des bactéries fixées. Les auteurs expliquent ce fait par l'hypothèse suivante : l'immobilisation limiterait la compétition vis-à-vis du substrat entre les bactéries porteuses et non porteuses de plasmides, et l'éventuel avantage des bactéries sans plasmides au niveau du taux de croissance. Ce dernier argument est valable seulement si le plasmide influe sur le taux de croissance de la cellule hôte, ce qui est le cas dans cette étude puisque le taux de croissance maximum à 37°C en milieu liquide des bactéries porteuses de plasmides (0.82 h⁻¹) est inférieur à celui des bactéries sans plasmides (1.02 h⁻¹). Ainsi, les cellules fixées au départ contiennent le plasmide et les cellules filles, y compris celles qui auraient perdu leur plasmide, sont celles qui se détacheraient le plus du biofilm, permettant ainsi une meilleure stabilité apparente des plasmides. Ainsi, la stabilité des plasmides recombinants au sein des biofilms est meilleure qu'en suspension, toutefois, il faut tenir compte de ce facteur stabilité qui peut diminuer la maintenance du plasmide recombinant et entraîner : une surestimation des fréquences de transfert pour une instabilité chez les donatrices et une sous estimation des fréquences de transfert pour une instabilité chez les réceptrices.

2.2.4-Transfert de plasmides au sein de biofilms bactériens.

GOWLAND & SLATER (1984) ont étudié le transfert de plasmides de résistance aux antibiotiques (facteurs R conjugatifs) entre différentes populations d'*Escherichia coli* cultivées dans un réacteur à biomasse bactérienne fixée sur billes de verre, alimenté en continu par un milieu aéré et thermostaté à 37°C.

Au bout de 192 heures de culture des bactéries donatrices et réceptrices (10⁷ bactéries cm⁻³ sont introduites au temps 0 pour chacune des souches), la fréquence de transfert est de 2.6 x 10⁻² transconjugants par réceptrice. Et à partir de 576 heures, la population de transconjugants estimée à environ 10⁸ UFC cm⁻³ devient dominante sans pression de sélection apparente.

Cette expérience montre que dans certains cas, les transconjugants s'implantent mieux que les donatrices au sein des biofilms, montrant qu'il faut à la fois étudier la survie des donatrices et le transfert de l'ADN pour faire une estimation correcte de la dissémination de l'ADN.

BALE *et al.* (1990) ont étudié le transfert de plasmides naturels conjugatifs qui codent pour la résistance au mercure et sont isolés au sein de biofilms formés sur des pierres contenues dans le lit d'une rivière (épilithon). Ils ont étudié le transfert de ces plasmides sur des pierres stériles ou non au sein d'une rivière. Les réceptrices (*Pseudomonas*) et les donatrices (*Pseudomonas*) sont déposées sur des filtres qui sont ensuite fixés sur les pierres, ces pierres sont placées dans des sacs plastiques qui sont immergés dans la rivière. L'étude de transfert entre deux souches *Pseudomonas* en conditions non stériles (présence des bactéries provenant d'épilithons) est également effectuée au sein d'un microcosme en laboratoire.

En conditions stériles, ils ont observé une relation linéaire entre la fréquence de transfert du plasmide pQM1 et la température de la rivière entre 6 et 21°C. Une augmentation de la température de 2.6°C multiplie d'un facteur 10 la fréquence de transfert. Cette augmentation de la fréquence de transfert peut être due à une augmentation de transfert et/ou à une augmentation de la croissance des transconjugants avec la température.

Les résultats obtenus dans les microcosmes en laboratoire et "in situ" (conditions non stériles) sont très similaires en ce qui concerne les fréquences de transfert : 3.7×10^{-6} transconjugants/réceptrices à 17°C "in situ" et 2×10^{-6} transconjugants/réceptrices à 15°C au sein de microcosmes, indiquant que les microcosmes en laboratoire permettent de prédire les résultats "in situ".

La température a une influence importante sur le transfert par conjugaison au sein d'une population bactérienne fixée en milieu aquatique. Et les microcosmes utilisés en laboratoire sont un outil intéressant pour étudier les potentialités de transfert de plasmides vers des populations bactériennes de l'environnement. Cependant, pour cette étude les plasmides utilisés sont conjugatifs et les bactéries

donatrices et réceptrices sont introduites simultanément dans le milieu d'étude, ce qui n'est pas représentatif d'un rejet accidentel d'OGMs.

ANGLES *et al.* (1993) ont étudié le transfert d'un plasmide conjugatif à large spectre d'hôte : RP1 à partir d'une souche marine *Vibrio* S142 vers une autre souche marine *Vibrio* SW5 en suspension et fixées sur billes de verre au sein d'un mini-chemostat de 20 ml contenant 25 billes de verre. Le réacteur était alimenté et aéré de façon continue à 26°C. Les réceptrices ont été introduites en premier dans le réacteur, de manière à former un biofilm de réceptrices, ensuite seulement les donatrices sont ajoutées, ce qui est plus représentatif d'une situation de rejet de micro-organismes.

Le transfert du plasmide RP1 est significativement plus élevé au sein du biofilm qu'au sein de la phase aqueuse : 5.1×10^{-5} transconjugants par donatrices avec un rapport donatrices par réceptrice de 9.3×10^{-2} en phase aqueuse et 1.3×10^{-3} transconjugants par donatrice avec un rapport donatrices par réceptrice de 5.4×10^{-2} au sein de biofilms.

Les transferts de plasmides au sein de biofilms sont donc plus ou moins importants en fréquence suivant le milieu dans lequel ils s'effectuent, la température, la présence de nutriments, la densité des cellules bactériennes, le rapport donatrices par réceptrice, les souches bactériennes utilisées,... Toutefois, la fréquence de transfert au sein de biofilms semble plus importante qu'en suspension pour des concentrations bactériennes comparables. Mais, l'état physiologique, l'activité métabolique de la cellule bactérienne, l'aération du milieu, la disponibilité des nutriments ne sont pas les mêmes au sein de la biomasse fixée et au sein de la biomasse en suspension et peuvent être impliqués dans la différence de fréquence observée.

Nous avons décidé d'utiliser un système expérimental permettant la formation de biofilms bactériens en milieu aquatique pour évaluer le risque de rejet accidentel d'OGMs dans l'environnement.

2.3-LA BIOMASSE DES BOUES ACTIVEES.

Le procédé par boues activées permet le traitement par voie biologique des eaux usées. L'objectif est d'éliminer une quantité maximum de contaminants principalement organiques avec un temps de résidence minimum pour l'eau à traiter.

Les boues activées sont formées dans les stations d'épuration au sein de bassins aérés et alimentés en continu par l'eau à épurer, dans lesquels se développe une culture microbienne libre qui se rassemble en flocons ou "flocs" formant une sorte de boue. Les flocons de boues activées sont constitués de micro-organismes incrustés dans une matrice complexe d'hétéropolymères (ERIKSSON & ALM, 1991 ; URBAIN *et al.*, 1993). Ces flocons de boues activées sont composés d'un mélange de bactéries variées en contact les unes avec les autres, le transfert par conjugaison nécessitant le contact d'une cellule donatrice à une cellule réceptrice, la conjugaison doit être favorisée au sein de ces flocons. L'utilisation de systèmes expérimentaux mettant en oeuvre la biomasse de boues activées en suspension est un modèle représentatif d'un type d'environnement dans le cas d'un rejet accidentel d'OGMs. Aussi, nous avons choisi d'utiliser parmi nos modèles, un réacteur à alimentation semi-continue avec recyclage de biomasse: le réacteur "batch-séquencé", pour étudier le transfert d'ADN_r vers des souches isolées des boues activées cultivées sous forme partiellement agrégée.

Plusieurs études ont montré que les boues activées constituaient un réservoir important de plasmides :

Ainsi, l'analyse faite par FUJITA *et al.* (1993) sur quatre stations d'épuration au Japon a montré qu'environ 40% des souches testées contenaient 1 à 9 plasmides ayant une taille comprise entre 1.8 et 168 kb. 35% de ces plasmides auraient au moins une taille de 30 kb et pourraient donc être conjugatifs.

BAUDA *et al.*(1995) ont analysé pour leur contenu plasmidique des colonies isolées à partir de boues activées provenant de la station d'épuration de Metz

(FRANCE). Tout comme FUJITA *et al.* (1993) ils ont montré que 40% des bactéries possèdent au moins un plasmide.

Les plasmides étant nombreux et variés au sein des boues activées, ils constituent un potentiel mobilisateur de l'ADN recombinant en cas d'arrivée d'organismes recombinants au niveau de la station. Ce potentiel doit être pris en compte dans les études de biosécurité concernant la dissémination volontaire ou involontaire de micro-organismes génétiquement modifiés (OGMs).

Ces dernières années, les biofilms ont été utilisés dans le traitement des eaux usées, car ils permettent : l'oxydation du carbone, la nitrification, la détoxification de xénobiotiques et l'élimination de métaux (BRYERS, 1994). Par exemple, des bactéries nitrifiantes fixées à un support granuleux peuvent être utilisées comme filtre biologique pour éliminer l'ammoniac (ROGALLA & PAYRAUDEAU, 1988). En général, dans les stations d'épuration on utilise deux filtres biologiques en série : un pour la nitrification et un pour la dénitrification, dans un premier temps l'eau usée est nitrifiée, l'eau nitrifiée passe ensuite dans le filtre dénitrifiant (JIMENEZ *et al.*, 1987).

L'avantage de l'utilisation de biofilms dans les traitements d'eaux usées est de pouvoir traiter une grande quantité d'eaux usées dans un système plus compact (notamment pour l'élimination simultanée de carbone, d'azote et de phosphore), limitant ainsi la taille donc les inconvénients d'une station d'épuration (odeur, bruit...) (CAPDEVILLE & ROLS, 1992).

L'utilisation de populations bactériennes fixées pour l'évaluation de la dissémination d'OGMs est donc représentative du système de traitement des eaux usées. Nous avons décidé d'étudier le transfert de plasmides recombinants vers des souches isolées de boues activées au sein de réacteurs à lit fixe alimentés en continu permettant la formation de biofilms, en parallèle avec le réacteur "batch-séquéncé".

2.3.1-Transfert de plasmides au sein de boues activées.

Plusieurs expériences ont été réalisées pour étudier la dissémination des plasmides au sein de la population bactérienne des boues activées.

GEALT *et al.* (1985) ont montré que le plasmide conjugatif R100-1 contenu dans *Escherichia coli* χ 1784 était transféré vers des souches isolées des boues : *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* χ 1997 et *Escherichia coli* KA1661 (pBR325). Le taux de transfert est plus faible d'un facteur 10^4 vers les souches *Enterobacter* et *E. coli* KA1661 (pBR325) que vers *E. coli* χ 1997. Ceci qui peut s'expliquer selon les auteurs par la restriction modification qui existe entre *Enterobacter* et *E. coli* et par la présence du plasmide pBR325 dans la souche réceptrice *E. coli*.KA1661.

La mobilisation du plasmide pBR325 (*tra* - *mob* - *oriT* +) par formation de cointégrat (fusion de deux plasmides), donc par conduction a été observée lors d'un transfert triparental : *Escherichia coli* χ 1784 (R100-1) : souche mobilisatrice - *Escherichia coli* KA 1661 (pBR325) : souche donatrice - une souche réceptrice isolée des boues activées : *Enterobacter cloacae* 191 ou *Escherichia coli* 343. Les cellules parentales sont introduites simultanément dans un erlen contenant des eaux usées stériles à des concentrations de 10^7 à 10^8 UFC cm^{-3} . Les transconjugants isolés sur milieu sélectif sont vérifiés par hybridation ADN-ADN avec une sonde correspondant au fragment *Eco* RI - *Nde* I de pBR325 contenant le site origine de transfert (*oriT*) et le gène codant pour la résistance à l'ampicilline.

La mobilisation est observée aussi bien en milieu riche qu'en milieu eaux usées stériles avec une fréquence de transfert plus faible en eaux usées stériles. Ces fréquences de transfert en présence de la souche réceptrice *E. coli* 343 étant de 1.2×10^{-5} transconjugants par donatrice en milieu riche et de 8.4×10^{-7} transconjugants par donatrice en eaux usées stériles.

L'analyse des différentes étapes de la mobilisation au cours du temps montre que dans un premier temps, le plasmide R100-1 passe dans la souche donatrice *E. coli* KA 1661 (pBR325). Les auteurs ont ensuite décidé d'analyser le contenu plasmidique des réceptrices. Les profils plasmidiques obtenus après extraction plasmidique,

digestion enzymatique et migration électrophorétique montrent des poids moléculaires variables et plus élevés que les plasmides R-100-1 et pBR325 extrait de la souche mobilisatrice et de la souche donatrice, suggérant un réarrangement entre R100-1 et pBR325. Des hybridations ADN-ADN avec la sonde de pBR325 confirme cette hypothèse : les bandes plasmidiques supérieures au poids moléculaire de pBR325 et de R100-1 hybrident. Les plasmides contenus dans les transconjugants ont donc subi un réarrangement qui produit des plasmides R100-1 et pBR325 de poids moléculaire plus important confirmant que la mobilisation du plasmide pBR325 passe par la formation d'un cointégrat qui produit deux plasmides R100-1 et pBR325 mal résolus.

Cette étude montre que le plasmide *mob* - peut être mobilisé par formation d'un cointégrat avec un plasmide conjugatif. Mais cette expérience n'est pas représentative de ce qui peut se passer dans le cas de rejet accidentel d'OGMs dans l'environnement, les donatrices étant introduites en même temps et la mobilisation étant étudié dans des conditions stériles.

MAC CLURE *et al.* (1989) ont étudié la mobilisation d'un plasmide recombinant à large spectre d'hôte pD10 (*tra* - *mob* + *oriT* +) au sein d'un pilote de boues activées : constitué principalement d'une chambre d'aération de 4 litres de boues activées (bactéries + protozoaires) avec un système d'agitation permanent et alimenté en continu par des eaux usées stériles et de l'effluent synthétique contenant 500 mg l⁻¹ de 3-chlorobenzoate. Le plasmide pD10 correspond au plasmide à large spectre d'hôte pKT231, dans lequel les gènes de dégradation du 3-chlorobenzoate du plasmide pJP4 ont été introduits. La donatrice *Escherichia coli* J53 (pD10) est introduite à une concentration de 10⁸ UFC cm⁻³ dans le pilote de boues activées contenant une population bactérienne totale estimée à 10⁹ UFC cm⁻³ susceptible de contenir des souches mobilisatrices. Les transconjugants sont vérifiés par hybridation ADN-ADN avec une sonde correspondant aux gènes cataboliques du 3-chlorobenzoate.

Les souches donatrices ne cessent de diminuer pendant les 16 jours de l'expérience : de 10⁸ à 10⁴ UFC cm⁻³, alors que des transconjugants apparaissent le

8^{ème} jour à la concentration de 10^3 UFC cm^{-3} et augmentent jusqu'à 10^6 UFC cm^{-3} au 16^{ème} jour. Certaines de ces souches transconjugantes ont pu être identifiées comme des *Pseudomonas*.

Les boues activées sont donc capables de mobiliser le plasmide recombinant pD10 (*tra - mob + oriT*⁺). Mais, cette expérience est réalisée en présence de pression de sélection : le 3-chlorobenzoate, car elle a pour but de pouvoir utiliser les gènes de dégradation du 3-chlorobenzoate portés par le plasmide pD10 dans le cadre d'un rejet volontaire de ce plasmide au sein de station d'épuration pour pouvoir dégrader le 3-chlorobenzoate dans les eaux usées contaminées. Ce n'est donc pas représentatif d'un rejet accidentel d'OGMs.

MANCINI *et al.* (1987) ont étudié la mobilisation du plasmide recombinant non conjugatif pHSV106 (*tra - mob + oriT*⁺) contenant le gène eucaryote de la thymidine kinase : *tk*, entre une souche de laboratoire *Escherichia coli* (pHSV106) et des bactéries isolées des eaux usées au sein d'un pilote de boues activées, en conditions non stériles. Le pilote de boues activées utilisé est constitué de 3 niveaux principaux d'activité : un cylindre permettant la clarification où les eaux usées, l'alimentation et les souches sont apportées, ensuite on passe dans un système d'aération et enfin dans un deuxième cylindre permettant une seconde clarification. La souche réceptrice (*Escherichia coli* 343) et la souche mobilisatrice (*Escherichia coli* A35 portant le plasmide conjugatif pPMA35) isolées des boues activées sont introduites en même temps dans le pilote de boues activées et les donatrices sont introduites 24 heures après dans le pilote de boues activées contenant 10^6 à 10^7 UFC cm^{-3} de bactéries réceptrices et mobilisatrices. La souche donatrice utilisée est un mutant de *recA* (gène de recombinaison), impliquant que si la mobilisation est observée, celle-ci ne s'effectue pas par un mécanisme de formation de cointégrats. Les transconjugants sont vérifiés par une hybridation ADN-ADN avec la sonde correspondant au gène *tk*.

Des transconjugants sont détectée entre 4×10^1 et 1×10^4 UFC cm^{-3} suivant le niveau où les prélèvements sont effectués (au fond - au milieu - boues). Ils sont le plus nombreux au sein des boues où l'on trouve les floes permettant un contact étroit

entre les bactéries. Les souches isolées des boues sont donc capables de jouer le rôle de réceptrices ou de mobilisatrices de plasmides *tra - mob + oriT*⁺.

Ces trois études de mobilisation montrent qu'il existe des plasmides conjugatifs au sein de boues activées capables de mobiliser des plasmides non conjugatifs dépourvus des gènes *tra*, mais également des gènes *mob*.

Cette revue bibliographique sur la conjugaison, nous montre que ce mode de transfert est possible au sein de biofilms et des boues activées, et que la fréquence des événements varie en fonction de nombreux paramètres. Mais ces études ne portent pas sur des plasmides *oriT*⁻ et rarement sur des plasmides *mob*⁻.

Or, pour une évaluation du risque de rejet d'OGMs, il est important d'estimer la mobilisation de plasmides recombinants : *tra - mob - oriT*⁻ dans l'environnement. Car, afin de limiter la dissémination des OGMs lors d'un rejet accidentel, il est intéressant d'utiliser des plasmides à faibles potentialités de transfert. Nous avons choisi d'étudier la mobilisation de ce type de plasmides au sein de biofilms cultivés en laboratoire dans des conditions parfaitement standardisées, dans un premier temps entre des souches *Escherichia coli* et dans un deuxième temps entre *Escherichia coli* et des souches isolées de boues activées. Les transferts entre *Escherichia coli* et les souches isolées des boues ont été étudiés au sein de biofilms, mais également au sein de réacteurs "batch-séquencés" qui constituent deux systèmes représentatifs de ceux utilisés dans les stations de traitement d'eaux usées et susceptibles de permettre des transferts de gènes par conjugaison. Nous avons également décidé d'utiliser le transfert sur boîtes de Pétri pour étudier des événements rares comme la mobilisation de plasmides *tra - mob - oriT*⁻ par la biomasse totale des boues activées.

3) MATÉRIEL ET MÉTHODES :

Ce chapitre rapportant le matériel et les méthodes utilisés est présenté en suivant le plan : les souches et les milieux utilisés, la vérification des souches et leur dénombrement, les différentes études de transfert en biofilms, réacteurs "batch-séquencés" et sur boîtes de Pétri, les protocoles concernant la vérification des transconjugants et enfin le matériel et les méthodes utilisés pour les cinétiques d'adhésion.

3.1-SOUCHES BACTERIENNES, BOUES ACTIVEES ET PLASMIDES.

3.1.1-Souches bactériennes

Trois souches d'*Escherichia coli* K12 ont été utilisées dans cette étude.

Escherichia coli K12 UB1832 (BENNETT *et al.*, 1978) porte une résistance chromosomique à la rifampicine (Rif^R) et à la streptomycine (Sm^R). Elle est auxotrophe pour l'histidine (*his*), la lysine (*lys*), le tryptophane (*try*) et ne fermente pas le lactose (*lac*⁻). Cette souche nous sert de donatrice de plasmides pour toutes les expériences de transfert qui ont été réalisées au sein de réacteurs à lit fixe (transfert *E. coli* - *E. coli* et transfert *E. coli* - souches des boues), de réacteurs "batch-séquencés" (transfert *E. coli* - souches des boues) et sur boîtes de Pétri (transfert *E. coli* - "biomasse totale" des boues activées).

Le génotype de la souche *E. coli* K12 UB1832 est : *his, lys, try, lac*⁻, Sm^R, Rif^R.

Escherichia coli K12 UB281 (BENNETT & RICHMOND, 1976) porte une résistance chromosomique à l'acide nalidixique (Nal^R). Elle est auxotrophe pour la proline (*pro*) et la méthionine (*met*). Cette souche nous sert de réceptrice de plasmides pour les expériences de transfert *E. coli* - *E. coli* au sein de réacteurs à lit fixe.

Le génotype de la souche *E. coli* K12 UB281 est : *pro, met*, Nal^R.

Escherichia coli K12 UB281 :: Tn5 *luxAB* a été construite pour cette étude par Pierre GENEVAUX par transduction généralisée à partir de la souche *Escherichia coli* DH1 LF 20156 fournie par Michael DuBow (Université Mc Gill, Montréal, Canada) . En plus des caractéristiques décrites ci-dessus pour la souche *E. coli* K12 UB281, cette souche possède une résistance chromosomique à la tétracycline, les gènes *luxAB* codant pour l'hétérodimère de la luciférase, cette résistance et ces gènes ayant été introduits au niveau de l'opéron xylose grâce au transposon Tn5. Cette souche nous sert de réceptrice de plasmides pour les expériences de transfert sur boîtes de Pétri.

Le génotype de la souche *E. coli* K12 UB281 :: Tn5 *luxAB* est : *pro*, *met*, *xyl*⁻, Nal^R, Tet^R.

Enterobacter hirae est une souche qui a été isolée d'une station d'épuration d'eaux usées (Maxéville) et qui s'est révélée hydrophobe par le test de "Bacterial Adhesion To Hydrocarbons" (BATH) en utilisant comme hydrocarbure l'octane. Cette souche nous sert de témoin positif pour nos tests BATH (JORAND *et al.*, 1994).

Les souches *E. coli* K12 ont été fournies par Peter BENNET (Université de Bristol, G. B.).

La souche *Enterobacter hirae* a été fournie par Frédéric JORAND du laboratoire Santé Environnement (Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Nancy).

3.1.2-Boues activées.

Un échantillon d'un litre de boues activées a été prélevé à la station d'épuration de Metz (France), soumis à des ultrasons produits par une sonde plongeante durant 1 minute à 250 Watts à 80% de cycles actifs (Bioblock H72441) puis, mis à décanter 4 heures. Le surnageant a ensuite été filtré sur une toile à bluter de porosité 5 µm pour éliminer les particules ayant une taille supérieure à 5 µm. Ce surnageant a été testé pour l'apport d'éléments mobilisateurs pour les expériences de mobilisation sur boîtes de Pétri.

Par contre pour les expériences de transfert *E. coli* - souches isolées des boues au sein de biofilms et de réacteurs "batch-séquencés", seules dix souches isolées des boues ont été sélectionnées pour servir de souches réceptrices.

Elles ont été isolées sur milieu minimum M₉ gélosé en présence d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Interchim UP848530) à une concentration finale de 144 µg cm⁻³ et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal, Interchim UP4053430) à une concentration finale de 120 µg cm⁻³.

Les colonies bleues capables de dégrader le lactose, sélectionnées sur ce milieu sont ensuite réisolées sur milieu Fluorocult gélosé (Merck 4038) pour une détection rapide d'*Escherichia coli* sous lumière UV. Neuf colonies non fluorescentes et une colonie fluorescente ont été conservées.

Ces dix souches sont des bactéries Gram négative aéro-anaérobies facultatives. Trois de ces dix souches ont pu être identifiées par galerie API 20E (bioMérieux 20100) comme *Klebsiella oxytoca* et deux autres comme appartenant au genre *Enterobacter* et *Klebsiella*. Ces dix souches portent une résistance chromosomique à l'ampicilline, à la rifampicine pour deux d'entre elles et à l'acide nalidixique pour deux autres.

3.1.3-Plasmides.

Quatre plasmides ont été utilisés dans cette étude.

Le plasmide recombinant pCE325 dérivé du plasmide pBR325 (BOLIVAR, 1978), porte les marqueurs de résistance à l'ampicilline (Amp^R) et au chloramphénicol (Cm^R), une origine de transfert (*oriT*) et des séquences introduites par génie génétique : le segment *Hind* III - *Sal* I porteur de la séquence "tk-vacc" : séquence traceuse "eucaryotes" du gène de la thymidine kinase du virus de la vaccine (WEIR & MOSS, 1983) et un segment *Ava* I porteur de la séquence "par" du plasmide pBR327-*par* (ZURITA *et al.*, 1984) permettant la stabilisation du plasmide.

Le génotype du plasmide pCE325 est : Amp^R, Cm^R, *oriT*⁺, *par*, *tk-vacc*.

Le plasmide recombiné pCE328 dérive du plasmide pBR328 (SOBERON *et al.*, 1980 ; COVARRUBIAS *et al.*, 1981) qui lui-même dérive de pBR325 par délétion de la région qui porte le site *oriT*. Il possède donc les mêmes caractéristiques que pCE325 sauf qu'il est dépourvu d'origine de transfert.

Le génotype du plasmide pCE328 est : Amp^R, Cm^R, *oriT*⁻, *par*, *tk-vacc*.

Ces deux plasmides : pCE325 et pCE328 ne sont pas autotransférables, donc pour étudier leur transfert, des éléments dits "helpers" ou "auxiliaires" porteurs des gènes *tra* et *mob* ont été ajoutés en *trans*. Ces éléments ont été apportés par les plasmides suivants :

- R388, plasmide conjugatif (*tra*⁺) à large spectre d'hôtes (Inc W), porteur des résistances au triméthoprim (Tp^R) et aux sulfamides (Su^R), isolé à partir d'une souche *Escherichia coli* isolée en milieu hospitalier (DATTA & HEDGES, 1972).

Le génotype du plasmide R388 est : Tp^R, Su^R, *tra*⁺, Inc W.

- et pUB2380, plasmide non conjugatif, porteur des gènes *mob* spécifiques de l'origine de transfert de pCE325 et d'une résistance à la kanamycine (Km^R). Il possède deux séquences inversement répétées (IR) de type transposon et peut de ce fait être à l'origine de la formation de cointégrats. Il a été isolé d'une souche *Escherichia coli* dans le lisier d'un élevage de porcs (BENNETT *et al.*, 1986).

Le génotype du plasmide pUB2380 est : Km^R, *mob*⁺.

Les cartes de restriction de ces différents plasmides sont représentées sur les figures 4 et 5. Ces plasmides nous ont été fournis par Marie-Claire LETT du laboratoire de Microbiologie de l'Université Louis Pasteur (Strasbourg).

Figure 4: Cartes de restriction des plasmides à ADN recombinants pCE325 et pCE328 (Rapport Chimie et Ecologie, 1993).

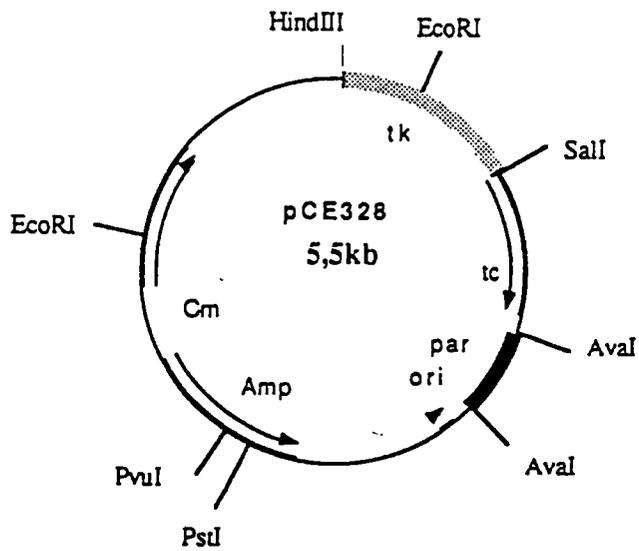
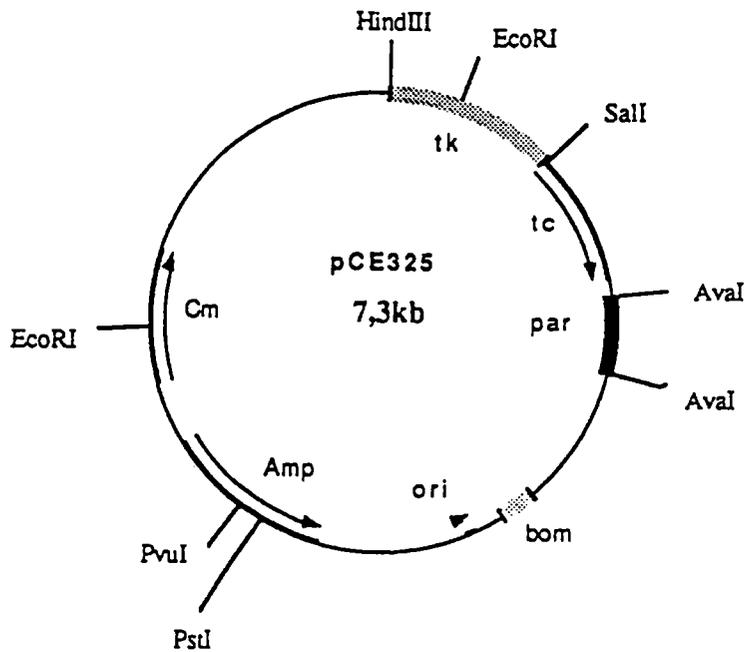
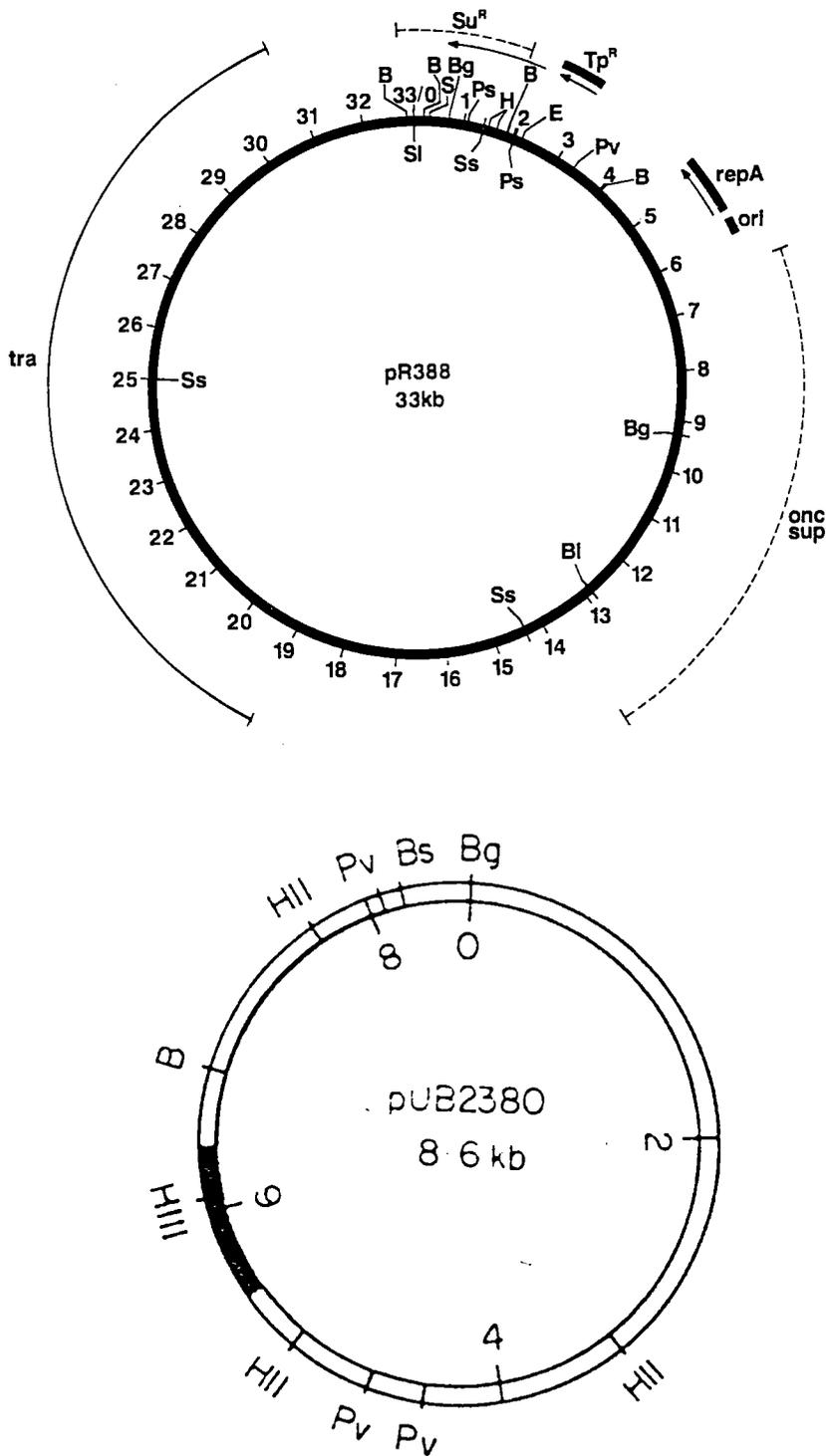


Figure 5 : Cartes de restriction des plasmides mobilisateurs R388 (VALENTINE & KADO, 1989) et pUB2380 (BENNETT *et al.*, 1986). (Les sites des enzymes de restriction sont pour R388 : B = *Bam* HI, Bg = *Bst* II, S = *Sst* I, Ps = *Pst* I, H = *Hind* III, E = *Eco* RI, Pv = *Pvu* II, BI = *Bal* I, Ss = *Sst* II, SI = *Sal* I et pour pUB2380 : B = *Bam* HI, Bg = *Bgl* I, Bs = *Bst* I, HII = *Hind* II, HIII = *Hind* III, Pv = *Pvu* II).



3.2-MILIEUX DE CULTURE.

Les souches d'*Escherichia coli* et les clones issus des boues activées sont cultivés en milieu Luria Bertani (L. B.), composé de 10 g de biotrypcase (bioMérieux 53641), 5 g d'extrait de levure (bioMérieux 53121), 5 g de chlorure de sodium (Merck 64041000) et d'eau Milli-Q en quantité suffisante pour un litre.

L'alimentation en continue du réacteur à biomasse bactérienne fixée se fait avec le milieu L. B. dilué au 1/100^{ème} dans de l'eau déminéralisée (soit une concentration en carbone organique dissout (COD) de 60 mg par litre).

L'alimentation du réacteur à alimentation séquencée avec recyclage de biomasse : réacteur "batch-séquencé", se fait par un effluent synthétique contenant : 500 mg cm⁻³ d'amidon (Sigma), 210 mg cm⁻³ de saccharose (Merck), 22.5 mg cm⁻³ de méthionine (Sigma), 40 mg cm⁻³ d'urée (Prolabo), 130 mg cm⁻³ d'acide acétique (Merck), 120 mg cm⁻³ de peptone tryptique de caséine (bioMérieux) et 20 mg cm⁻³ d'hydrogénophosphate de disodium (Prolabo).

Cet effluent synthétique est préparé en solutions stocks 20x concentrées.

Le bouillon de Muller Hinton (M. H.) (Diagnostics Pasteur 69444) comprend 25 g par litre d'eau Milli-Q portés à ébullition jusqu'à dissolution complète, il sert à la congélation des différentes souches bactériennes utilisées. Les souches se conservent dans du bouillon M. H. contenant les antibiotiques pour lesquels le chromosome et le ou les plasmides de la souche bactérienne porte une résistance. Le tout est conservé à -80°C avec 50% de glycérol à 40% (Prolabo 24387292).

Le milieu L. B. gélosé contient les mêmes produits que le milieu L. B. ci-dessus avec en plus 15 g par litre d'agar (bioMérieux 51082). Il est ensuite porté à ébullition jusqu'à dissolution complète. Il sert à la vérification de la présence des gènes *luxAB* chez les transconjugants isolés dans les transferts sur boîtes de Pétri et à réaliser les transferts sur boîtes de Pétri.

Le milieu de Muller Hinton (M. H.) gélosé (Diagnostics Pasteur 64884) comprend 35 g par litre d'eau Milli-Q portés à ébullition jusqu'à dissolution complète, il sert à dénombrer les unités formant colonie (UFC) des souches *Escherichia coli* après ajout des antibiotiques correspondants, faire des isollements, des antibiogrammes pour les différentes souches utilisées.

Le milieu minimum M₉ gélosé est composé de 12.8 g de Na₂HPO₄ 7H₂O (Prolabo 28029292), 3 g de KH₂PO₄ (Rectapur 26925), 0.5 g de NaCl Merck 64041000), 1 g de NH₄Cl (Merck 1145), de 15 g d'agar (bioMérieux 51082) et d'eau Milli-Q en quantité suffisante pour 900 cm³. A ce stade, le milieu est dissous par ébullition, et après stérilisation, le lactose (4 g par litre) est ajouté par filtration sur membrane 0.22 µm (Millipore SLGV02535) après dissolution dans 100 cm³ d'eau Milli-Q. Ce milieu sert à dénombrer les UFC correspondants aux dix souches isolées des boues et aux transconjugants qui sont produits au sein des réacteurs à lit fixe et des réacteurs "batch-séquencés" dans les transferts *E. coli* - souches isolées des boues, après ajout des antibiotiques correspondants.

Le milieu Mac Conkey (Difco 0818-01-1) gélosé comprend 40 g par litre d'eau Milli-Q portés à ébullition jusqu'à dissolution complète, il est utilisé pour étudier la fermentation d'un sucre chez les coliformes.

Tous ces milieux sont stérilisés par autoclavage 20 minutes à 121°C.

Les solutions mères d'antibiotiques utilisées pour les différents milieux de culture sont les suivantes :

- La solution mère d'acide nalidixique est préparée en pesant 100 mg d'acide nalidixique (Sigma N8878) pour 10 cm³ d'eau Milli-Q alcalinisée avec de la soude concentrée (Prolabo 28232294).

- La solution mère de rifampicine est préparée en pesant 100 mg de rifampicine (Sigma R3501) pour 5 cm³ d'eau Milli-Q et 5 cm³ d'éthanol pur.

- La solution mère de chloramphénicol est préparée en pesant 25 mg de chloramphénicol (Sigma C0378) pour 10 cm³ d'éthanol pur.

- La solution mère de triméthoprime est préparée en pesant 25 mg de triméthoprime (Sigma T7883) pour 10 cm³ de méthanol pur.

- La solution mère de kanamycine est préparée en pesant 100 mg de kanamycine (Sigma K4000) pour 10 cm³ d'eau Milli-Q.

- La solution mère de tétracycline est préparée en pesant 108 mg de tétracycline (Serva 35866) pour 10 cm³ d'éthanol.

- La solution mère de streptomycine est préparée en pesant 125 mg de streptomycine (Sigma S-6501) pour 10 cm³ d'eau Milli-Q.

Ces solutions mères d'antibiotiques ainsi obtenues sont filtrées avec un filtre Millex stérile 0.22 µm (Millipore SLGV02535) dans des tubes stériles de 10 cm³ (Labo Express Service 0041) et sont conservés à -20°C pendant 3 semaines au plus.

Les concentrations finales dans les milieux de culture sont les suivantes :

-40 µg cm⁻³ pour l'acide nalidixique.

-50 µg cm⁻³ pour la rifampicine.

-25 µg cm⁻³ pour le chloramphénicol.

-25 µg cm⁻³ pour la triméthoprime.

-25 µg cm⁻³ pour la kanamycine.

-12.5 µg cm⁻³ pour la tétracycline.

-100 µg cm⁻³ pour la streptomycine.

Les antibiotiques sont ajoutés stérilement dans les milieux de culture.

Toutes les cultures bactériennes sont réalisées de la manière suivante : 10 cm³ de milieu L. B. contenant les antibiotiques sélectifs des souches cultivées sont ensemencés avec quelques paillettes d'une souche congelée à -80°C, puis sont incubés une nuit à 37°C. On procède ensuite à un isolement sur milieu gélosé M. H. contenant les antibiotiques de la souche à isoler. Une colonie est prélevée pour vérification par antibiogramme et sert à ensemencer un erlen de 20 cm³ de L. B. contenant les antibiotiques sélectifs et est incubé à 37°C sous agitation, la culture

bactérienne obtenue est récupérée et utilisée pendant sa phase exponentielle de croissance.

3.3-VERIFICATION DES SOUCHES PAR ANTIBIOGRAMMES.

Avant d'utiliser une souche bactérienne dans une expérience, ses différentes résistances aux antibiotiques sont vérifiées par antibiogramme.

Une colonie isolée est prélevée sur milieu gélosé M. H. sélectif et sert à ensemercer un tube de 10 cm³ de L. B., ce tube est ensuite mis à incuber 24 heures à 37°C et des dilutions de 10⁻¹ à 10⁻³ sont effectuées sur la suspension bactérienne ainsi obtenue.

Des boîtes de Pétri (Labo Express Service 2154) contenant du milieu M. H. gélosé sontensemencées par inondation avec les dilutions 10⁻² et 10⁻³, l'excédent du liquide est aspiré avec une pipette Pasteur. Les boîtes sont ensuite mises à sécher sur la paillasse pendant 30 minutes.

Les disques d'antibiotiques sont ensuite déposés (bioMérieux disques d'antibiotiques de : kanamycine 54281, acide nalidixique 54291, rifampicine 54571, triméthoprim 54902, chloramphénicol 54072, tétracycline 54882, streptomycine 54642) sur les boîtes ainsi préparées. Les boîtes sont mises à incuber pendant 24 heures à 37°C.

La lecture est réalisée par comparaison des diamètres d'inhibition de croissance avec l'échelle de lecture fournie par bioMérieux.

3.4-NUMERATIONS BACTERIENNES.

Trois types de numération bactériennes ont été effectuées.

3.4.1-Numération des bactéries totales par épifluorescence.

Cette technique est adaptée d'après les publications de KING & PARKER, 1988 et PORTER & FEIG (1980).

Le fluorochrome utilisé est le 4', 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI).

On procède à des dilutions de l'échantillon formolé par 50 μl de formol (Merck 4003) pour 1 cm^3 d'échantillon. Les dilutions sont réalisées dans une solution tampon stérile Tris-HCl (Tris-hydroxyméthyl-aminométhane : Sigma T1378 ; HCl : Merck 3192500) 0.1 M, pH 7.1 préalablement filtrée sur des filtres Analypore 0.22 μm (Osi A2902512), de façon à obtenir 10^6 à 10^7 bactéries pour 9 cm^3 .

Ensuite, 1 cm^3 de la solution mère de DAPI 25 $\mu\text{g cm}^{-3}$ (Sigma D1388) est ajoutée à 9 cm^3 d'échantillon dilué afin d'obtenir une concentration finale en DAPI de 2.5 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Après une agitation de quelques secondes au vortex, un temps de contact de 15 minutes est maintenu à température ambiante.

Un filtre noir en polycarbonate de porosité 0.2 μm (Millipore GTBP 04700) est déposé sur un support (Fiole à vide Millipore XX1004705), entonnoir de 300 cm^3 XX1004704, support filtre XX1004720) en orientant la face brillante vers le haut. Le support de filtre est préalablement humidifié en passant quelques cm^3 d'eau distillée stérile.

L'échantillon est filtré sous faible pression (trompe de Wurtz : Prolabo 09242005) avec le système de filtration précédemment préparé. La filtration est arrêtée dès le passage de la dernière goutte de façon à maintenir le filtre humide.

Le filtre est déposé sur une lame porte objet (Polylabo 961012950), une goutte d'huile à immersion (Leica 513787) est déposée sur la surface du filtre et on recouvre le tout d'une lamelle (Osi A1448220) sur laquelle une goutte d'huile à immersion est déposée.

Pour le dénombrement des bactéries fixées sur les pastilles de silicone lors des cinétiques d'adhésion, la pastille est déposée dans un tube contenant 4.5 cm^3 de Tris-HCl 0.1 M, pH 7.1 et 0.5 cm^3 de solution mère sont rajoutés, un temps de contact de 15 minutes est maintenu à température ambiante. La pastille de silicone est déposée

sur une lame porte objet et une goutte d'huile à immersion est déposée sur cette pastille.

Les bactéries sont ensuite dénombrées au microscope (Leitz Wetzlar) par épifluorescence sous lumière U. V. ($\lambda_{\text{excitation}} = 340 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} > 390 \text{ nm}$).

Trente champs microscopiques choisis au hasard sont dénombrés en déplaçant la platine du microscope de manière aléatoire. Le nombre des bactéries calculé sur trente champs est rapporté à la surface totale du filtre par un coefficient multiplicateur qui est fonction de l'objectif utilisé (ici objectif 100x).

3.4.2-Numération des Unités Formant Colonie.

Cette numération est réalisée sur milieu gélosé M. H ou milieu minimum M₉ gélosé.

Les antibiotiques sont ajoutés stérilement au milieu gélosé maintenu en surfusion à 60°C, les milieux gélosés avec ou sans antibiotiques sont coulés dans des boîtes de Pétri. Les échantillons à dénombrer sont dilués de 10 en 10 dans de l'eau physiologique stérile et 100 µl des dilutions choisies sont étalées sur la gélose à l'aide de billes de verre stériles que l'on retire après avoir agité les boîtes.

Les géloses ainsiensemencées sont mises à l'étuve à 37°C pendant 24 (pour les milieux M. H. gélosés) à 72 heures (pour les milieux minimum M₉ gélosés). Après cette incubation, les UFC sont comptées et peuvent être ramenées en UFC cm⁻² pour les bactéries décrochées des billes de verre.

3.4.3-Mesure de l'absorbance.

L'absorbance est une mesure de la turbidité d'une suspension bactérienne, elle est proportionnelle au volume et au nombre de bactéries en présence.

Des mesures de l'absorbance à 620 nm sur trois prélèvements de l'effluent des réacteurs sont réalisées au spectrophotomètre (Uvikon 810) dans des cuves en

plastique de 1 cm de trajet optique (Polylabo 12152) contre un témoin préparé par filtration de la suspension sur filtre 0.22 μm Analytore (Osi A2902512).

L'absorbance lors du test 'Bacterial Adherence to Hydrocarbons' (BATH) est mesurée, à 400 nm.

3.5-TRANSFERTS GENETIQUES AU SEIN DE BIOFILMS BACTERIENS.

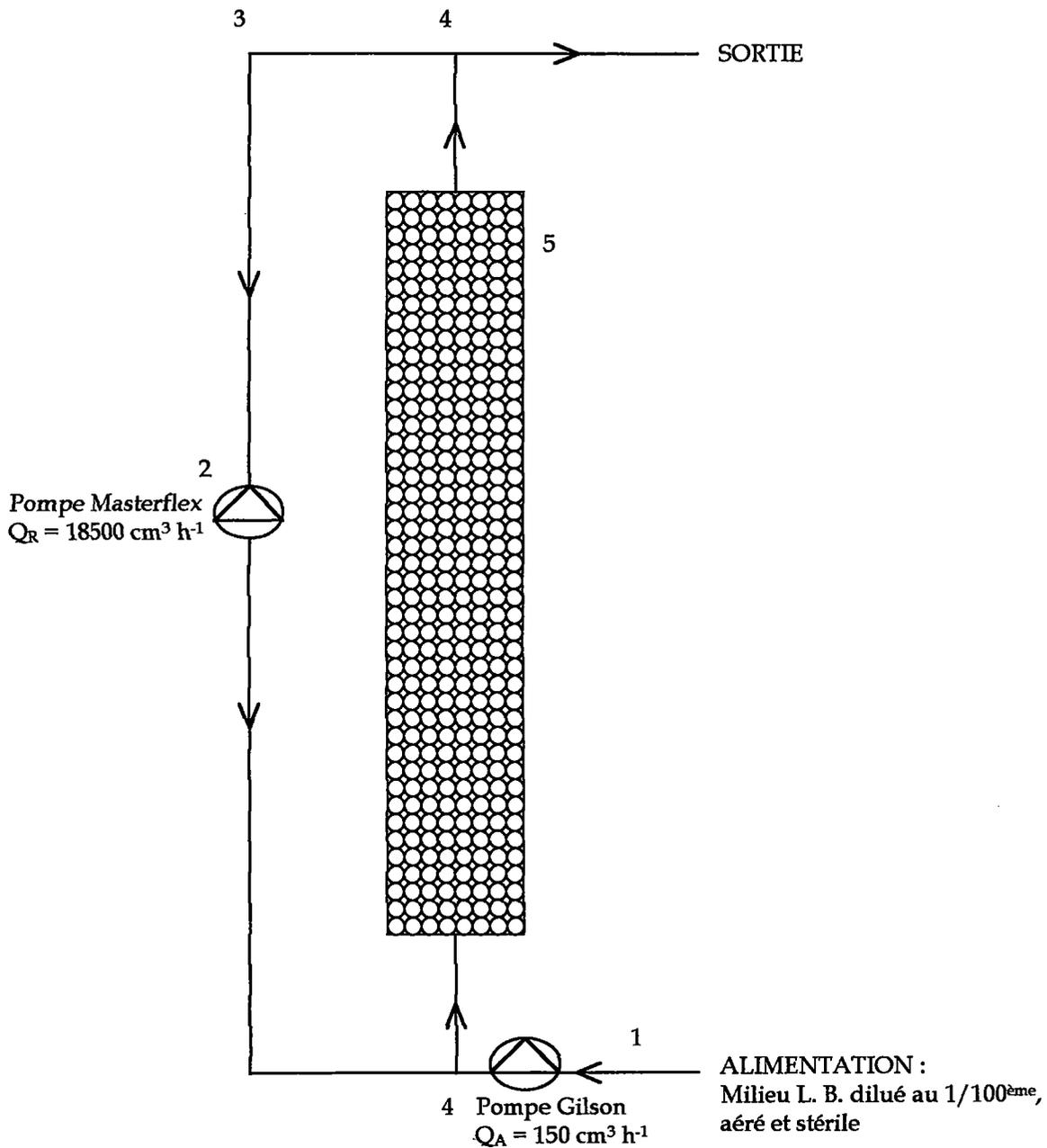
3.5.1-Le réacteur à lit fixe.

Le réacteur présenté en figure 6 est constitué d'une colonne de verre de 20 cm, fabriquée sur mesure, dont les extrémités sont fermées par deux bouchons en caoutchouc percés (Osi A7505139) dans lesquels on a introduit un tube de verre. Des billes de verre parfaitement calibrées de 3.9 ± 0.2 mm de diamètre, de masse 0.08 ± 0.03 g, de surface 47.6 ± 1.5 mm² (Descharmes) introduites dans cette colonne nous servent de matériau support pour la fixation des bactéries.

Connaissant le poids total des billes introduites dans la colonne, on peut calculer la surface colonisable (2450 cm²) ainsi que le volume interstitiel (140 cm³) qui est égal à la différence entre le volume total de la colonne (300 cm³) et le volume occupé par les billes (160 cm³).

Huit litres et demi de milieu nutritif L. B. stérile dilué au 1/100^{ème} dans un ballon de dix litres servent à l'alimentation du réacteur, ce ballon est plongé dans un bac contenant de l'eau thermostatée par un polystat réglé sur 30°C de manière à obtenir une température de 25°C au sein de la colonne. Le milieu est aéré par un système de bullage et il est amené au réacteur par une pompe péristaltique minipuls 2 (Gilson E17342HP4) fonctionnant avec une vitesse $Q_A = D \times V = 150$ cm³ par heure (D étant le taux de dilution : 1.1 h⁻¹ et V le volume interstitiel : 140 cm³) telle que $D > \mu_{\text{max}}$ (μ_{max} étant le taux de croissance maximum). Le circuit de recyclage est assuré par une pompe Masterflex (Bioblock H87948) avec une vitesse Q_R très supérieure à la

Figure 6 : Schéma du réacteur à lit fixe.



- 1 : tube Manifold en silicone, double butée de diamètre interne 0.279 cm (Bioblock H31483) qui est connecté à la pompe Gilson.
- 2 : tuyau en silicone de diamètre interne 0.31 cm (Bioblock H67029) qui est connecté à la pompe Masterflex.
- 3 : Tuyau en silicone de diamètre interne 0.279 cm (Bioblock H31671), il compose le reste du circuit.
- 4 : Raccords en Y en polypropylène de diamètre externe 4 à 6 mm (Bioblock A50176).
- 5 : Colonne de verre contenant des billes de verre de 4 mm de diamètre.

vitesse d'alimentation Q_A afin d'avoir une répartition homogène des nutriments au sein de la colonne ($Q_R = 18500 \text{ cm}^3$ par heure).

Le montage comprend également différents types de tuyaux dont les références et la localisation sont indiquées sur la figure 6.

La colonne contenant les billes de verre est stérilisée durant deux heures à 170°C au four Pasteur alors que les tuyaux et les bouchons en caoutchouc sont autoclavés à 121°C pendant 20 minutes.

L'ensemencement de la colonne par les réceptrices se fait de la façon suivante : une culture en phase exponentielle de croissance est centrifugée 15 minutes à 5000g et à température ambiante, le culot est repris dans du milieu L. B. dilué au $1/100^{\text{ème}}$ de manière à avoir une absorbance à 620 nm d'environ 0.6. Pour les dix souches isolées des boues, à partir des suspensions ainsi obtenues un mélange constitué de volumes égaux de chacune des suspensions est préparé. L'injection de la suspension bactérienne ainsi obtenue se fait par le circuit de recyclage qui fonctionne seul pendant 5 heures de manière à ce que les bactéries puissent se fixer sur les billes de verre. Ensuite, l'alimentation est mise en route avec le circuit de recyclage maintenu.

3.5.2-Décrochage des bactéries fixées.

L'alimentation du réacteur à lit fixe est arrêtée, le liquide interstitiel est éliminé par le bas de la colonne. Neuf prélèvements de matériau support (billes de verre) sont effectués sur toute la hauteur de la colonne en la divisant en trois parties fictives Haut - Milieu - Bas. Les billes récupérées sont ensuite immergées dans de l'eau physiologique stérile, elles sont soumises à des ultrasons délivrés par une sonde plongeante (Bioblock H72441) réglée sur une puissance de 120 Watts à 80% de cycles actifs pendant 30 secondes ou par une agitation au "vortex" de 30 secondes. Le surnageant est récupéré pour faire des dénombrements d'Unités Formant Colonie (UFC) sur milieux sélectifs gélosés M. H. pour les souches *E. coli* ou sur milieux

sélectifs gélosés M₉ + lactose pour les souches des boues, ainsi que des comptages par épifluorescence au DAPI.

3.5.3-Etude des transferts génétiques au sein de biofilms.

Dans un premier temps, un biofilm est formé uniquement de bactéries réceptrices. La mise à l'équilibre de ce biofilm est estimée par des mesures quotidiennes de l'absorbance à 620 nm et des comptages bactériens en épifluorescence effectuées sur l'effluent en sortie de réacteur.

Lorsque le biofilm de bactéries réceptrices est estimé à l'équilibre (5 jours) sur la base d'un dénombrement des bactéries dans l'effluent du réacteur, les bactéries donatrices en phase exponentielle de croissance sont introduites dans le rapport approximatif de 1 donatrice pour 10 réceptrices présentes dans le biofilm.

Lors de l'introduction des donatrices dans le réacteur, la colonne est vidée du liquide interstitiel pour être remplie par la suspension de bactéries donatrices. Le réacteur fonctionne ensuite en système "batch" sans apport extérieur de nutriments pendant 5 heures, mais avec le circuit de recyclage connecté pour assurer une répartition homogène des micro-organismes dans le réacteur.

L'apparition des transconjugants est évaluée quotidiennement sur des prélèvements effectués en sortie du réacteur par numération d'Unités Formant Colonie (UFC), apparues sur milieux sélectifs M. H. gélosés en 24 heures à 37°C pour les transferts *E. coli* - *E. coli* et sur milieux sélectifs M₉ + lactose gélosés en 48 heures à température ambiante pour les transferts *E. coli* - souches des boues. Les bactéries donatrices et réceptrices sont également évaluées chaque jour par dénombrement des UFC sur milieux sélectifs M. H. gélosés pour les souches *E. coli* et sur milieux sélectifs M₉ + lactose pour les souches des boues.

Après avoir atteint un équilibre apparent du biofilm mixte : donatrices - réceptrices, l'alimentation du réacteur est arrêtée et les bactéries sont décrochées et dénombrées comme indiqué précédemment (3.5.2).

Lors de chaque expérience réalisée au moins en triplicat, des réacteurs témoins ne contenant que la souche donatrice ou la souche réceptrice seule ont été conduits en parallèle pour réaliser un témoin des transconjugants formés sur boîtes de Pétri sélectives des transconjugants pendant leur incubation. Les valeurs obtenues dans ce témoin sont déduites de celles obtenues au sein des biofilms. Lorsque les densités de transconjugants dénombrés dans les 2 cas étaient du même ordre de grandeur, le nombre de transconjugants n'a pas été pris en compte.

Après avoir dénombré les UFC des différentes souches bactériennes présentes au sein des biofilms mixtes, les caractères génétiques des transconjugants ont été vérifiés ainsi que la stabilité plasmidique des bactéries donatrices (3.13).

3.6-TRANSFERTS GENETIQUES AU SEIN DE REACTEURS "BATCH-SEQUENCES".

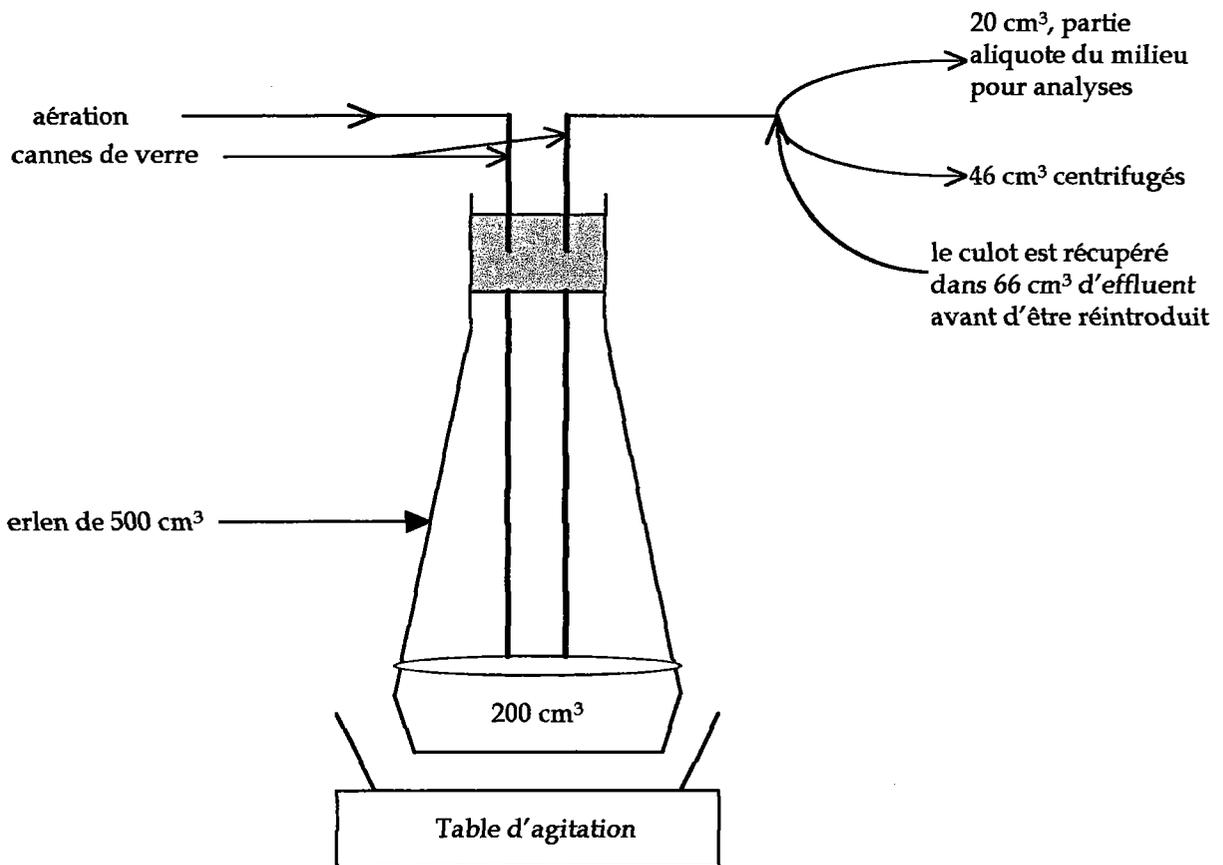
Cette partie concernant les réacteurs "batch-séquencés" a été réalisée en collaboration avec Anne-Marie SIMAO-BEAUNOIR.

3.6.1-Description des réacteurs "batch-séquencés" avec recyclage de biomasse.

La figure 7 représente un réacteur "batch" de 200 cm³ à alimentation séquencée réalisé dans un erlen de 500 cm³. L'effluent synthétique utilisé est détaillé dans la partie "milieux de culture" (3.2). L'eau utilisée provient du réseau de distribution d'eau potable de la ville de Metz (France) dont la demande chimique en oxygène (DCO) est de 14 ± 1 ppm (mesurée à l'aide du système μ DCO, Merck : bloc chauffant 14727, tubes pour DCO : 14540 et 14541). La DCO totale de l'effluent est donc d'environ 1046 ppm. Ce qui nous donne un rapport DCO/N/P équivalent à 200/7.1/1.

Chaque jour, 20 cm³ de milieu contenant la biomasse en suspension sont prélevés pour analyse de la population bactérienne par microscopie en

Figure 7 : Schéma du réacteur "batch-séquencé".



épifluorescence au DAPI et mesure de la DCO, 46 cm³ de milieu restant sont centrifugés à 8000g pendant 15 minutes. Après élimination du surnageant, la biomasse récupérée au niveau des culots est remise en suspension dans 66 cm³ d'effluent neuf.

Dans ces conditions, le temps de rétention hydraulique est de 3 jours et l'âge des boues de 10 jours. La durée d'une expérience correspond à 2 fois l'âge des boues, soit 20 jours. Les expériences ont lieu à 25°C comme pour le microcosme biofilm et les réacteurs sont agités en permanence.

3.6.2-Transferts génétiques dans le réacteur "batch-séquéncé".

L'ensemencement du réacteur par les réceptrices est réalisé de la façon suivante : une culture en phase exponentielle de croissance ayant une absorbance à 620 nm d'environ 0.6 est réalisée pour les dix souches isolées des boues. A partir des cultures ainsi obtenues un mélange constitué de volumes égaux de chacune des suspensions est préparé.

Les bactéries réceptrices sont introduites dans le réacteur avec 66 cm³ d'effluent et de l'eau du robinet préalablement autoclavée en quantité suffisante pour 200 cm³. Ce microcosme "boues activées" est tout d'abord amené à l'équilibre en suivant quotidiennement la DCO et le dénombrement des bactéries totales par épifluorescence au DAPI, avant l'introduction des donatrices.

Les souches donatrices en phase exponentielle de croissance sont introduites dans le microcosme avec un rapport de 1 donatrice pour 10 réceptrices (évalué par épifluorescence au DAPI), elles sont mises en suspension dans l'effluent au moment du renouvellement de celui-ci.

Les paramètres suivis au niveau du réacteur sont : la DCO résiduelle - les bactéries totales par épifluorescence au DAPI - les Unités Formant Colonie (UFC) totales, les UFC de réceptrices, les UFC de donatrices, les UFC de transconjugants - la température est de 25.5 ± 2.0 °C - le pH est de 7.5.

Pour chacune des expériences de transfert réalisée en duplicat, un réacteur de donatrices et un réacteur de réceptrice sont maintenus en parallèle aux réacteurs tests pour l'estimation des transconjugants susceptibles de se former sur les boîtes de milieux sélectifs servant au dénombrement des transconjugants.

Après avoir dénombré les UFC des différentes souches bactériennes présentes au sein du réacteur "batch-séquence", les caractères génétiques des transconjugants sont vérifiés (3.13).

3.7-TRANSFERTS GENETIQUES SUR BOITES DE PETRI.

Le transfert du plasmide pCE328 (*oriT*⁻) a été étudiée comparativement à celui du plasmide mobilisable pCE325 (*oriT*⁺) dans trois contextes différents présentés dans le tableau 2.

Les transferts sont réalisés sur milieu L. B. gélosé : 1 cm³ de bactéries réceptrices, 0.1 cm³ de bactéries donatrices avec ou sans 0.1 cm³ de boues activées sont centrifugés à 8000g pendant 10 minutes à 4°C, le culot est récupéré dans 50 µl d'eau physiologique qui sont déposés sur un filtre 0.22 µm (Gelman sciences 66234) préalablement déposé sur une boîte de milieu L. B. gélosé. Les boîtes sont ensuite incubées 12 heures à 25°C.

Après cette incubation, le filtre est récupéré dans de l'eau physiologique et les bactéries sont décrochées par agitation au "vortex". On procède ensuite à des dilutions dans de l'eau physiologique, puis à des étalements sur milieux M. H. gélosés sélectifs des bactéries : donatrices (24 heures à 37°C), réceptrices (24 heures à 37°C) et des transconjugants (48 heures à 25°C et 37°C).

Tableau 2: Caractéristiques des trois contextes de transfert de plasmides recombinants étudiés sur boîtes de Pétri.

Contextes de transfert	Éléments Mobilisateurs		Souches Donatrices		Souche Réceptrice
	Plasmides R388 et pUB2380 dans la réceptrice	Boues activées	Transfert de pCE325	Transfert de pCE328	
1	+	-	<i>E. coli</i> K-12	<i>E. coli</i> K-12	<i>E. coli</i> K-12
2	-	+	UB1832	UB1832	UB281 : <i>luxAB</i>
3	+	+	(pCE325)	(pCE328)	

3.8-EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE.

L'extraction d'ADN plasmidique par la technique dite de "miniprep" est décrite avec précision par SAMBROOK *et al.*, 1989. Elle consiste à faire une lyse alcaline sur des cellules bactériennes, une extraction au phénol chloroforme suivies d'une précipitation de l'ADN à l'éthanol.

Un dosage de l'ADN plasmidique est réalisé au spectrophotomètre (Uvikon 810) en mesurant l'absorbance à 260 nm dans des microcuvettes en quartz de 1 cm de trajet optique : 5 µl d'ADN extrait + 195 µl d'eau Milli-Q et en utilisant la relation suivante : 1 unité d'absorbance à 260 nm correspond à 50 µg d'ADN plasmidique par cm³ dans la solution de départ.

3.9-ELECTROPHORESE DE L'ADN.

Un gel d'agarose (Sigma A9539) à 0.7% dans du tampon Tris Borate EDTA (TBE : Sigma T64000) est utilisé pour la séparation et l'observation des plasmides extraits par "miniprep", il contient du bromure d'éthidium (BET : Sigma E7637) à 10 µg par litre.

Les dépôts d'ADN (35 µl) sont effectués après ajout de tampon de charge 5x concentré (Bleu de bromophénol : 30 mg, glycérol : 6.25 cm³, EDTA 0.05 mM pH 8.0 : 6.25 cm³, N-Lauryl Sarkosyl : 500 mg et de l'eau Milli-Q en quantité suffisante pour 25 cm³).

La migration est réalisée sous une tension de 125 Volts et un ampérage de 100 mA.

L'ADN du bactériophage Lambda digéré par *Hind* III et *Eco* RI (Sigma D-3398) et une échelle de 100 paires de bases (Pharmacia Biotech 2740) sont utilisés comme marqueurs de taille.

3.10-MARQUAGE DE LA SONDE "tk-vacc".

Dans un premier temps, les plasmides pCE325 ou pCE328 contenant le fragment "tk-vacc" sont extraits par miniprep., digérés par les enzymes de restriction *Hind* III et *Sal* I, puis après migration électrophorétique, la bande de 880 pb correspondant au gène "tk-vacc" est découpée à l'aide d'un scalpel stérile. Ensuite, l'extraction de cette bande d'ADN du gel d'agarose par "GeneClean" (Bio101 1001-400) est effectuée suivant le protocole du fabricant.

La purification de l'ADN par "GeneClean" consiste à solubiliser la bande d'agarose dans une solution d'iodure de sodium. L'ADN ainsi élué est adsorbé sur de la silice pulvérisée, lavé puis élué de la silice par un tampon Tris-EDTA à 55°C.

Le fragment d'ADN ainsi récupéré est marqué avec un marqueur froid la digoxygénine selon le protocole du kit de détection et de marquage de l'ADN (Boehringer Mannheim 1093657).

3.11-HYBRIDATION.

L'hybridation s'effectue soit à partir d'empreinte de colonies sur membrane nylon (N+Hybond), soit à partir de "Southern-blot".

- Hybridation sur colonies ("colony-blot") : les colonies bactériennes isolées sont repiquées sur gélose nutritive M. H. et une membrane de nylon N+Hybond (Amersham RPN 82B) est placée sur chaque boîte pour obtenir une empreinte des colonies.

Les colonies fixées sur la membrane nylon sont ensuite lysées avec une solution dénaturante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) pendant 7 minutes.

La membrane est alors trempée dans une solution neutralisante (Tris HCl 0.5 M pH 7.2, EDTA 0.001 M, NaCl 1.5 M) 3 minutes, puis rincée avec du citrate de sodium 2x concentré (SSC 20x : Sigma S6639).

L'ADN est alors fixé avec du NaOH 0.4 M pendant 20 minutes et les membranes sont rincées avec du SSC 5x.

- “Southern blot” après migration sur gel des extraits plasmidiques: les bandes d'ADN plasmidique obtenues sur gel d'agarose sont transférées sur membrane de nylon Zeta probe (Biorad 162-0196) par la technique du “Southern-blot”.

Ce transfert d'ADN est réalisé par transfert semi-sec (Biorad 170-3949), en suivant le protocole du fabricant :

Deux pièces de papier Extra Thick Blot (Biorad 170-3949) sont saturées avec du tampon TBE 0.5x (Sigma T64000), la membrane de nylon est équilibrée avec ce tampon TBE 0.5x pendant 10 minutes et l'assemblage suivant est réalisé : une membrane de papier Extra Thick Blot saturée en TBE 0.5x est déposée sur l'appareil de transfert et les bulles d'air sont éliminées à l'aide d'une pipette.

Ensuite la membrane de nylon équilibrée est déposée sur le papier et les bulles d'air sont également éliminées.

Le gel d'agarose contenant l'ADN plasmidique préalablement incubé dans du tampon TBE 0.5x est déposé sur cette membrane face au-dessus et les bulles d'air sont éliminées.

Enfin le deuxième papier Extra Thick Blot saturé est déposé sur le gel, les bulles d'air sont éliminées et environ 15 cm³ de tampon TBE 0.5x sont ajoutés pour re-saturer le sandwich.

L'appareil est mis en route en suivant les indications données par le fabricant et une fois le transfert terminé (10 minutes), la membrane de nylon contenant l'ADN est récupérée et l'ADN est fixé par du NaOH 0.4 N durant 5 minutes.

La membrane est ensuite rincée dans du SSC 2x et chauffée 30 minutes à 80°C.

Pour les “colony-blot” et les “Southern-blot”, l'hybridation et la révélation sont réalisées sur les membranes de nylon. Toutes les étapes de ce protocole sont précisément décrites dans le kit de détection et de marquage de l'ADN (Boehringer Mannheim 1093657) et ont été réalisées selon les instructions du fabricant.

On procède tout d'abord à une préhybridation de deux heures à 68°C avec un réactif bloquant, qui a pour but de bloquer les sites non spécifiques, puis à une hybridation de six heures à 68°C durant laquelle la sonde spécifique, marquée à la digoxygénine reconnaît les séquences complémentaires et une révélation par détection immunologique.

La révélation correspond à une réaction colorimétrique, elle utilise la reconnaissance d'anticorps anti-digoxygénine couplés à la phosphatase alcaline qui est dosée par l'addition de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate et de chlorure de 4-Nitrobleu tetrazolium.

3.12-AMPLIFICATION DE L'ADN PAR PCR (Polymerase Chain Reaction).

La PCR a l'avantage de générer une grande quantité d'ADN dont la séquence nucléotidique est comprise entre deux amorces spécifiques. Cette technique nous a servi à reconnaître une séquence spécifique portée par les plasmides pCE325, pCE328 et R388. Cette identification nécessite l'absence d'ADN contaminant et la spécificité des amorces utilisées. Le protocole utilisé est le suivant :

Une extraction plasmidique est réalisée à partir de clones à vérifier et l'ADN est récupéré dans 10 µl d'eau Milli-Q stérile. On procède ensuite au mélange pour la PCR, qui comprend par tube de PCR :

-10 µl de tampon d'amplification 10x (KCl 500 mM, Tris HCl 100 mM, MgCl₂ 15 mM et gélatine 0.1%).

-10 µl de dNTP (0.2 mM de chaque dNTP dans le mélange PCR).

-5 µl d'amorce 1 (60 pmoles).

-5 µl d'amorce 2 (60 pmoles).

Ce mélange réactionnel est irradié 5 minutes sous U. V.

-0.5 µl de Taq polymérase (Appligène 120181).

-de l'eau Milli-Q irradiée stérile en quantité suffisante pour 90 µl.

-10 µl de l'ADN à tester ou 10 µl d'eau Milli-Q irradiée stérile pour le témoin de non contamination.

La suite du protocole consiste à lancer le programme PCR, dépendant des amorces utilisées et à faire une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (FMC 50092) pour vérifier les produits de la PCR.

Les amorces et les programmes utilisés sont les suivants :

- Pour les plasmides pCE325 et pCE328, les amorces correspondent à un fragment de 250 paires de bases du gène de la thymidine kinase du virus de la vaccine et ont les séquences suivantes :

amorce 232 : 5'-ATGTTTGACAGCTTATCATC-3'

amorce 210 : 5'-TTCTTATCATGCGTCCATAG-3'

Le programme utilisé comprend :

- 1 cycle : 5 minutes à 94°C, 2 minutes à 49°C et 3 minutes à 72°C.
- 35 cycles : 1 minute à 94°C, 2 minutes à 49°C et 3 minutes à 72°C.
- 1 cycle : 1 minute à 94°C, 2 minutes à 49°C, 10 minutes à 72°C.
- puis 24 heures à 4°C.

- Pour le plasmide R388, les amorces correspondent à un fragment de 137 paires de bases du gène de l'hydrofolate réductase et ont les séquences suivantes :

amorce 211 : 5'-GTTGTGCTGGTGCTTTCTAG-3'

amorce 212 : 5'-CAAACCTGCCCTGCAACGGGA-3'

Le programme utilisé comprend :

- 1 cycle : 5 minutes à 94°C, 2 minutes à 55°C et 3 minutes à 72°C.
- 35 cycles : 1 minute à 94°C, 2 minutes à 55°C et 3 minutes à 72°C.

- 1 cycle : 1 minute à 94°C, 2 minutes à 55°C, 10 minutes à 72°C.
- puis 24 heures à 4°C.

3.13-VERIFICATION DES TRANSCONJUGANTS ET DE LA STABILITE DES DONATRICES.

Cette vérification est effectuée pour les donatrices et tous les transconjugants obtenus lors des transferts au sein de biofilms, au sein de réacteur "batch-séquencés" et sur boîtes de Pétri :

Après deux isolements successifs sur milieu sélectif correspondant au transconjugant ou à la donatrice étudié, la vérification des phénotypes des clones de transconjugants ou de donatrices ainsi obtenus est réalisée par repiquage sur milieux M. H. contenant chacun sur une boîte un des différents antibiotiques spécifiques des clones à vérifier.

Les transconjugants obtenus dans les transferts *E. coli* - souches des boues au sein des biofilms et au sein des réacteurs "batch-séquencés" sont vérifiés par amplification par PCR (voir partie 3.12).

Les transconjugants obtenus dans les transferts sur boîtes de Pétri sont en plus vérifiés pour leur phénotype *xyl* - sur milieu Mac Conkey gélosé et pour l'expression des gènes *luxAB* dans l'opéron xylose par mesure de production de lumière. Cette mesure est effectuée d'après GUZZO & DUBOW (1991). Les clones sont déposés à l'aide de cures dents sur milieu gélosé L. B. (12.5 cm³) + xylose. Les boîtes sont retournées et 50 µl de décanal (Merck 4003) sont ajoutés dans le couvercle. La lumière est mesurée par des films rayon X AGFA CURIX RP1 déposés sur le fond de la boîte à l'obscurité (sous lumière rouge). Les films sont développés après 5 minutes d'exposition. Ces clones sont aussi vérifiés par hybridation sur colonies et sur "Southern blot" des extraits plasmidiques (voir partie 3.11) avec la sonde "tk-vacc".

3.14-MESURE DU TAUX DE CROISSANCE MAXIMUM.

Le milieu L. B. est préparé selon les concentrations suivantes : 1.5 - 1 - 1/5 - 1/10. A chaque concentration (50 cm³ en volume final) est rajouté stérilement 1 cm³ de culture bactérienne, puis ces suspensions sont incubées à 25°C sous agitation.

L'absorbance à 620 nm est mesurée au cours du temps afin de suivre la croissance des bactéries.

Les équations des droites obtenues en traçant le logarithme népérien du nombre de bactéries en fonction du temps, pendant la phase exponentielle de croissance permettent de déduire le taux de croissance μ (h⁻¹) correspondant à chaque dilution préparée en triplicat.

Le taux de croissance maximum (μ_{\max}) est évalué par l'ordonnée à l'origine à partir des équations de droites obtenues par le graphe en double inverse : $1/\mu = f$ (1/concentration en L. B.).

3.15-LE TEST DE 'BACTERIAL ADHERENCE TO HYDROCARBONS' : BATH.

La méthode du test BATH est basée sur la partition cellulaire des bactéries à l'interface d'un système biphasique comprenant une phase organique (l'hydrocarbure) et une phase aqueuse (la suspension bactérienne) après un bref mélange.

L'hydrophobicité est déterminée par une diminution de l'absorbance de la phase aqueuse ou par le dénombrement des bactéries adhérentes à la phase hydrocarbure supérieure ou encore le dénombrement des bactéries hydrophiles non adhérentes restées dans la phase aqueuse inférieure. Nous avons choisi d'étudier la diminution de l'absorbance à 400 nm de la phase aqueuse et d'utiliser comme hydrocarbure : l'hexadécane (Merck 0281054).

Ce test est réalisé selon le protocole décrit par ROSENBERG *et al.* (1980) :

Il est réalisé sur des cultures en phase exponentielle de croissance. 20 cm³ de culture sont centrifugés 15 minutes à 8000g, le surnageant est éliminé puis le culot est récupéré dans du L. B. dilué au 1/100 de manière à avoir une absorbance d'environ 1 à une longueur d'onde de 400 nm.

3 cm³ de la suspension obtenue précédemment sont introduits dans des tubes de verre de 16 cm de hauteur et de 15 mm de diamètre (ayant préalablement trempés une nuit dans de l'acide chlorhydrique 1 %, rincés 10 fois à l'eau du robinet, puis 10 fois à l'eau Milli-Q, afin d'éviter que l'hexadécane n'attache sur la paroi du tube). Chaque tube est préparé en triplicat : 3 tubes témoins et 3 tubes tests.

Différentes quantités d'hexadécane : 0 - 200 - 350 - 500 - 650 - 1500 µl sont testées et rajoutées chacune dans trois tubes tests. Les deux phases sont laissées en contact pendant 10 minutes à 30°C, puis les tubes sont agités au "vortex" 1 minute, puis laissés 15 minutes au repos.

Lorsque les deux phases : organique supérieure et aqueuse inférieure sont nettement séparées, 2 cm³ de la phase aqueuse sont prélevés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et l'absorbance à 400 nm est mesurée dans des cuves de verre de 10 mm de trajet optique contre le témoin suivant : phase aqueuse du mélange LB 1/100 + hexadécane sans bactéries (1 témoin est réalisé pour chaque concentration en hexadécane).

La mesure d'absorbance à 400 nm du test sans hexadécane est déduite des mesures d'absorbance en présence d'hexadécane et cette différence est proportionnelle à l'hydrophobicité des souches testées.

3.16-AMPLIFICATION D'ADN PLASMIDIQUE.

L'amplification du plasmide pCE328 est effectuée selon le protocole de FRENKEL & BREMER (1986), en rajoutant de la spectinomycine (Sigma S9007) à une concentration finale de 300 µg cm⁻³ quand l'absorbance à 620 nm de la culture de la souche contenant le plasmide à amplifier est de 0.4. On laisse ainsi agir la spectinomycine pendant 4 heures sous agitation à 37°C. La souche dont le plasmide

pCE328 est ainsi amplifié est ensuite testée pour son adhésion sur pastilles de silicone.

3.17-INHIBITION METABOLIQUE.

L'inhibition métabolique est réalisée selon le protocole de DOYLE *et al.* (1980). L'inhibiteur métabolique utilisé est le NN' dicyclohexylcarbodiimide (DCCD, Merck 802954), c'est un inhibiteur de l'activité ATPasique. Il est rajouté à une concentration finale de 100 μ M pendant la phase exponentielle de croissance, on le laisse agir pendant 10 minutes sur table d'agitation. On procède ensuite à la cinétique d'adhésion sur pastilles de silicone de la souche ainsi traitée.

3.18-TRANSFORMATION DES SOUCHES.

Les cellules d'*E. coli* ne sont pas normalement compétentes. La pénétration de l'ADN est rendue possible par le traitement des cellules au chlorure de calcium et est obtenue au cours d'un bref choc thermique ultérieur.

La transformation est réalisée de la manière suivante :

Une culture bactérienne de la souche à tester est amenée jusqu'à une absorbance d'environ 0,4 à 620 nm.

Ensuite, 10 cm³ de suspension bactérienne à une absorbance de 0,4 à 620 nm sont centrifugés à 5000 tours par minute pendant 10 minutes à 4°C.

Le culot est repris dans 10 cm³ de chlorure de calcium (CaCl₂) 0,1 M froid (pour 10 cm³ de culture) et laissé sur glace pendant 30 minutes.

Les bactéries sont centrifugées 10 minutes à 5000 tours par minute à 4°C et le culot est délicatement repris dans 500 μ l de CaCl₂ 0,1 M froid.

Les bactéries compétentes : 100 µl sont mises dans des tubes à hémolyse stériles avec 5 µl d'ADN plasmidique préalablement chauffés 10 minutes à 65°C et centrifugés, en prenant soin de mettre en contact l'ADN et les bactéries.

Le tout est laissé sur glace durant 1 heure, puis le tube est incubé 5 minutes à 37°C.

Ensuite, 5 cm³ de milieu de culture (L. B.) sans antibiotique sont ajoutés et les bactéries sont incubées 45 minutes à 37°C avec agitation.

Ces tubes sont centrifugés 5 minutes à 5000 tours par minute et le culot est resuspendu dans 100 µl de milieu L. B.

Le mélange de transformation : 10 µl (+90 µl de milieu L. B.) et 90 µl (+ 10 µl de milieu L. B.) est étalé sur boîtes de Pétri contenant du milieu gélosé MH et les antibiotiques spécifiques des souches transformées. Les boîtes sont incubées une nuit à 37 °C.

Quelques-unes des bactéries transformées obtenues sont isolées sur MH contenant les antibiotiques spécifiques des colonies transformées.

Ces colonies sont ensuite vérifiées par antibiogramme, par migration électrophorétique sur gel d'agarose des extraits plasmidiques et par amplification par PCR avec les amorces spécifiques des plasmides contenus dans les souches transformées.

Après vérification, les souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) transformées par le plasmide pCE325 ou pCE328 sont testées pour leur adhésion sur pastilles de silicone.

3.19-CURAGE DES SOUCHES.

L'élimination des plasmides est réalisée suivant le protocole de MERGEAY *et al.*, 1985.

Les souches contenant les plasmides à éliminer sont mises en culture à partir de suspensions bactériennes en phase exponentielle de croissance dans des milieux L. B. contenant du bromure d'éthidium (BET) à différentes concentrations : 800 µg

cm^{-3} - $400 \mu\text{g cm}^{-3}$ - $200 \mu\text{g cm}^{-3}$ - $100 \mu\text{g cm}^{-3}$ - $50 \mu\text{g cm}^{-3}$ - $25 \mu\text{g cm}^{-3}$ - $12.5 \mu\text{g cm}^{-3}$ - $6.2 \mu\text{g cm}^{-3}$ - $3.1 \mu\text{g cm}^{-3}$ - $1.5 \mu\text{g cm}^{-3}$.

Elles sont mises à incuber 5 jours à 37°C .

La culture où les bactéries ont poussé et contenant la plus forte concentration en BET, ainsi que la culture contenant la plus faible concentration en BET où les bactéries ne poussent pas, sont récupérés.

Les bactéries sont lavées par centrifugation à $8000g$ 15 minutes à 4°C , élimination du surnageant et récupération du culot dans de l'eau physiologique.

Des dilutions dans l'eau physiologique sont réalisées, les bactéries sontensemencées sur milieux gélosés M. H. et les boîtes de Pétri sont incubées 24 heures à 37°C .

Ces colonies sont ensuite vérifiées par antibiogramme, par migration électrophorétique sur gel d'agarose des extraits plasmidiques et par amplification par PCR avec les amorces spécifiques des plasmides contenus dans les souches curées.

Après vérification, les souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) curées pour les plasmides pCE sont testées pour leur adhésion sur pastilles de silicone.

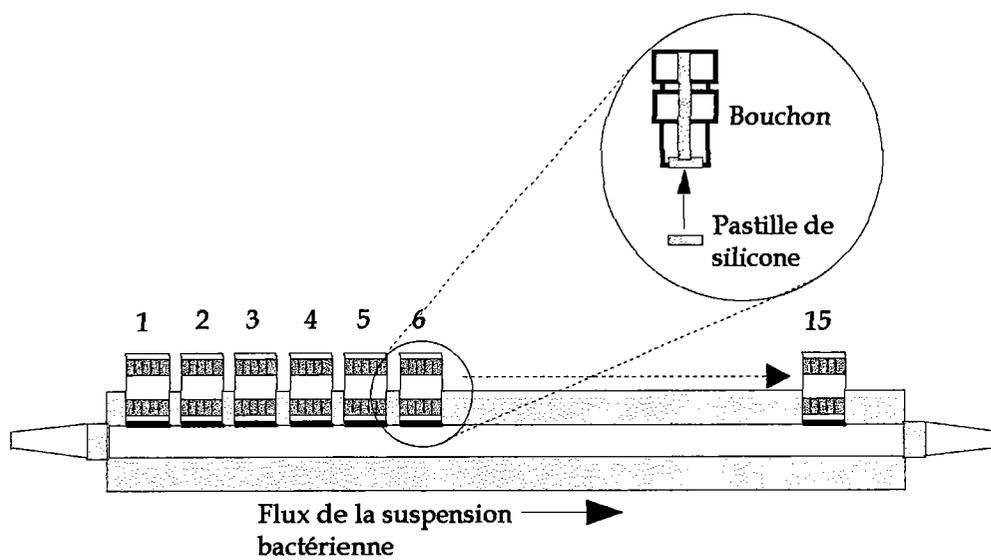
3.20-ADHESION BACTERIENNE SUR PASTILLES DE SILICONE.

3.20.1-Le réacteur.

Le réacteur présenté en figure 8 est constitué d'une colonne en altuglass de 38.5 cm de longueur, 5.5 cm de largeur et 3.1 cm d'épaisseur. Le volume de la colonne est de : $68 \text{ cm}^3 \pm 1 \text{ cm}^3$. Les dimensions interne du réacteur étant les suivantes : 35.5 cm de longueur, 2.8 cm de largeur et 0.7 cm d'épaisseur. A la surface du réacteur, se trouvent 15 trous dans lesquels des bouchons sont insérés.

Les bouchons ont une hauteur de 2.8 cm et un diamètre externe de $1.1 \pm 0.1 \text{ cm}$. A l'intérieur de ces bouchons sont placées des pastilles de silicone amovibles de $8.1 \pm 0.1 \text{ mm}$ de diamètre et de $2 \pm 0.1 \text{ mm}$ d'épaisseur. Ces pastilles sont placées de

Figure 8: Schéma du réacteur utilisé pour les tests d'adhésion (BRYERS & CHARACKLIS, 1992).



manière à ce que la face brillante soit directement en contact avec la suspension bactérienne.

3.20.2-Préparation des pastilles (de silicone) et des réacteurs.

Les pastilles où vont se fixer les bactéries sont immergées dans du dodécylsulfate de sodium (SDS, Sigma L-4390) à 1 % filtré sur 0,22 µm (Millipore SLGV02535) puis, elles sont passées au "vortex" durant 1 minutes. Les pastilles subissent ainsi 5 bains successifs dans du SDS 1% filtré sur 0.22 µm avec un passage un au "vortex" de 1 minute entre chaque bain. Elles sont ensuite lavées avec de l'eau Milli-Q avec passage de 1 minute au "vortex". Et enfin elles sont stérilisées par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

La colonne est lavée pendant une nuit avec de l'eau Milli-Q filtrée stérile sous un circuit ouvert avec une pompe Masterflex (Bioblock H87948) à une vitesse de 620 cm³ par heure.

Les tuyaux utilisés (Bioblock H67029) sont préalablement stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

3.20.3-Le test d'adhésion.

10 cm³ d'une culture en phase exponentielle de croissance sont centrifugés à 8000g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est rincé dans du tampon phosphate 40 mM, pH 7.5 (Prolabo 26926298). On centrifuge encore une fois (toujours dans les mêmes conditions) et le culot est remis en suspension dans 20 cm³ de tampon phosphate.

A partir de cette suspension bactérienne, on prépare 150 cm³ de suspension dont on ajuste l'absorbance à 620 nm à 0,045 - 0,055 par dilution dans du tampon phosphate afin d'obtenir : 3×10^7 à 4×10^7 bactéries cm⁻³.

Le remplissage de la colonne est réalisé par aspiration avec une pompe Masterflex (réglée sur une vitesse de 9000 cm³ par heure) jusqu'à ce que la colonne et les tuyaux soient pleins. Ensuite, la pompe est arrêtée et le circuit fermé est branché. La pompe est ensuite réglée à une vitesse de 620 cm³ par heure, permettant une bonne circulation de la suspension bactérienne pour éviter la sédimentation des bactéries.

Pour prélever les pastilles durant l'étude cinétique, la pompe Masterflex est arrêtée et les deux extrémités de la colonne sont obturées avec des clamps (3 pastilles sont prélevées par temps : 1^{er} temps pastilles 1, 6 et 11, 2^{ème} temps pastilles 2, 7 et 12, etc...). Des dénombrements par épifluorescence au DAPI sont effectués directement sur les pastilles (3.4.1). Trois cm³ de la suspension de bactéries sont prélevés au niveau des bouchons enlevés lors du dernier prélèvement et l'absorbance à 620 nm est mesurée. Les bouchons sont remplacés avec de nouvelles pastilles, les clamps sont retirés et la pompe Masterflex est ensuite remise en route.

Pour éviter que des bulles d'air ne se forment au niveau des pastilles, la colonne doit être placée de manière à ce que les pastilles soient en position latérale.

4) RÉSULTATS :

Ce chapitre rapportant les résultats des expérimentations est divisé en trois grandes parties qui vont être présentées successivement :

4.1-Transfert de plasmides recombinants entre souches d'*Escherichia coli* K12 au sein de réacteurs à lit fixe.

4.2-Transfert d'un plasmide recombinant entre *Escherichia coli* K12 et des souches isolées de boues activées au sein de réacteurs à lit fixe et en réacteurs "batch-séquencés".

4.3-Mobilisation de plasmides recombinants par la biomasse de boues activées sur boîtes de Pétri.

4.1-TRANSFERT DE PLASMIDES RECOMBINANTS ENTRE SOUCHES D'ESCHERICHIA COLI K12 AU SEIN DE REACTEURS A LIT FIXE.

Les études de transferts génétiques ont été développées au laboratoire au sein de biofilms bactériens produits sur support billes de verre dans des réacteurs à lit fixe alimentés en continu. Chaque expérience a été réalisée au moins en triplicat dans les divers contextes génétiques étudiés. Les différentes bactéries donatrices utilisées sont présentées dans le tableau 3, la souche réceptrice étant toujours la même : *Escherichia coli* K12 UB281.

Au préalable, les caractéristiques des biofilms *monospecies* de souches réceptrice et donatrices ont été étudiées.

4.1.1-Caractéristiques des biofilms *monospecies* à l'équilibre.

Afin de définir un état d'équilibre apparent des biofilms, les bactéries en suspension des réacteurs à lit fixe ont été dénombrées au sein de l'effluent. L'équilibre est caractérisé par une biomasse bactérienne constante dans l'effluent des

Tableau 3 : Souches donatrices et réceptrice utilisées pour évaluer les transferts entre souches de *Escherichia coli* en réacteur à lit fixe. Les différents contextes génétiques imposés par le contenu plasmidique de la souche donatrice.

Réceptrice	Donatrices	Contextes génétiques étudiés
<i>E. coli</i> K12 UB281	<i>E. coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE325)	<i>tra</i> ⁺ <i>mob</i> ⁺ <i>oriT</i> ⁺
<i>E. coli</i> K12 UB281	<i>E. coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE328)	<i>tra</i> ⁺ <i>mob</i> ⁺ <i>oriT</i> ⁻
<i>E. coli</i> K12 UB281	<i>E. coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325)	<i>tra</i> ⁺ <i>mob</i> ⁻ <i>oriT</i> ⁺
<i>E. coli</i> K12 UB281	<i>E. coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328)	<i>tra</i> ⁺ <i>mob</i> ⁻ <i>oriT</i> ⁻

réacteurs. Les bactéries fixées au sein des biofilms ont été déterminées une fois l'équilibre estimé atteint, permettant ainsi de calculer un taux de croissance du biofilm à l'équilibre, défini par l'équation suivante (BAKKE *et al.*, 1984) :

$$\mu = D \times (X_{\text{sus}}/X_{\text{fix}}) \times (V/A)$$

où : D est le taux de dilution, calculé par le rapport du débit d'alimentation du réacteur sur le volume interstitiel du réacteur (dans notre cas $D = 150/140 = 1.1 \text{ h}^{-1}$).

X_{sus} est le nombre de bactéries estimées par épifluorescence, en suspension dans le liquide interstitiel à l'équilibre par unité de volume (bactéries cm^{-3}).

X_{fix} est le nombre de bactéries fixées par unité de surface (bactéries cm^{-2}) estimées par épifluorescence lors du fractionnement des biofilms à l'équilibre.

A est la surface du matériau support = 2450 cm^2 .

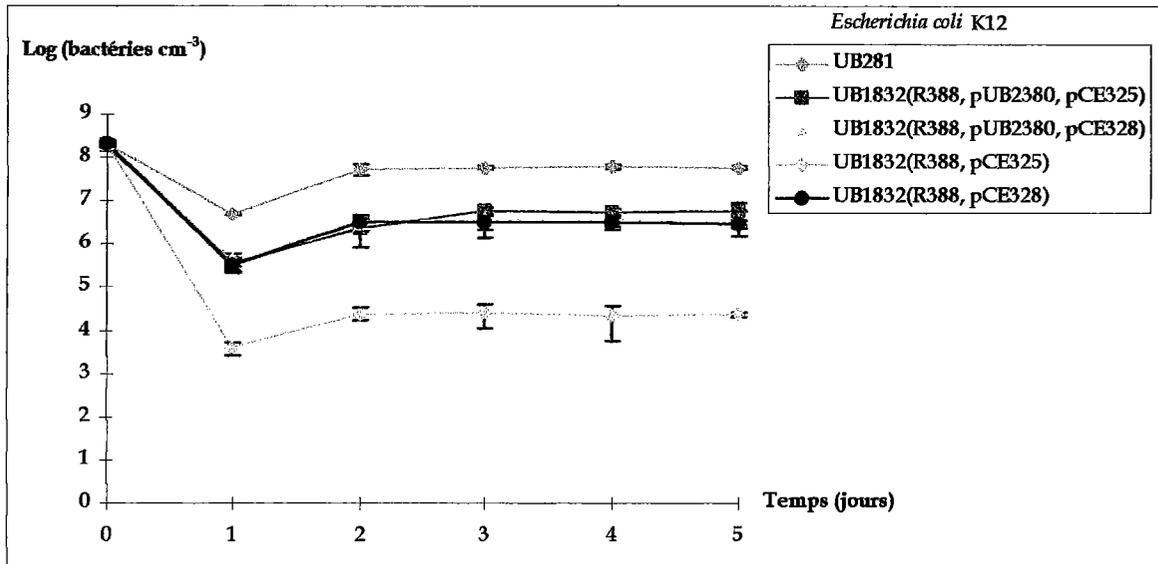
V est le volume interstitiel des réacteurs = 140 cm^3 .

4.1.1.1-Cinétique de mise à l'équilibre.

Les résultats bruts correspondants aux différentes souches étudiées sont reportés en annexe 1. Les moyennes et les écarts types des dénombrements bactériens déterminés par épifluorescence sont illustrés par la figure 9.

Les cinq courbes se rapportant aux cinq souches étudiées : *Escherichia coli* K12 UB281, *Escherichia coli* K12 UB1832 contenant différents plasmides (tableau 3) ont une allure identique. Elles se stabilisent toutes à un niveau de bactéries constant au bout de deux jours, mais à des niveaux différents suivant la souche étudiée. Ce niveau varie d'environ 2.0×10^4 bactéries cm^{-3} pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) à environ 5.0×10^6 bactéries cm^{-3} pour la même souche porteuse des plasmides (R388, pUB2380, pCE325), (R388, pUB2380, pCE328) ou (R388, pCE328) et à 6.0×10^7 bactéries cm^{-3} pour la souche *Escherichia coli* K12 UB281. La souche (UB281 ou UB1832), ainsi que le contenu plasmidique de la souche donatrice ont

Figure 9: Suivi des bactéries déterminées par épifluorescence au DAPI dans l'effluent de réacteurs à lit fixe pour les différentes souches d'*Escherichia coli* utilisées comme donatrices et réceptrice. (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour trois expériences par souche).



donc un effet sur la stabilisation du niveau des bactéries au sein de l'effluent des réacteurs.

Lorsque la biomasse présente dans l'effluent du réacteur est constante, nous avons estimé que le biofilm avait atteint un équilibre apparent pour chacune des souches étudiées puisque les bactéries présentes dans l'effluent proviennent du décrochage du biofilm et que les conditions hydrodynamiques sont constantes.

4.1.1.2- Caractéristiques des biofilms de souche pure à l'équilibre.

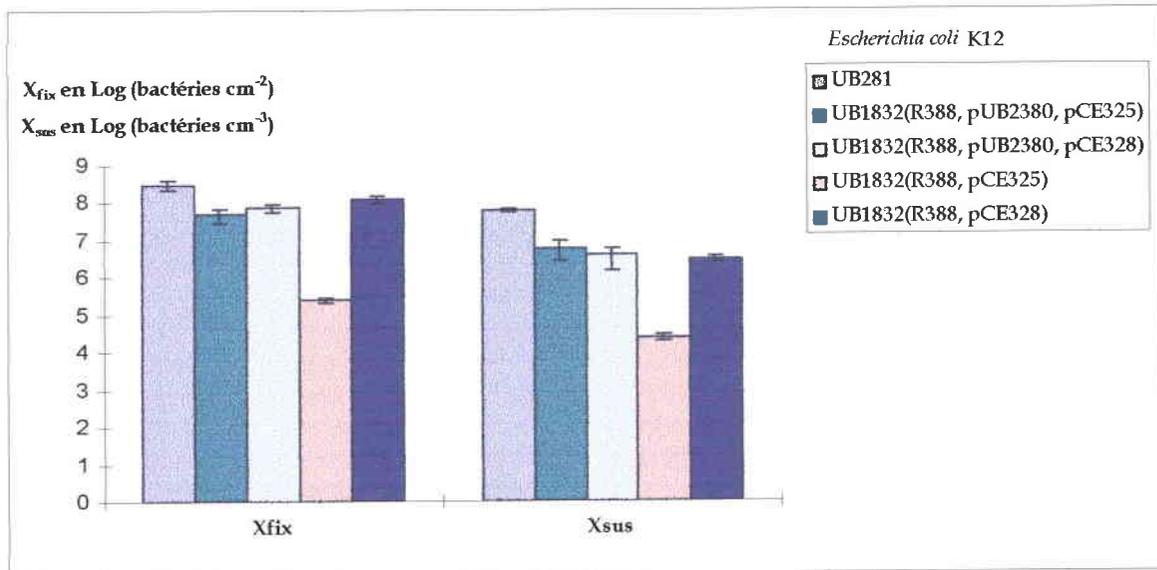
Lorsque les biofilms sont estimés à l'équilibre (5 jours), les réacteurs sont arrêtés et fractionnés en 9 parties : 3 fractions pour le haut du réacteur, 3 pour le milieu et 3 pour le bas. Les bactéries fixées sur les billes de verre sont décrochées, dénombrées par épifluorescence au DAPI et exprimées en bactéries cm^{-2} .

Ces valeurs de X_{sus} , X_{fix} et μ obtenues à l'équilibre sont reportées en annexe 2.

Les moyennes et les écarts types des bactéries fixées et des bactéries en suspension illustrés par la figure 10 indiquent que les quantités de bactéries fixées par cm^2 au sein des biofilms à l'équilibre sont variables suivant les souches étudiées. Nos résultats varient de $(2.5 \pm 0.4) \times 10^5$ bactéries cm^{-2} pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) à $(3.1 \pm 0.9) \times 10^8$ bactéries cm^{-2} pour la souche *Escherichia coli* K12 UB281. Une différence d'un facteur 1000 dans la colonisation des billes de verre est également observée entre les deux souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) : $(1.2 \pm 0.3) \times 10^8$ bactéries cm^{-2} et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325).

La comparaison des rapports $X_{\text{sus}}/X_{\text{fix}}$ montre que la souche *Escherichia coli* K12 UB281 a le rapport le plus important : $(2.1 \pm 0.5) \times 10^{-1}$. Pour les souches *Escherichia coli* contenant différents plasmides, ce rapport varie de $(2.6 \pm$

Figure 10 : Bactéries fixées par cm^2 (X_{fix}) sur les billes de verre et les bactéries en suspension par cm^3 (X_{sus}) dans l'effluent de réacteurs à lit fixe à l'équilibre pour les différentes souches d'*Escherichia coli* K12 étudiées. (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour trois expériences par souche).



$0.7) \times 10^{-2}$ pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) à $(1.2 \pm 0.4) \times 10^{-1}$ pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE325).

La variation des rapports $X_{\text{sus}}/X_{\text{fix}}$ explique les valeurs des taux de croissance μ (h^{-1}) rapportés dans le tableau 4 de $(1.6 \pm 0.4) \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) à $(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ pour la souche *Escherichia coli* K12 UB281. De plus les bactéries donatrices ont un taux de croissance qui se trouve dans le même logarithme quel que soit le contenu plasmidique : $(4.7 \pm 2.9) \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$. Toutefois, il existe une différence significative entre le taux de croissance des souches porteuses des plasmides (R388, pCE325) et (R388, pCE328). La souche donatrice porteuse des plasmides (R388, pCE328) ayant un taux de croissance plus faible que celle porteuse des plasmides (R388, pCE325), respectivement $(1.6 \pm 0.4) \times 10^{-3}$ et $(6.0 \pm 1.2) \times 10^{-3}$. La croissance plus importante de la souche donatrice (R388, pCE328) au sein de biofilms bactériens pourrait favoriser le transfert du plasmide R388. Le taux de croissance de la souche *Escherichia coli* K12 UB281 est 10 fois plus important que ceux des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 contenant différents plasmides.

4.1.1.3-Survie des bactéries donatrices au sein de biofilms mixtes donatrices - réceptrices.

Les transferts de plasmides ont été évalués au sein de biofilms mixtes entre une souche bactérienne donatrice et une souche bactérienne réceptrice : respectivement *Escherichia coli* K12 UB1832 contenant différents plasmides et *Escherichia coli* K12 UB281. Nous avons évalué la survie des donatrices au sein de biofilms mixtes de donatrices et de réceptrices, ainsi que les caractéristiques de ces biofilms mixtes à un stade d'équilibre apparent. Et enfin, nous avons évalué les transconjugants formés au sein de ces biofilms dans les différents contextes génétiques étudiés.

Tableau 4: Taux de croissance μ (h^{-1}) des biofilms de réceptrice et de donatrices à l'équilibre (La première colonne de résultats du taux de croissance correspond aux moyennes et aux écarts types de trois expérimentations réalisées par souche, la deuxième colonne correspond aux moyennes et aux écarts types des trois expérimentations réalisées pour *E. coli* K12 UB281 et des douze expérimentations réalisées pour *E. coli* K12 UB1832 quel que soit le contenu plasmidique).

Souches étudiées	μ (h^{-1})	
<i>E. coli</i> K12 UB281	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-2}$
<i>E. coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE325)	$(7.5 \pm 2.5) \times 10^{-3}$	$(4.7 \pm 2.9) \times 10^{-3}$
<i>E. coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE328)	$(3.7 \pm 2.7) \times 10^{-3}$	
<i>E. coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325)	$(6.0 \pm 1.2) \times 10^{-3}$	
<i>E. coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328)	$(1.6 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	

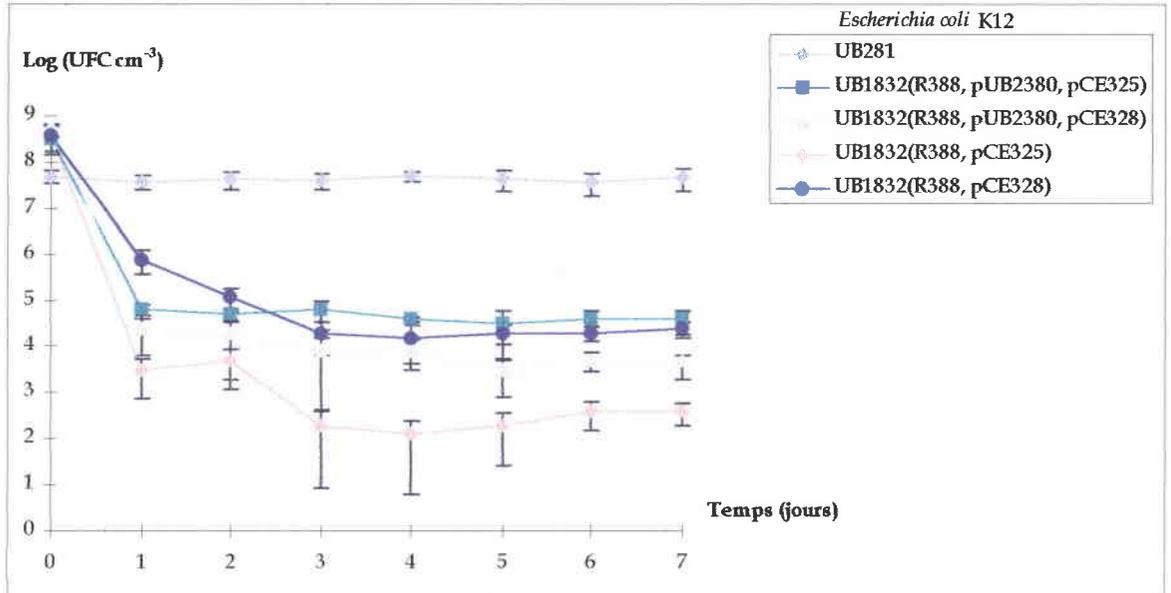
Après avoir obtenu la mise à l'équilibre d'un biofilm de bactéries réceptrices : *Escherichia coli* K12 UB281 (voir partie 4.1.1), les réacteurs sont arrêtés et une des souches donatrices *Escherichia coli* K12 UB1832 porteuse de plasmides est introduite dans les réacteurs (voir matériel et méthodes 3.5.3).

La survie des donatrices et des réceptrices dans le réacteur a été estimée par des dénombrements spécifiques au sein de l'effluent des réacteurs. Les résultats bruts correspondants sont reportés en annexes 3 et 4. Les moyennes et les écarts types correspondants aux UFC spécifiques de bactéries donatrices et réceptrices illustrés par la figure 11 montrent que les bactéries réceptrices restent stables après introduction des bactéries donatrices : environ 5×10^7 bactéries cm^{-3} .

Les quatre courbes se rapportant aux quatre souches donatrices étudiées (tableau 3) se stabilisent toutes au bout de 3 jours. Le niveau de stabilisation variant suivant la souche donatrice étudiée, donc suivant le contexte génétique. Les souches donatrices se stabilisent à un nombre d'UFC en suspension variant de 4.0×10^2 UFC cm^{-3} pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) à 4.0×10^4 UFC cm^{-3} pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE325).

La comparaison des figures 11 et 9 indique que les donatrices en suspension en présence des réceptrices se trouvent à un taux 100 fois plus faible que dans l'effluent des réacteurs contenant les donatrices seules. De plus, la souche donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) se stabilise toujours à un taux plus faible que les autres donatrices que ce soit au sein de l'effluent des réacteurs à lit fixe *bispecies* ou *monospecies* (respectivement 10 et 100 fois plus faible). Cette comparaison, des figures 11 et 9 où les dénombrements bactériens sont respectivement exprimés en UFC cm^{-3} et bactéries cm^{-3} , est possible car il existe une corrélation positive significative ($R=0.98$) entre ces deux types de dénombrement et cette relation est établie avec un risque d'erreur de 1% (Les valeurs brutes de ces dénombrements sont reportés en annexe 5).

Figure 11: Survie des bactéries donatrices et réceptrices au sein de biofilms bactériens mixtes : réceptrices + donatrices. (UFC = unités formant colonie. Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour trois expériences au moins par souche pour les donatrices et pour toutes les expériences pour les réceptrices).



La biomasse dénombrée dans l'effluent provenant du décrochage des bactéries fixées et étant stable au bout de quelques jours, nous avons considéré les biofilms mixtes dans un état d'équilibre apparent au bout de 7 jours.

A ce stade, les biofilms mixtes en équilibre apparent ont été caractérisés par un dénombrement des bactéries fixées sur billes de verre au sein des réacteurs.

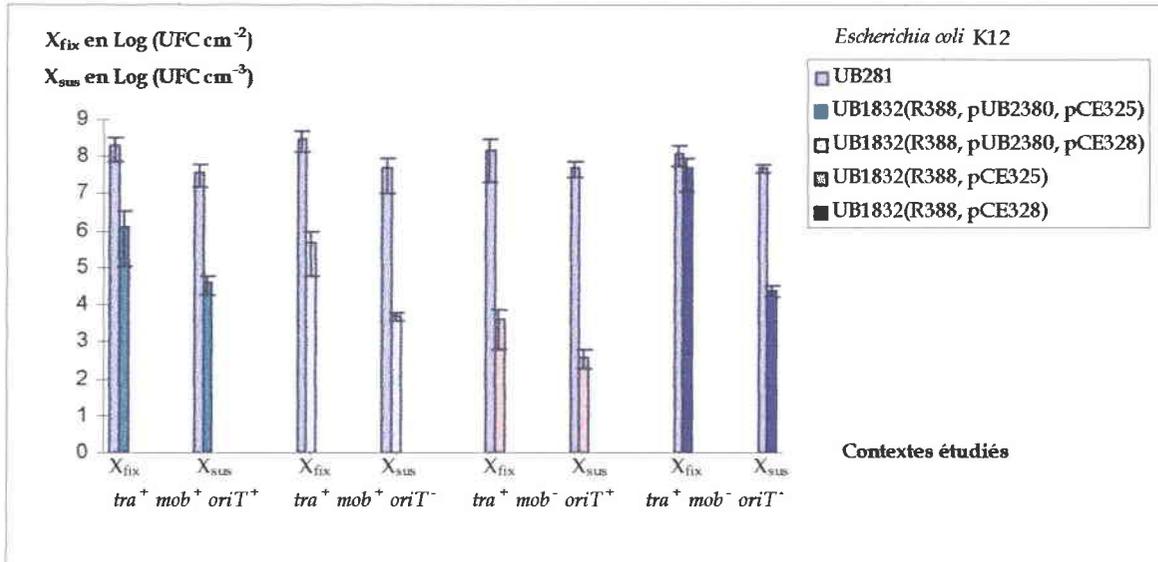
Les biofilms mixtes de donatrices et de réceptrices à l'équilibre (7 jours) ont été fractionnés en 9 parties (comme précédemment en 4.1.1.2) et les bactéries ont été décrochées de leur support puis dénombrées par comptage des UFC sur milieux gélosés sélectifs correspondants aux souches donatrices et réceptrices présentes au sein des biofilms.

Les résultats bruts concernant les valeurs de : X_{sus} et X_{fix} correspondants aux UFC spécifiques des donatrices et des réceptrices sont reportés en annexe 6. Les moyennes et les écarts types des UFC fixées et des UFC en suspension sont illustrés par la figure 12.

Les bactéries réceptrices sont toujours fixées autour de 10^8 UFC cm^{-2} quelle que soit la souche donatrice présente. Par contre les bactéries donatrices qui sont toujours moins fixées que les réceptrices sont dénombrées entre $(3.6 \pm 3.0) \times 10^3$ bactéries cm^{-2} pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et $(5.2 \pm 1.3) \times 10^7$ bactéries cm^{-2} pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328). Pour cette dernière souche, le rapport donatrices par réceptrice est le plus important, a priori, il ne peut être expliqué que par le contenu plasmidique de la donatrice.

De même pour les bactéries en suspension, les réceptrices se trouvent dans l'effluent des réacteurs à un taux de 5.0×10^7 bactéries cm^{-3} alors que les donatrices se trouvent 10^3 à 10^5 fois moins dans l'effluent des réacteurs quelle que soit la souche donatrice étudiée. En effet, les souches donatrices au sein de l'effluent des réacteurs varient de $(3.8 \pm 1.9) \times 10^2$ bactéries cm^{-3} pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832

Figure 12: UFC de donatrices et de réceptrices fixées par cm^2 (X_{fix}) sur les billes de verre et en suspension (X_{sus}) dans l'effluent de réacteurs à lit à l'équilibre suivant les contextes génétiques étudiés. (UFC = unités formant colonie. Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour trois expériences au moins par contexte).



(R388, pCE325) à $(4.0 \pm 2.2) \times 10^4$ bactéries cm^{-3} pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE325).

Les rapports donatrices par réceptrice au sein des biofilms varient donc de façon importante : 10^{-5} donatrices par réceptrice pour le contexte *tra⁺ mob⁻ oriT⁺* à 10^{-1} donatrices par réceptrice pour le contexte *tra⁺ mob⁻ oriT⁻*. Cet aspect du comportement des donatrices sera étudié plus précisément dans le paragraphe 4.1.5.

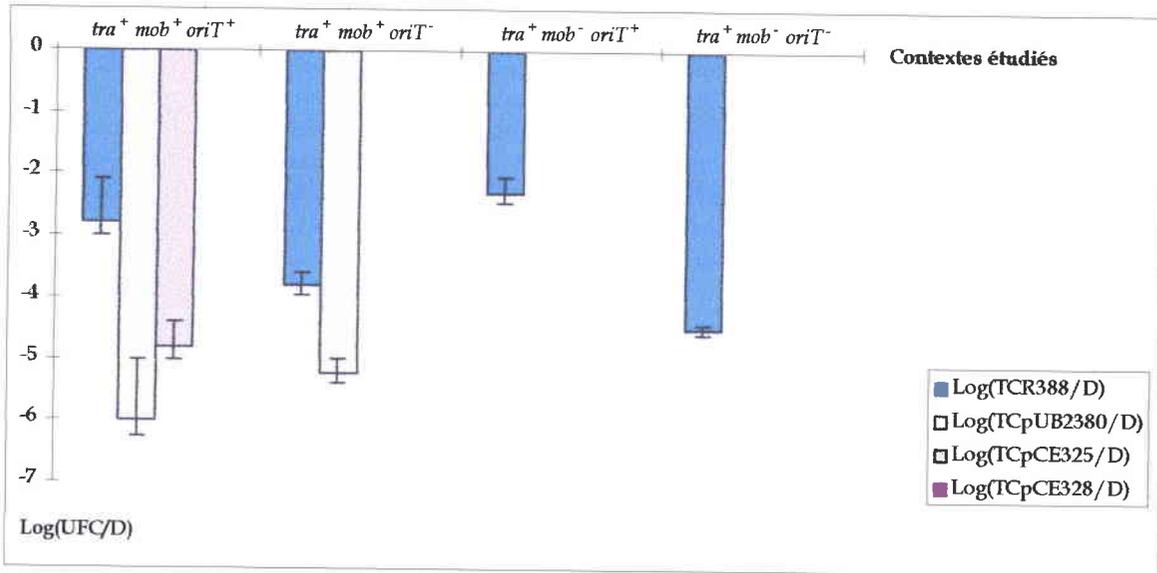
Toutefois, que ce soit au sein des biofilms de souches pures (figure 10) ou des biofilms mixtes (figure 12) à l'équilibre, c'est toujours la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) qui est la plus fixée et la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) qui est la moins fixée. Cette différence de fixation pourrait être due à une croissance, à des propriétés de surfaces cellulaires et d'adhésions variables suivant le plasmide pCE contenu dans la donatrice.

4.1.2-Détection des transconjugants.

Les transconjugants sont sélectionnés après fractionnement des réacteurs à l'équilibre comprenant les souches donatrices et réceptrices sur des milieux gélosés contenant les antibiotiques sélectifs de la souche réceptrice et des différents plasmides présents chez les donatrices. Ils sont estimés après déduction des transconjugants qui peuvent se former sur milieux sélectifs pendant l'incubation des boîtes de Pétri.

Les résultats bruts correspondants aux dénombrements des transconjugants obtenus au sein des biofilms sont reportés en annexe 7. Les résultats bruts correspondants aux dénombrements des bactéries donatrices et réceptrices au sein des biofilms sont reportés en annexe 6. Les moyennes et les écarts types correspondants aux transconjugants par donatrice sont illustrés par la figure 13.

Figure 13: Fréquences de transfert exprimées en $\log(\text{transconjugants}/\text{donatrices})$ dans les contextes génétiques étudiés. (D = donatrices, TC = transconjugants. Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour trois expériences au moins par contexte).



Comme on pouvait s'y attendre, le transfert du plasmide pCE325 n'est observé que dans le contexte le plus favorable : *tra⁺ mob⁺ oriT⁺* avec une fréquence apparente de $(1.6 \pm 1.0) \times 10^{-5}$ transconjugants par donatrice. Et le transfert du plasmide pCE328 n'est observé dans aucun des contextes où il est présent, car n'ayant pas d'origine de transfert, il ne peut être mobilisé contrairement au plasmide pCE325. La seule possibilité pour ce plasmide est de former un cointégrat avec le plasmide pUB2380 qui possède des séquences inversement répétées de type transposon ou avec le plasmide R388 qui les aurait acquises.

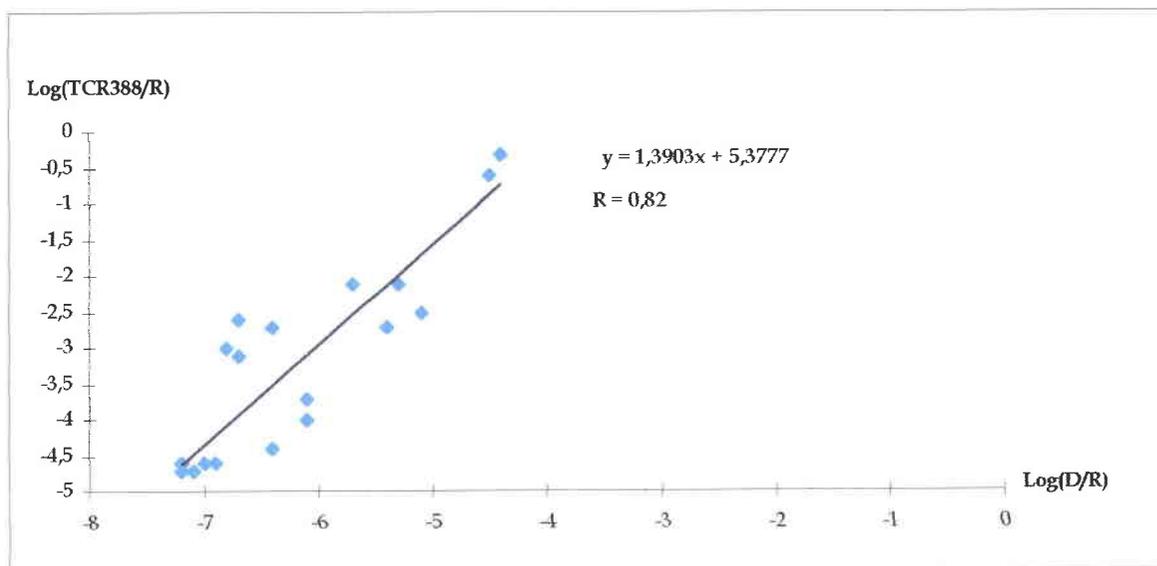
Le plasmide pU2380 est transféré par mobilisation quand il est présent dans la bactérie donatrice, à la fréquence apparente moyenne de $(3.5 \pm 3.5) \times 10^{-6}$ transconjugants (pUB2380) par donatrice.

Le plasmide conjugatif R388 est transféré dans tous les contextes génétiques, car il est autotransférable, avec une fréquence apparente moyenne comprise entre $(3.2 \pm 0.6) \times 10^{-5}$ transconjugants (R388) par donatrice pour le contexte *tra⁺ mob⁺ oriT⁺* et $(1.6 \pm 0.9) \times 10^{-3}$ transconjugants (R388) par donatrice pour le contexte *tra⁺ mob⁻ oriT⁺*.

Toutes les expériences ayant permis la production de transconjugants (R388) ont été regroupées quel que soit le contexte génétique étudié, nous avons représenté le nombre de transconjugants (R388) par réceptrice en fonction du rapport donatrices par réceptrice présents au sein des biofilms (figure 14).

Le graphe de la figure 14 montre qu'il existe une corrélation positive significative ($R=0.82$) entre le nombre de transconjugants (R388) formés et le nombre de donatrices colonisants les biofilms mixtes. Cette relation est établie avec un risque d'erreur de 1%.

Figure 14 : Transconjugants (R388) par réceptrice en fonction du rapport donatrices par réceptrice. (Chacun des points correspondant à une expérimentation différente, TC = transconjugants, R = réceptrices, D = donatrices).



La variation de la fréquence de transfert du plasmide R388 est donc au moins en partie due à la différence des rapports donatrices/réceptrices observés dans les différents contextes.

4.1.3-Différences d'implantation des souches donatrices porteuses de différents plasmides en biofilm mixte : recherche d'une explication.

Nous avons vu précédemment (4.1.1.4) qu'il existait une grande variation quand à l'implantation des bactéries donatrices dans un biofilm constitué de réceptrices. En effet, la souche donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) se fixe a un taux de bactéries 10000 fois plus faible que la souche donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) (figure 12).

Diverses expériences ont donc été réalisées pour tenter d'expliquer cette différence quant au taux de bactéries donatrices fixées. La première expérience réalisée porte sur l'hypothèse d'une différence de croissance entre ces deux souches : *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328). En effet, une croissance plus faible d'une des souches pourrait expliquer la plus faible densité des bactéries fixées pour cette souche.

4.1.3.1-Influence des plasmides sur le taux de croissance maximum des souches donatrices en suspension.

Pour comparer les propriétés de croissance des différentes souches en fonction du contenu plasmidique, nous avons choisi comme paramètre le taux de croissance maximum.

Pour déterminer les taux de croissance maximum de la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 et des souches contenant un plasmide pCE : *Escherichia coli* K12 UB1832

(pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328), des milieux nutritifs L. B. à différentes concentrations (1.5 - 1 - 1/5 - 1/10) sontensemencés avec ces souches. La croissance de ces bactéries à 25°C dans les différents milieux est suivie par l'absorbance à 620 nm. Les résultats bruts de l'absorbance à 620 nm des différentes souches à différentes concentrations en L. B. sont reportées en annexe 8.

Les pentes des droites obtenues en traçant la relation entre le Logarithme népérien de l'absorbance à 620 nm et le temps pendant la phase exponentielle de croissance ont permis de déduire les taux de croissance μ (h^{-1}) correspondants à chacune des souches pour les différentes concentrations en L. B., ces taux de croissance déterminés en triplicat, ainsi que les moyennes et les écarts types correspondants sont reportés dans le tableau 5.

Le taux de croissance maximum (μ_{max}) est ensuite évalué par l'équation de droite déterminée à partir du graphe en double inverse $1/\mu = f(1/\text{concentration en L. B.})$.

Les équations des droites réalisées en triplicat représentées sur les figures 15-a à 15-c, permettent donc de calculer des taux de croissance maximum moyens pour les différentes souches étudiées :

- *Escherichia coli* K12 UB1832 : $\mu_{\text{max}} = 0.70 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$.
- *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325) : $\mu_{\text{max}} = 0.66 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$.
- *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) : $\mu_{\text{max}} = 0.66 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$.

Les taux de croissance maximum des souches *E. Coli* K12 UB1832 contenant le plasmide pCE325 ou le plasmide pCE328 ne varient pas de façon significative. Les différences de fixation des souches donatrices *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et UB1832 (R388, pCE328) ne sont donc pas dues à une différence de croissance relative aux plasmides pCE contenus dans la souche donatrice.

Tableau 5 : Taux de croissance μ (h^{-1}) déterminé pendant la phase exponentielle de croissance des souches étudiées en utilisant différentes concentrations de milieu nutritif L. B. (Les valeurs des taux de croissance déterminés en triplicat, ainsi que les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Souches étudiées	Concentration en milieu L. B.			
	1.5	1	1/5	1/10
<i>E. coli</i> K12 UB1832	$\mu = 0.71$ $\mu = 0.72$ $\mu = 0.70$	$\mu = 0.69$ $\mu = 0.68$ $\mu = 0.71$	$\mu = 0.50$ $\mu = 0.50$ $\mu = 0.49$	$\mu = 0.48$ $\mu = 0.52$ $\mu = 0.51$
Moyenne \pm écart type	$\mu = 0.71 \pm 0.01$	$\mu = 0.69 \pm 0.01$	$\mu = 0.50 \pm 0.01$	$\mu = 0.50 \pm 0.02$
<i>E. coli</i> K12 UB1832 (pCE325)	$\mu = 0.64$ $\mu = 0.64$ $\mu = 0.64$	$\mu = 0.65$ $\mu = 0.66$ $\mu = 0.70$	$\mu = 0.48$ $\mu = 0.49$ $\mu = 0.47$	$\mu = 0.44$ $\mu = 0.46$ $\mu = 0.44$
Moyenne \pm écart type	$\mu = 0.64 \pm 0.00$	$\mu = 0.67 \pm 0.03$	$\mu = 0.48 \pm 0.01$	$\mu = 0.45 \pm 0.01$
<i>E. coli</i> K12 UB1832 (pCE328)	$\mu = 0.66$ $\mu = 0.64$ $\mu = 0.66$	$\mu = 0.64$ $\mu = 0.65$ $\mu = 0.66$	$\mu = 0.49$ $\mu = 0.49$ $\mu = 0.47$	$\mu = 0.45$ $\mu = 0.45$ $\mu = 0.45$
Moyenne \pm écart type	$\mu = 0.65 \pm 0.01$	$\mu = 0.65 \pm 0.01$	$\mu = 0.48 \pm 0.01$	$\mu = 0.45 \pm 0.00$

Figure 15-a : Représentation graphique en double inverse du taux de croissance μ en fonction de la concentration en L. B. pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832. (Les équations de droite et les coefficients de corrélation obtenus sont les suivants : Essai 1 : $y=0.0746x+1.4192$ $R=0.84$; Essai 2 : $y=0.0605x+1.4454$ $R=0.68$; Essai 3 : $y=0.0631x+1.4420$ $R=0.69$).

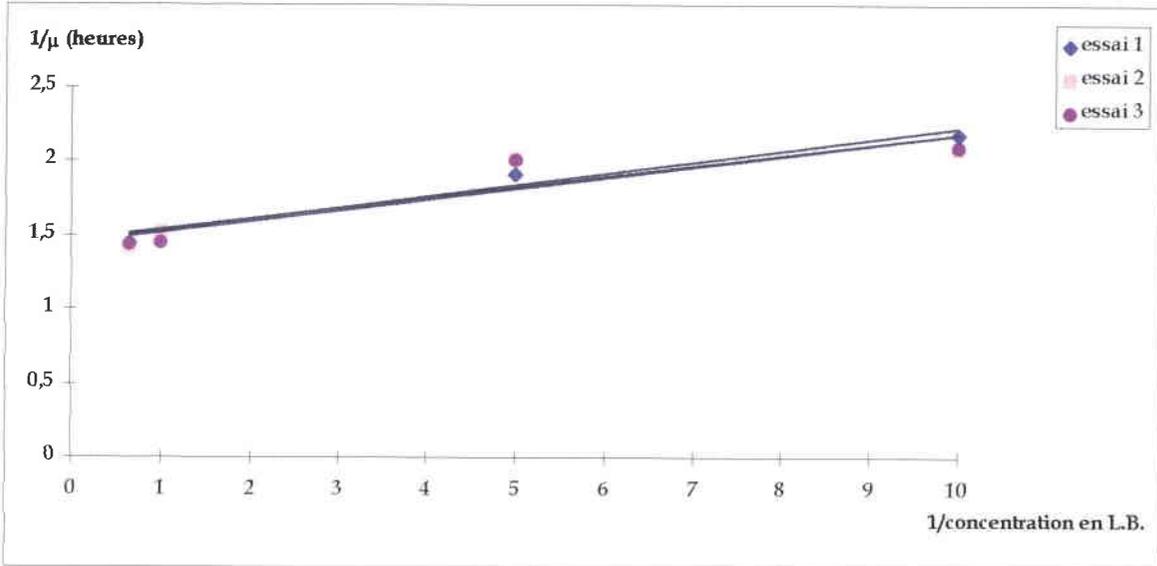


Figure 15-b : Représentation graphique en double inverse du taux de croissance μ en fonction de la concentration en L. B. pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325). (Les équations de droite et les coefficients de corrélation obtenus sont les suivants : Essai 1 : $y=0.0805x+1.527$ $R=0.91$; Essai 2 : $y=0.0720x+1.5176$ $R=0.87$; Essai 3 : $y=0.0894x+1.4799$ $R=0.86$).

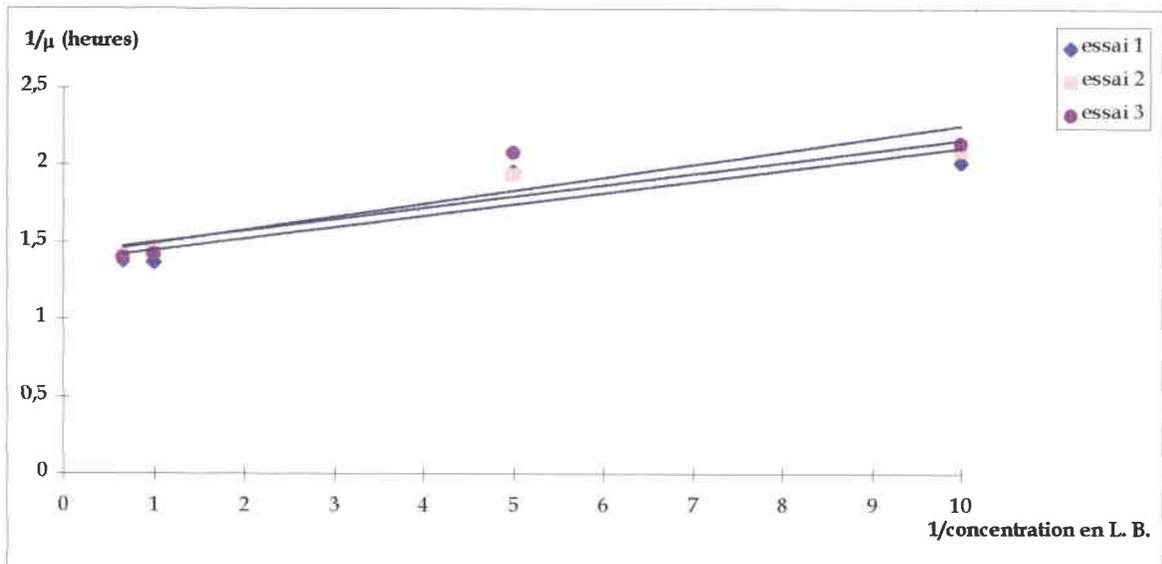
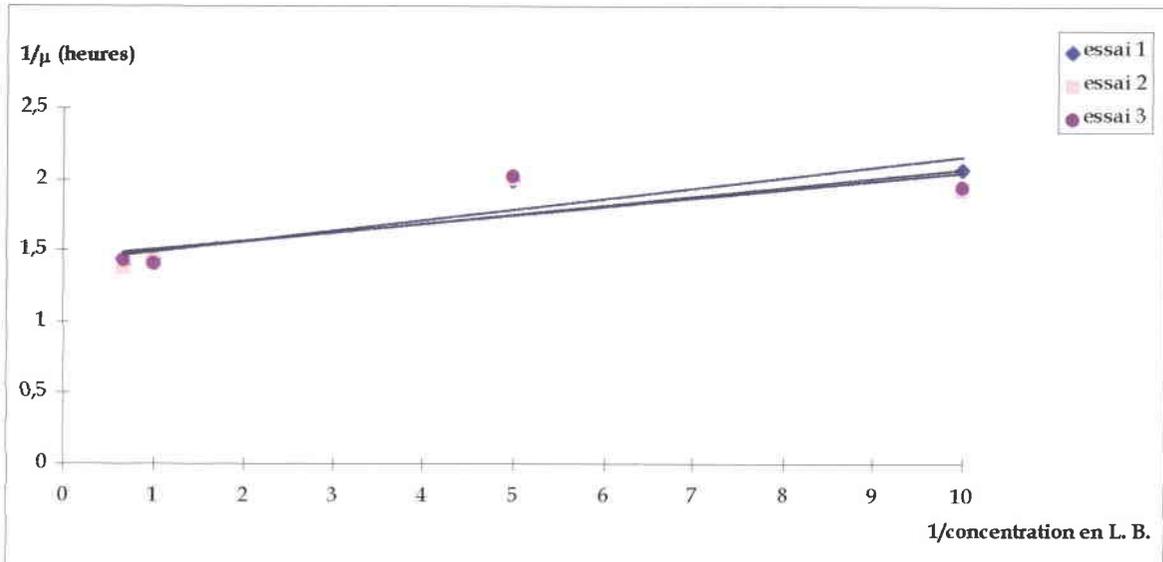


Figure 15-c : Représentation graphique en double inverse du taux de croissance μ en fonction de la concentration en L. B. pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328). (Les équations de droite et les coefficients de corrélation obtenus sont les suivants : Essai 1 : $y=0.0798x+1.4949$ $R=0.95$; Essai 2 : $y=0.0769x+1.5147$ $R=0.92$; Essai 3 : $y=0.0837x+1.4988$ $R=0.84$).



La croissance bactérienne n'est donc pas responsable de la différence de colonisation des bactéries donatrices au sein des biofilms mixtes. Nous avons vérifié si cette différence de fixation pouvait être expliquée par l'hydrophobicité de surface des différentes donatrices, les bactéries hydrophobes adhérant plus sur le matériau support verre que les bactéries hydrophiles (FLETCHER, 1992).

4.1.3.2-Détermination de l'hydrophobicité des souches donatrices.

La détermination de l'hydrophobicité des souches donatrices *Escherichia coli* K12 UB1832, *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325), *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) et du témoin positif *Enterobacter hirae* a été effectuée par le test de : "Bacterial Adherence to Hydrocarbons" (BATH) décrit par ROSENBERG *et al.* (1980).

La méthode est basée sur la partition des bactéries à l'interface d'un système biphasique comprenant une phase organique (un hydrocarbure) et une phase aqueuse (une suspension bactérienne) après un mélange bref.

L'hydrophobicité des bactéries est déterminée par la diminution de l'absorbance de la phase aqueuse.

Les résultats bruts concernant l'hydrophobicité des souches *Escherichia coli* K12 UB1832, *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) sont reportés en annexe 9. Les moyennes et les écarts types correspondants à l'hydrophobicité de ces différentes souches donatrices sont rapportés dans le tableau 6.

Dans ce tableau, on peut voir que la différence d'absorbance à 400 nm entre une suspension contenant de l'hexadécane et une suspension bactérienne pure est très faible quelle que soit la souche *Escherichia coli* étudiée et la quantité d'hexadécane

Tableau 6 : Hydrophobicité de trois souches bactériennes et d'un témoin positif (*Enterobacter hirae*) exprimée par la différence d'absorbance à 400 nm entre une suspension bactérienne contenant de l'hexadécane en différente quantité et une suspension bactérienne sans hexadécane. (Les moyennes et les écarts types portant sur trois expériences par souche et par quantité d'hexadécane ajoutée ont été reportés).

Souches étudiées	µl d'hexadécane ajouté				
	200	350	500	650	1500
<i>E. coli</i> K12 UB1832	-0.008 ± 0.009	-0.004 ± 0.015	-0.001 ± 0.014	-0.011 ± 0.006	-0.007 ± 0.002
<i>E. coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325)	+0.006 ± 0.026	-0.007 ± 0.015	+0.003 ± 0.014	+0.009 ± 0.016	-0.010 ± 0.017
<i>E. coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328)	-0.007 ± 0.007	-0.005 ± 0.005	-0.003 ± 0.005	-0.001 ± 0.004	-0.001 ± 0.003
<i>Enterobacter hirae</i>	-0.115 ± 0.003	-0.163 ± 0.007	-0.194 ± 0.006	-0.223 ± 0.004	-0.457 ± 0.022

utilisée, elle est même parfois positive pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325). Ces trois souches testées ne sont donc pas plus hydrophobes l'une que l'autre et elles sont en fait très peu hydrophobes comparativement à la souche *Enterobacter hirae*.

Ce n'est donc pas une différence d'hydrophobicité qui peut nous permettre d'expliquer la proportion de donatrices fixées au sein des biofilms mixtes à l'équilibre.

4.1.3.3-Adhésion de différentes souches donatrices.

La différence de fixation des bactéries donatrices *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) au sein des biofilms mixtes à l'équilibre ne pouvant être expliquée par une différence de croissance de ces souches où par une différence d'hydrophobicité de surface, nous avons comparé leur cinétique d'adhésion sur un support inerte de type silicone.

4.1.3.3.a-Cinétiques d'adhésion de différentes souches donatrices.

Les cinétiques d'adhésion sont réalisées au sein d'un réacteur qui fonctionne en circuit fermé. Les bactéries sont en suspension dans du tampon phosphate de manière à éviter la croissance. Le réacteur est percé de trous dans lesquels sont insérés des bouchons contenant chacun une pastille de silicone. Ces bouchons nous permettent d'échantillonner la surface interne du réacteur par prélèvement des pastilles de silicone où les bactéries se sont fixées. Les bactéries fixées sont estimées en fonction du temps par dénombrement par épifluorescence au DAPI directement sur les pastilles de silicone.

Dans un premier temps, nous avons effectué des cinétiques d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388), *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328), pour voir l'influence des plasmides pCE325 et pCE328 sur la vitesse d'adhésion de ces souches.

Les résultats bruts de ces cinétiques d'adhésion sont reportés en annexe 10. Les moyennes et les écarts types de ces cinétiques d'adhésion réalisées en triplicat sont représentés sur la figure 16.

La souche contenant les plasmides R388 et pCE328 est la souche bactérienne qui se fixe le plus sur les pastilles de silicone et le plus rapidement : $(55.6 \pm 5.1) \times 10^5$ bactéries cm^{-2} en 240 minutes. Les souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) se fixant à peu près à la même vitesse et au même taux : respectivement $(23.9 \pm 4.4) \times 10^5$ et $(33.1 \pm 6.2) \times 10^5$ bactéries par cm^{-2} en 240 minutes.

Des photographies prises aux différents temps de la cinétique d'adhésion de la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) ont été réalisées au microscope sous épifluorescence. Les photographies de cette cinétique d'adhésion sont présentées sur la figure 17.

Elles illustrent l'adhésion de plus en plus importante au cours du temps. En effet, aux premiers temps de prélèvement (0 et 5 minutes) les bactéries sont peu nombreuses et très dispersées, mais à partir du temps 30 minutes et jusqu'à 240 minutes, on s'aperçoit que les bactéries sont de plus en plus nombreuses et qu'elles ont tendance à former des agrégats entre elles et la répartition devient moins homogène, comme si la présence d'une bactérie favorisait la fixation d'une seconde ou comme s'il se développait des micro colonies dans le tampon utilisé pour l'expérience.

Figure 16: Cinétiques d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388), *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328). (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur trois expériences différentes par souche).

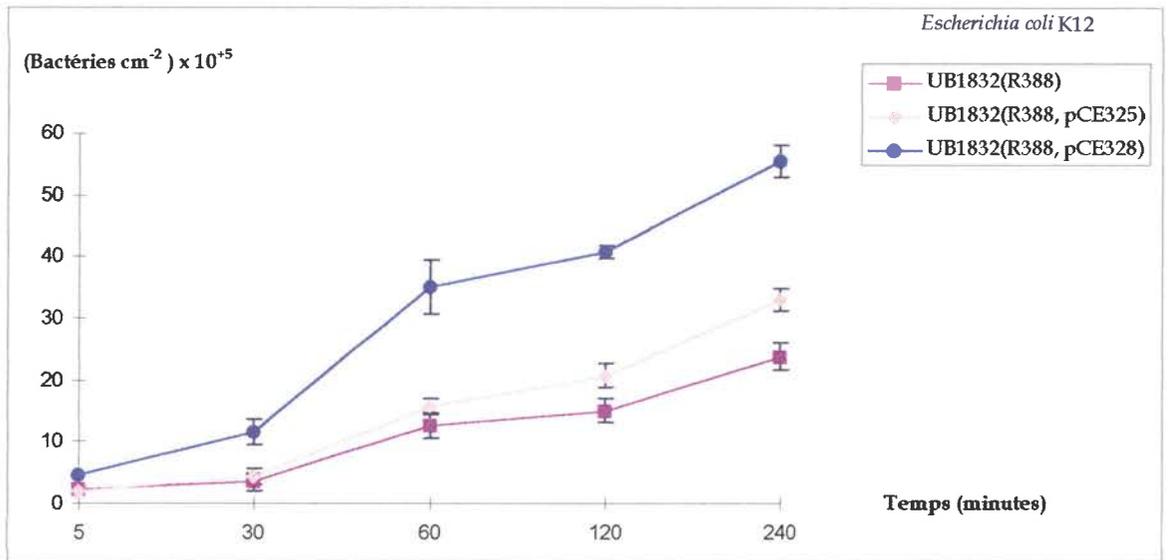
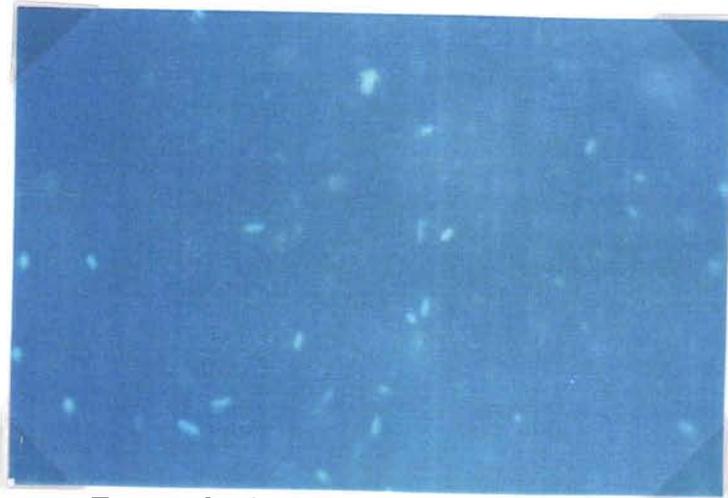
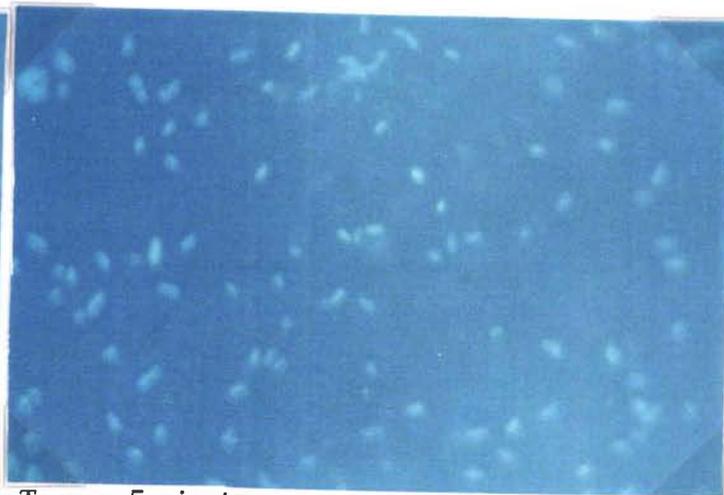


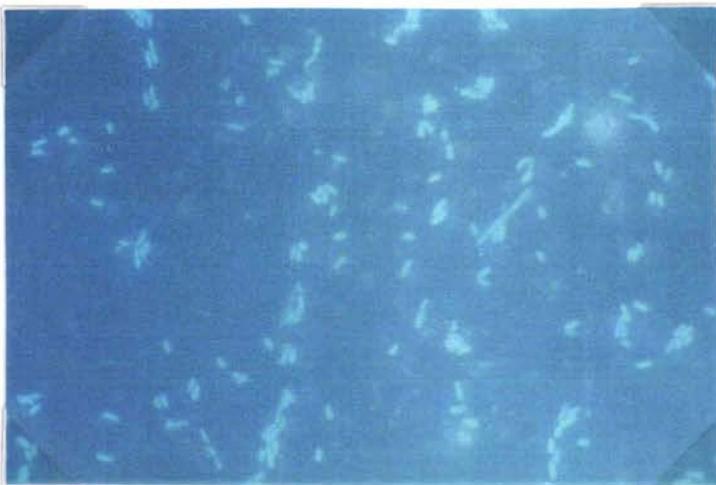
Figure 17 : Photographies de la cinétique d'adhésion de la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) aux différents temps de prélèvement des pastilles de silicone.



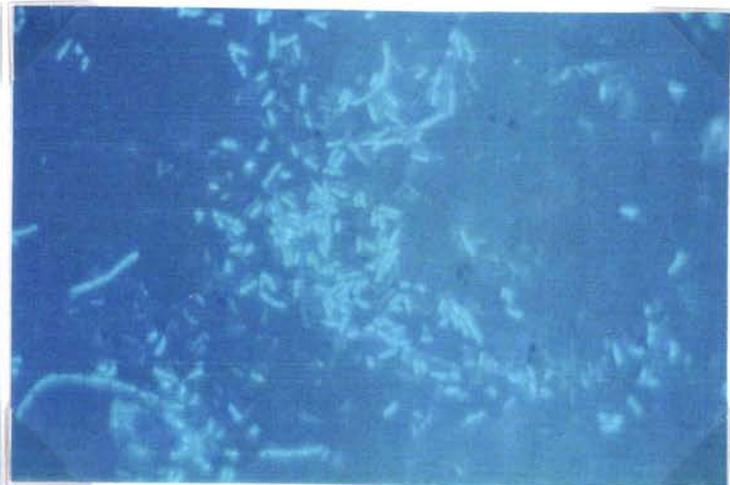
Temps : 0 minutes



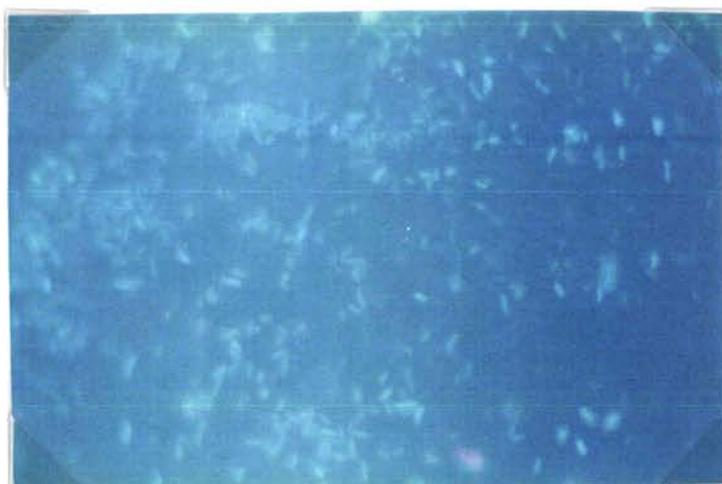
Temps : 5 minutes



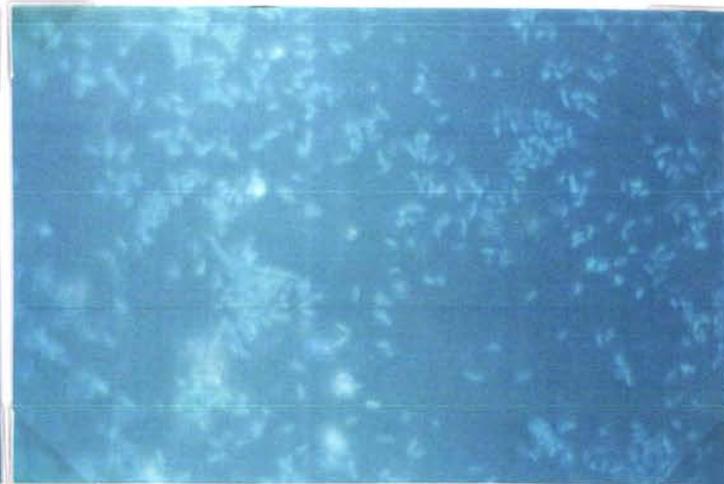
Temps : 30 minutes



Temps : 60 minutes



Temps : 120 minutes



Temps : 240 minutes

Après avoir observé que la souche contenant le plasmide pCE328 se fixait deux fois plus vite que les deux autres souches testées, nous avons vérifié que ces résultats étaient bien dus à la présence des plasmides pCE325 ou pCE328. Pour cela, nous avons introduit par transformation le plasmide pCE325 dans la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) et le plasmide pCE328 dans la même souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388). Nous avons aussi curé les souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) des plasmides pCE325 et pCE328 par un traitement au bromure d'éthidium.

Les cinétiques d'adhésion des souches ainsi transformées ou curées ont été comparées avec les souches initiales.

Les résultats bruts des cinétiques d'adhésion des souches transformées ou curées ont été reportées en annexe 10. Les moyennes et les écarts types correspondants sont portés sur les figures 18-a et 18-b.

Sur la figure 18-a, on peut voir que la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) transformée en *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) adhère de la même manière que la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) préalablement testée (respectivement $(28.6 \pm 0.5) \times 10^5$ et $(33.1 \pm 6.9) \times 10^5$ bactéries cm^{-2} en 240 minutes). De même, la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) transformée en *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) se fixe comme la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) préalablement testée (respectivement $(53.2 \pm 3.0) \times 10^5$ et $(55.6 \pm 5.2) \times 10^5$ bactéries cm^{-2} en 240 minutes).

Sur la figure 18-b, les souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) curées en *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) se fixent toutes deux de façon identique à la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) (respectivement $(24.4 \pm 0.4) \times 10^5$, $(25.4 \pm 1.2) \times 10^5$ et $(23.9 \pm 4.8) \times 10^5$ bactéries cm^{-2} en 240 minutes).

Figure 18-a : Cinétiques d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325), *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328), *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) transformée en *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) transformée en *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328). (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur trois expériences différentes par souche).

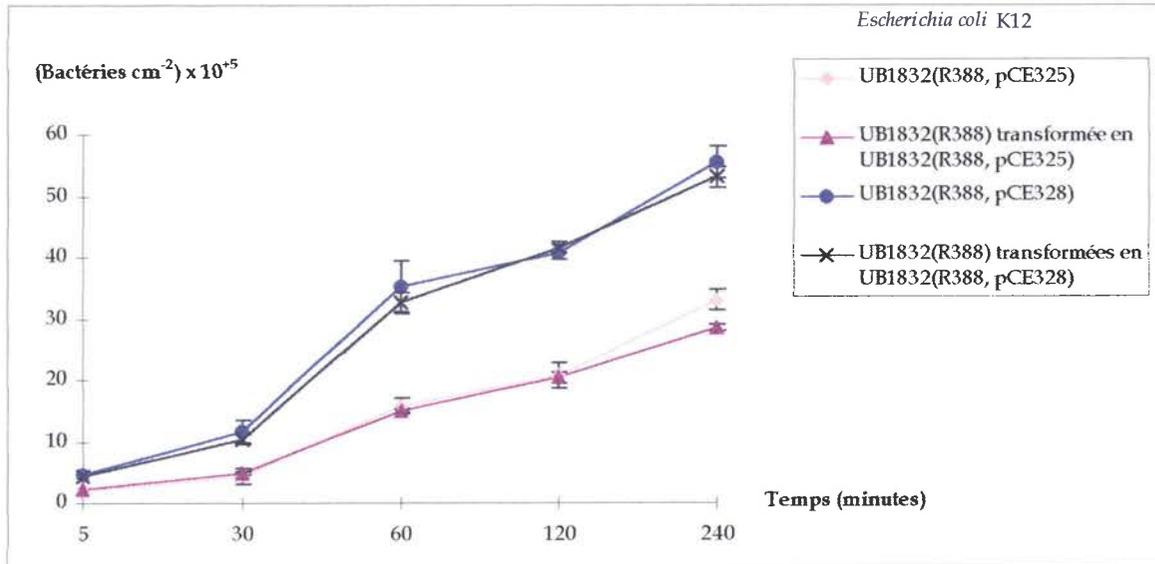
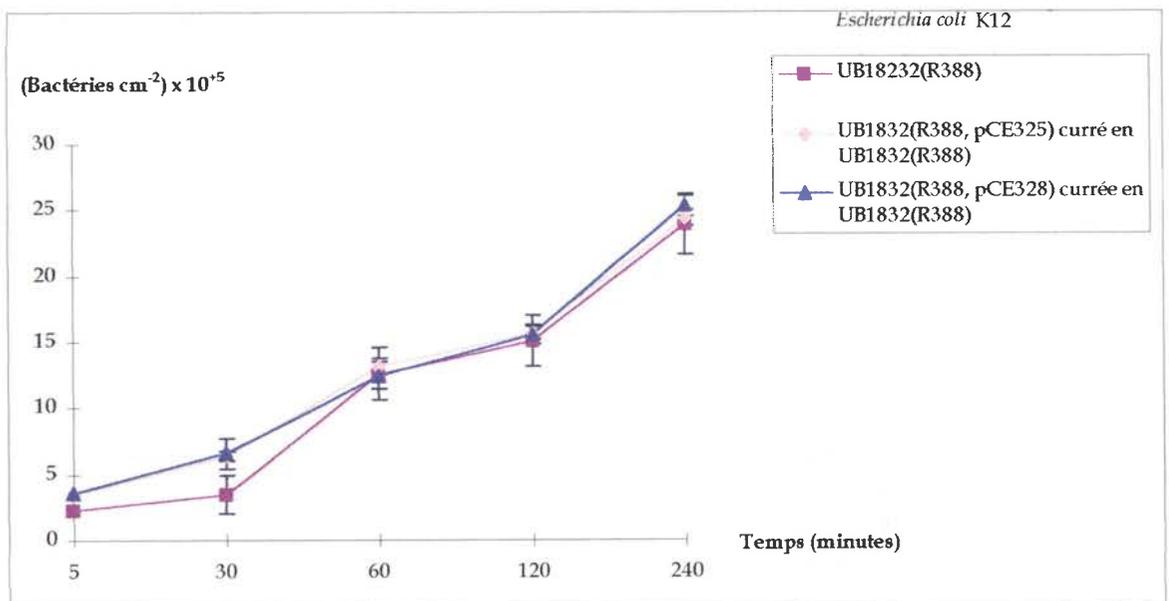


Figure 18-b : Cinétiques d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388), *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) curée *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) curée en *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388). (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur trois expériences différentes par souche).



Ces résultats confirment ceux de la figure 16 concernant la différence d'adhésion entre les souches contenant les plasmides pCE325 ou pCE328. Nous avons testé si la différence d'adhésion observée était due au un nombre de copies des plasmides pCE325 et pCE328 différent. Le plasmide pBR328 dont pCE328 dérive possède un nombre de copies de plasmides 3 fois plus important que pBR322 dont pBR325 et pCE325 dérivent (COVARRUBIAS *et al.*, 1981). Pour cela, les cinétiques d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832, *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325), *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328 amplifié) par un traitement à la spectinomycine pendant la croissance ont été réalisées. La spectinomycine ajoutée à un milieu riche permet une réplication et une amplification maximales du plasmide pCE328 en inhibant partiellement la synthèse protéique.

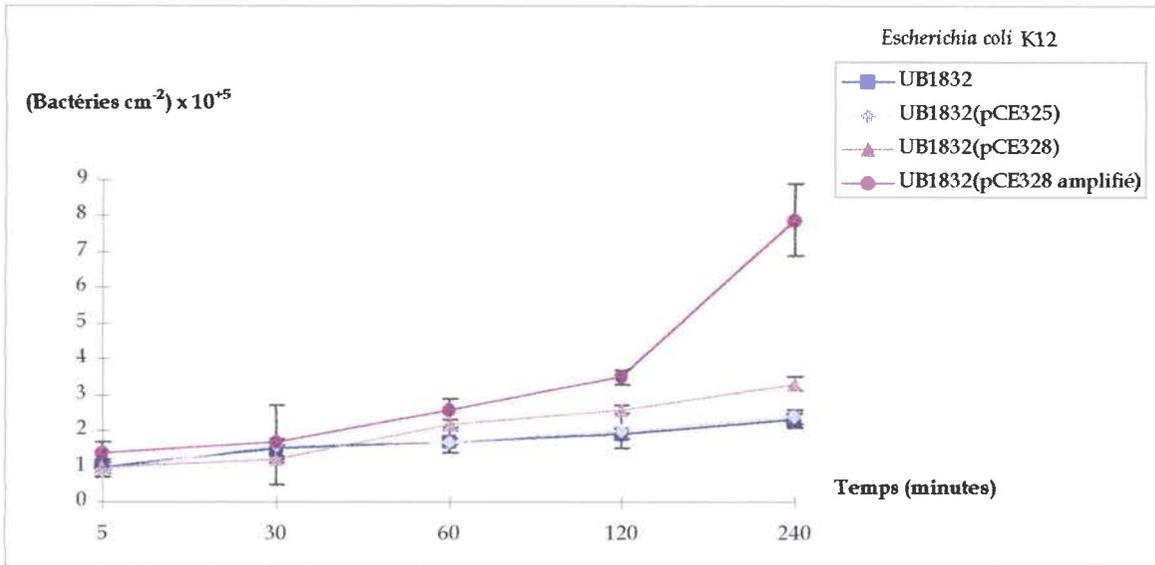
Les résultats bruts concernant ces cinétiques réalisées en triplicat pour chacune des souches étudiées ont été reportés en annexe 11. Les moyennes et les écarts types correspondants sont présentés sur la figure 19.

Les cinétiques d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 et *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325) sont similaires : respectivement $(2.3 \pm 0.3) \times 10^5$ et $(2.4 \pm 0.2) \times 10^5$ bactéries cm^{-2} en 240 minutes. Alors que la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) se fixe à un taux de : $(3.3 \pm 0.2) \times 10^5$ bactéries cm^{-2} en 240 minutes. Ce taux est multiplié par 2 quand le plasmide pCE328 est amplifié : $(7.9 \pm 1.0) \times 10^5$ bactéries cm^{-2} en 240 minutes.

Le fait que le plasmide pCE328 amplifié permette une meilleure adhésion que le plasmide pCE328 non amplifié peut-être lié à l'influence du nombre de copies du plasmide sur la vitesse d'adhésion.

En parallèle avec les cinétiques d'adhésion, nous avons dosé le contenu plasmidique des différentes souches étudiées par extraction de l'ADN plasmidique

Figure 19 : Cinétiques d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832, *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325), *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328 amplifié). (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur trois expériences différentes par souche).



au phénol chloroforme selon le protocole de SAMBROOK *et al.* (1989) et dosage par mesure de l'absorbance à 260 nm.

Dans un premier temps, l'ADN plasmidique des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388), *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) a été estimé et dans un second temps, l'ADN plasmidique des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325), *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328 amplifié) a été dosé.

Les résultats bruts de la vitesse de l'adhésion en 240 minutes des souches étudiées en fonction du contenu plasmidique ont été reportés en annexe 12. Les moyennes et les écarts types correspondants sont illustrés par le tableau 7.

Sur ce tableau, on peut voir que l'adhésion en 240 minutes augmente en même temps que la quantité d'ADN plasmidique. Il faut cependant noter que l'ADN dosé par la mesure de l'absorbance à 260 nm prend en compte une partie de l'ARN et de l'ADN chromosomique.

L'adhésion en présence du plasmide R388 dans les souches *Escherichia coli* K12 UB1832 contenant ou non les plasmides pCE est multiplié par un facteur 10 en même temps que la quantité d'ADN plasmidique passe de $(7.3 \pm 0.6) \mu\text{g d'ADN} \times 10^{-8}$ bactéries pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325) à $(10.2 \pm 0.2) \mu\text{g d'ADN} \times 10^{-8}$ bactéries pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325). Cette différence d'adhésion pouvant être due à la présence des pili conjugatifs du plasmide R388.

Comme on pouvait s'y attendre, en présence du plasmide pCE328 (qui ne code pas pour la protéine *Rep* régulatrice du nombre de copies), la quantité d'ADN plasmidique est plus importante qu'en présence du plasmide pCE325 (qui code pour la protéine *Rep*) avec respectivement (8.1 ± 0.1) et $(7.3 \pm 0.6) \mu\text{g d'ADN} \times 10^{-8}$ bactéries. Or le plasmide pCE328 (5.5 kb) est plus petit que le plasmide pCE325

Tableau 7 : Adhésion en 240 minutes (bactéries cm⁻²) en fonction du contenu plasmidique de la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur trois expériences différentes par souche).

Souches étudiées	Adhésion en 240 minutes	µg d'ADN x 10 ⁻⁸ bactéries
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (pCE325)	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^5$	7.3 ± 0.6
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (pCE328)	$(3.3 \pm 0.2) \times 10^5$	8.1 ± 0.1
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (pCE328 amplifié)	$(7.9 \pm 1.0) \times 10^5$	22.3 ± 1.2
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388)	$(23.9 \pm 4.8) \times 10^5$	9.5 ± 0.9
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325)	$(33.1 \pm 6.9) \times 10^5$	10.2 ± 0.8
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328)	$(55.6 \pm 5.2) \times 10^5$	12.4 ± 1.0

(7.3 kb), l'origine de transfert étant absente par rapport au plasmide pCE325. Donc le plasmide pCE328 est présent en plus grand nombre de copies au sein de la souche donatrice qui le contient.

L'augmentation de l'adhésion en 240 minutes avec la quantité d'ADN plasmidique est confirmée par l'amplification du plasmide pCE328. En effet, quand la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 contient le plasmide pCE328 amplifié, son adhésion en 240 minutes et sa quantité d'ADN plasmidique augmentent par rapport à cette même souche contenant le plasmide pCE328 non amplifié : l'adhésion en 240 minutes étant de $(3.3 \pm 0.2) \times 10^5$ bactéries cm^{-2} avec un contenu plasmidique de $(8.1 \pm 0.1) \mu\text{g}$ d'ADN $\times 10^{-8}$ bactéries pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) et de $(7.9 \pm 1.0) \times 10^5$ bactéries cm^{-2} avec un contenu plasmidique de $(22.3 \pm 1.2) \mu\text{g}$ d'ADN $\times 10^{-8}$ bactéries pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328 amplifié).

Le plasmide pCE328 et/ou son nombre de copies a donc une influence sur l'adhésion des souches donatrices et explique au moins partiellement la différence d'adhésion qui existe entre les souches donatrices *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328).

Le nombre de copies plus important du plasmide pCE328, fait que cette souche a un besoin énergétique supérieur pour maintenir ce plasmide, nous avons voulu savoir si d'une manière général, un état de déficit énergétique permettait une meilleure adhésion des bactéries. Pour cette étude, nous avons utilisé un inhibiteur métabolique, le DCCD : NN'dicyclohexylcarbodiimide (qui est un inhibiteur de l'activité ATPasique) pendant la croissance de la souche *Escherichia coli* K12 UB1832.

4.1.3.3.b-Influence du DCCD sur l'adhésion.

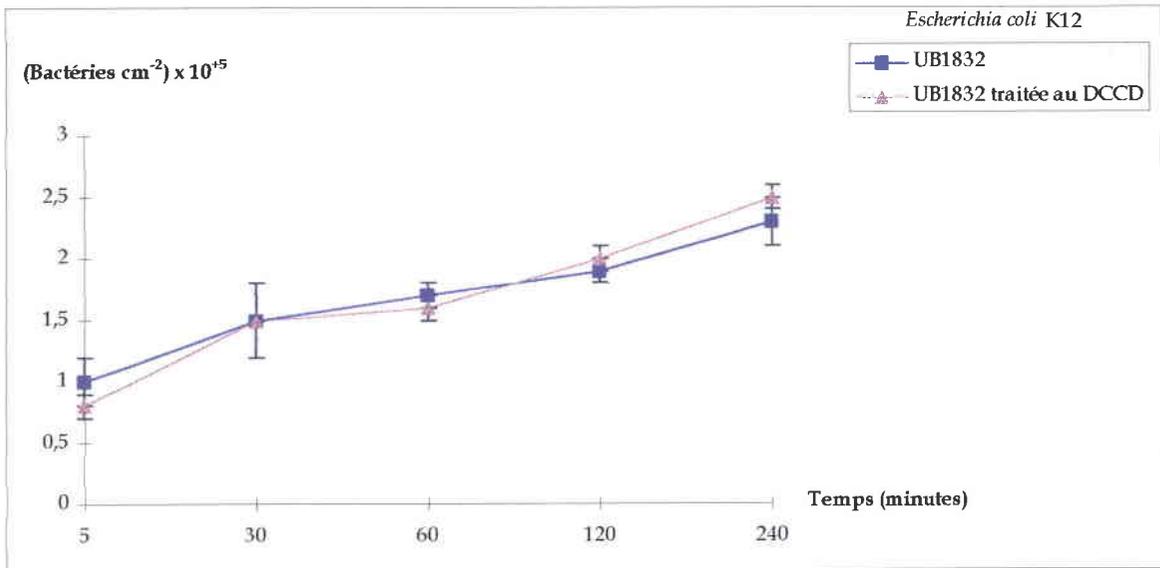
La cinétique d'adhésion de *Escherichia coli* K12 UB1832 traitée pendant sa croissance au NN' dicyclohexylcarbodiimide a été effectuée et comparée à cette même souche non traitée.

Les résultats bruts des cinétiques d'adhésion sont reportés en annexe 11. Les moyennes et les écarts types correspondants sont illustrés par la figure 20.

Cette figure nous montre que les cinétiques d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 traitée et non traitée sont semblables. De plus, si on compare la moyenne des pentes des cinétiques d'adhésion de la souche traitée et de la souche non traitée par le test de Welch, les moyennes des deux expériences réalisées en triplicat sont considérées comme égales avec un risque d'erreur de 5%. Le DCCD n'a donc pas d'influence sur l'adhésion de cette souche.

Les pastilles de silicone contrairement aux billes de verre sont des surfaces à faible énergie et elles sont beaucoup moins facilement colonisées que les surfaces à haute énergie (FLETCHER, 1992), ainsi nos mesures effectuées sur pastilles de silicone permettent la comparaison de l'adhésion des souches, mais ne reflètent pas réellement l'adhésion dans les réacteurs à biomasse fixée comportant un support de type bille de verre. La différence de fixation des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) au sein de biofilms de réceptrices semble être lié à la présence du plasmide pCE328 et/ou à son nombre de copies plus élevé. Et la présence du plasmide R388 multiplie d'un facteur 10 l'adhésion en 240 minutes des souches qui le contiennent. Cette adhésion plus importante en présence du plasmide R388 pourrait s'expliquer par la présence de pili codés par les souches donatrices qui contiennent le plasmide R388. Les pili permettant un contact entre les cellules, ils pourraient permettre un contact avec le support. Les plasmides pCE et R388 semble avoir une influence sur l'implantation des souches donatrices au sein de biofilms mixtes, or, la fréquence de transfert des

Figure 20 : Cinétiques d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 traitée et non traitée au DCCD. (DCCD = NN' dicyclohexylcarbodiimide). (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types obtenus pour trois expériences différentes par souche).



plasmides est liée à la fixation des donatrices au sein des biofilms, donc les plasmides auraient une influence sur leur propre transfert.

4.1.4-Analyse des transconjugants formés et de la stabilité des plasmides au sein des bactéries donatrices cultivées en biofilms mixtes à l'équilibre.

4.1.4.1-Analyse des transconjugants formés au sein de biofilms mixtes à l'équilibre.

Les transconjugants obtenus sur milieux gélosés sélectifs ont été dans un premier temps isolés une ou deux fois sur le milieu sélectif correspondant au transconjugant étudié (résistance à l'antibiotique codée par la souche réceptrice + résistance à l'antibiotique codée par le ou les plasmide(s)).

Dans un deuxième temps les antibio-résistances de chacun des transconjugants sont vérifiées séparément par réplique sur des milieux contenant les antibiotiques isolés (un par milieu) :

- rifampicine = résistance chromosomique codée par la souche donatrice, pour vérifier que le transconjugant étudié n'est pas une donatrice.
- chloramphénicol = résistance plasmidique codée par pCE325 et pCE328.
- triméthoprimé = résistance plasmidique codée par R388.
- kanamycine = résistance plasmidique codée par pUB2380.
- acide nalidixique = résistance chromosomique codée par la souche réceptrice.

Les résultats bruts concernant les plasmides cotransférés dans une même réceptrice sont reportés en annexe 13. Les moyennes et les écarts types des pourcentages correspondants sont illustrés par les figures 21-a et 21-b suivant les contextes génétiques étudiés.

Figure 21-a : Plasmides cotransférés dans une même réceptrice dans le contexte *tra⁺ mob⁺ oriT⁺*. (TC = transconjugants. Les pourcentages reportés correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur au moins trois expériences différentes).

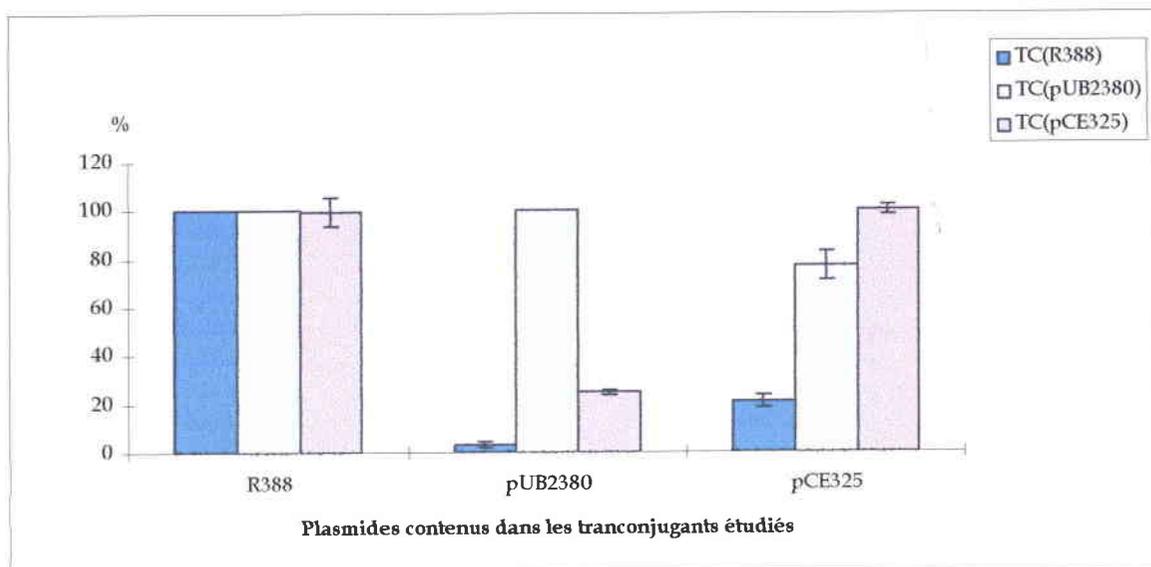
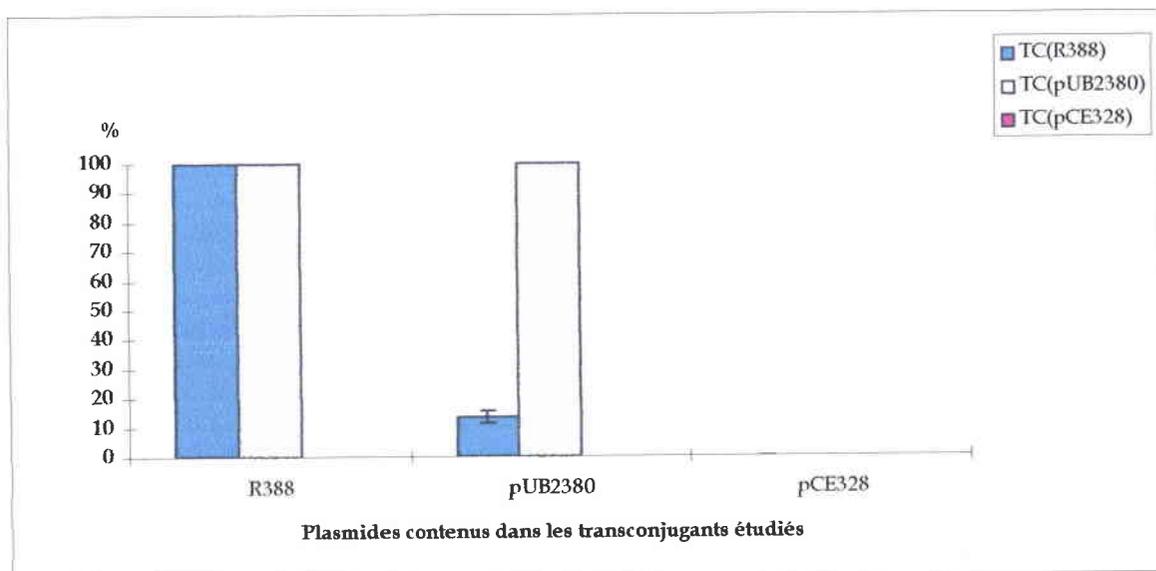


Figure 21-b : Plasmides cotransférés dans une même réceptrice dans le contexte *tra⁺ mob⁺ oriT⁺*. (TC = transconjugants. Les pourcentages reportés correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur au moins trois expériences différentes).



Ces figures indiquent que tous les transconjugants (pUB2380), contiennent le plasmide R388 (figures 21-a et 21-b). En effet, pour que le plasmide pUB2380 puisse être transféré, il faut le mettre en présence des gènes *tra* qui sont portés par le plasmide R388.

De même, les transconjugants (pCE325) ont également acquis le plasmide R388 à $(99 \pm 1)\%$ (figure 21-a).

Par contre peu de transconjugants (R388) ont acquis le plasmide pCE325 : $(21 \pm 3)\%$ (figure 21-a) et ils ont de plus rarement acquis le plasmide pUB2380 : $(3 \pm 1)\%$ (figure 21-a) et $(13 \pm 2)\%$ (figure 21-b).

Dans le contexte *tra⁺ mob⁺ oriT⁻* (figure 21-b), aucun plasmide pCE328 n'est transféré. Sa seule possibilité de transfert est de former un cointégrat avec le plasmide pUB2380 qui possède deux séquences inversement répétées (IR) de type transposon ou avec le plasmide R388 qui aurait acquis ces IR. Les seuls transconjugants supposés pCE328 obtenus étaient en fait des mélanges de bactéries donatrices et de bactéries réceptrices (annexe 13).

Dans les contextes *tra⁺ mob⁻ oriT⁺* et *tra⁺ mob⁻ oriT⁻*, c'est-à-dire en l'absence du plasmide pUB2380, seul le plasmide R388 est transféré.

4.1.4.2-Stabilité des plasmides au sein des bactéries donatrices cultivées en biofilms mixtes.

La stabilité des bactéries donatrices isolées après fractionnement des réacteurs à l'équilibre sur milieu gélosé sélectif et après un ou deux isollements sur milieu sélectif correspondant aux souches donatrices : milieu gélosé M. H. + rifampicine est vérifiée par réplique sur les milieux contenant les antibiotiques isolés (un par milieu) :

- acide nalidixique = résistance chromosomique codée par la souche réceptrice, pour vérifier que ce n'est pas un transconjugant.
- chloramphénicol = résistance plasmidique codée par pCE325 et pCE328.
- triméthoprimine = résistance plasmidique codée par R388.
- kanamycine = résistance plasmidique codée par pUB2380.
- rifampicine = résistance chromosomique codée par la souche donatrice.

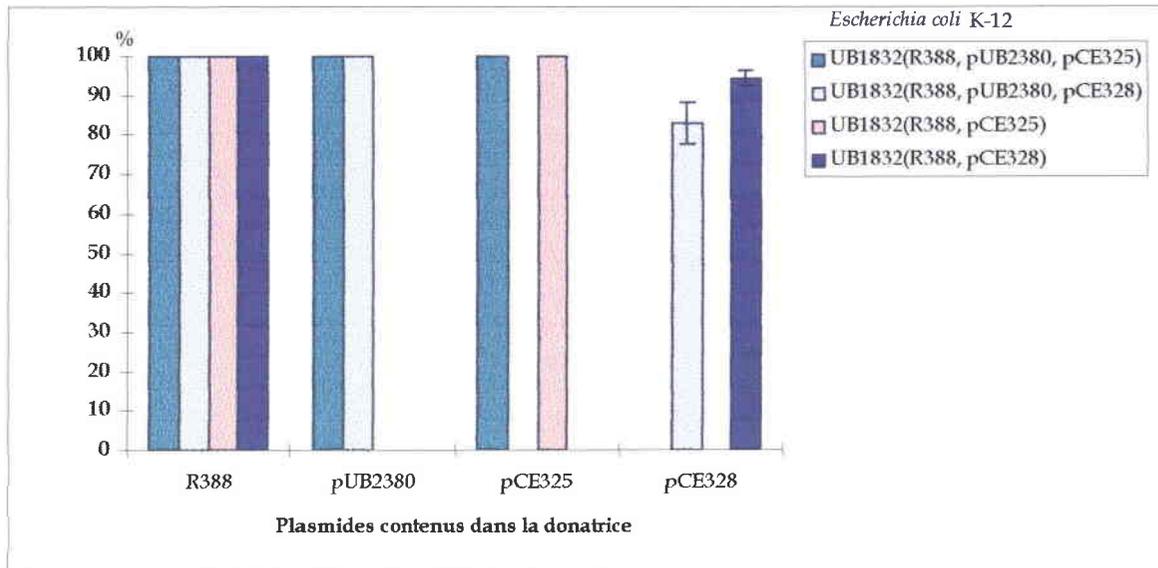
Les résultats bruts concernant la stabilité des bactéries donatrices au sein de biofilms bactériens mixtes à l'équilibre sont reportés en annexe 14. Les moyennes et les écarts types correspondants sont illustrés par la figure 22.

Sur cette figure, on peut voir que quel que soit le contexte génétique étudié : les plasmides R388, pUB2380 et pCE325 sont stables à 100%. Alors que le plasmide pCE328 n'est stable qu'à $(83 \pm 5)\%$ dans le contexte *tra⁺ mob⁺ oriT⁻* et $(94 \pm 2)\%$ dans le contexte *tra⁺ mob⁻ oriT⁻*.

Cette première partie nous montre que l'adhésion varie suivant le contenu plasmidique des donatrices. Un plus grand nombre de copies des plasmides pCE et les pili du plasmide R388 semblent permettre une meilleure adhésion des bactéries donatrices. La fréquence de transfert du plasmide R388 augmente avec le nombre de donatrices implantées au sein de biofilms mixtes. Les plasmides peuvent donc avoir une influence sur leur propre transfert. Notre système expérimental mettant en oeuvre la biomasse fixée en milieu aquatique permet la détection de transfert par mobilisation de plasmides *tra⁻ mob⁺ oriT⁺* (pUB2380) et *tra⁻ mob⁻ oriT⁺* (pCE325).

Le transfert du plasmide pCE328 n'a pas été observé quel que soit le contexte génétique étudié. Car n'ayant pas d'origine de transfert, il ne peut être transféré que par formation de cointégrat (transfert par conduction) avec le plasmide pUB2380 qui possède deux séquences inversement répétées (IR) de type transposon ou avec le

Figure 22 : Stabilité des plasmides contenus dans les donatrices au sein de biofilms mixtes à l'équilibre. (Les pourcentages reportés correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur au moins trois expériences différentes).



plasmide R388 s'il acquiert les IR de pUB2380. Et il semble que notre limite de détection ne soit pas assez importante pour obtenir ce type de transfert.

Nous avons donc décidé d'étudier ce type de transfert par conduction vers un mélange de 10 souches des boues où peuvent se trouver des éléments mobilisateurs comme les transposons.

4.2-TRANSFERT DU PLASMIDE RECOMBINANT pCE328 ENTRE *ESCHERICHIA COLI* K12 ET DES SOUCHES ISOLEES DE BOUES ACTIVEES AU SEIN DE REACTEURS A LIT FIXE ET EN REACTEURS "BATCH-SEQUENCES".

Les études de transfert du plasmide recombinant pCE328 vers des souches isolées des boues ont été réalisées dans deux systèmes expérimentaux différents représentatifs de stratégies de traitements biologiques d'eaux usées. Le premier système est le réacteur à lit fixe permettant la croissance en continu de la biomasse fixée sur billes de verre, la biomasse en suspension est éliminée du réacteur par lessivage. Le second système est un réacteur "batch-séquéncé" avec recyclage de biomasse, permettant la croissance de biomasse en suspension dont le temps de séjour dans le réacteur est supérieur au temps de séjour hydraulique.

Le transfert du plasmide recombinant à partir d'*Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) par des souches des boues et estimé comparativement au transfert du plasmide naturel autotransférable R388 utilisé comme référence.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés au choix des souches isolées des boues activées, dans un second temps au transfert du plasmide recombinant pCE328 au sein de réacteurs à lit fixe alimentés en continu et enfin au transfert de ce plasmide en réacteurs "batch-séquéncés".

4.2.1-Choix des souches issues des boues activées.

Dix souches provenant de la station d'épuration de Metz ont été sélectionnées pour servir de souches réceptrices sur des critères permettant une discrimination vis-à-vis des souches donatrices.

Ces réceptrices ont été sélectionnées pour leur capacité à dégrader le lactose les donatrices ne la possédant pas. Ensuite, un nouveau criblage a été effectué afin de garder les souches réceptrices qui étaient sensibles aux antibiotiques correspondants aux résistances des donatrices *Escherichia coli* K12 UB1832 contenant le plasmide pCE328 ou R388 : rifampicine, chloramphénicol et triméthoprime. Seules deux souches portent la résistance à la rifampicine. Et enfin, parmi ces dix souches des boues, nous avons sélectionné une souche *Escherichia coli*, car le plasmide pCE328 ne peut se répliquer que dans cette bactérie.

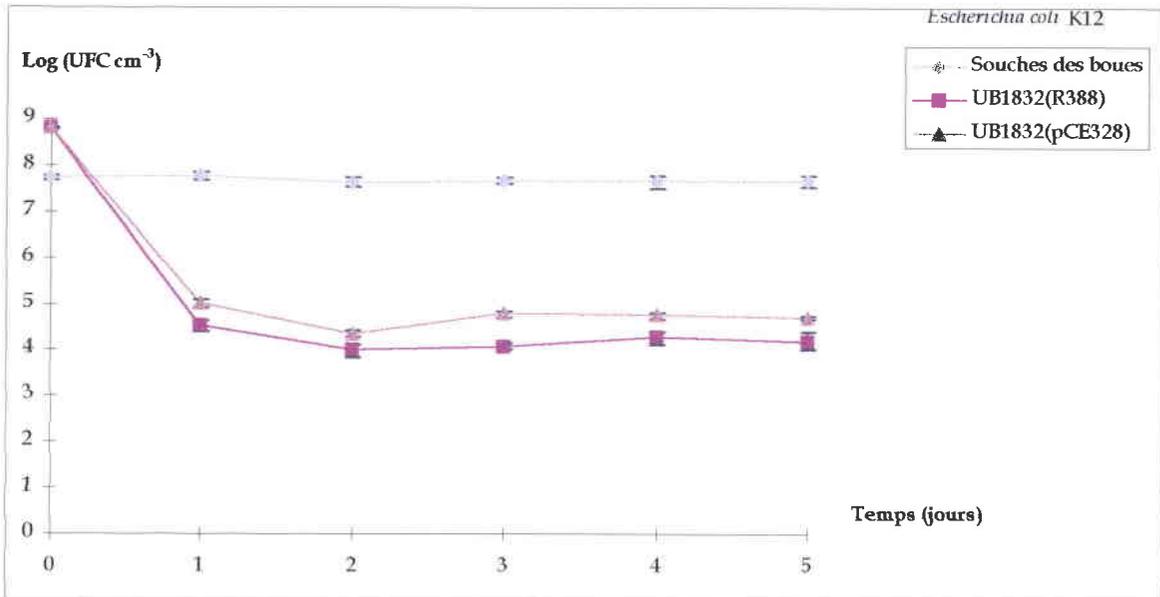
4.2.2-Survie des bactéries donatrices au sein de l'effluent d'un réacteur à biofilms : *Escherichia coli* et souches des boues.

Les bactéries donatrices *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) ou (R388) sont introduites (voir matériel et méthodes 3.5) dans un réacteur à lit fixe estimé à l'équilibre apparent et composé du mélange des 10 souches réceptrices (environ 10^8 bactéries cm^{-2}) isolées à partir des boues activées

Les résultats bruts concernant la survie des donatrices et des réceptrices au sein de l'effluent des réacteurs sont reportés en annexe 15. Les moyennes et les écarts types s'y rapportant sont illustrés par la figure 23.

Cette figure montre que les réceptrices restent stables après introduction des donatrices : environ 5×10^7 bactéries cm^{-3} . Les donatrices arrivent à s'implanter et se maintiennent toutes deux entre 10^4 et 10^5 UFC cm^{-3} .

Figure 23 : Bactéries donatrices et réceptrices dénombrées au sein de l'effluent des réacteurs à lit fixe contenant le mélange de 10 souches réceptrices isolées de boues activées et la souche donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) ou (pCE328). (UFC = unités formant colonie. Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour trois expériences par souche pour les donatrices et pour toutes les expériences pour les réceptrices).



La biomasse dénombrée dans l'effluent provenant du décrochage des bactéries de ces biofilms étant stable au bout de quelques jours (5jours) : 2×10^4 bactéries cm^{-3} pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) et 5×10^4 bactéries cm^{-3} pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328), nous avons considéré ces biofilms : donatrices + mélange de réceptrices dans un état d'équilibre apparent. Toutefois, l'équilibre des bactéries réceptrices est basé sur le mélange des réceptrices , donc les bactéries réceptrices dominantes.

A ce stade, nous nous sommes intéressés aux différentes populations fixées présentes au sein de ces réacteurs : donatrices, réceptrices et transconjugants.

4.2.3-Les différentes populations bactériennes fixées au sein des biofilms mixtes *Escherichia coli* - réceptrices des boues : analyse des transconjugants à l'équilibre .

Les biofilms bactériens à l'équilibre sont fractionnés en 9 parties (comme précédemment en 4.1.1.2) et les bactéries sont décrochées de leur support puis dénombrées par comptage des UFC sur milieux gélosés sélectifs correspondants aux souches donatrices, réceptrices présentes au sein des biofilms. Les transconjugants sont sélectionnés sur les milieux gélosés sélectifs contenant les antibiotiques de la souche réceptrice et du plasmide présent chez les donatrices et ils sont vérifiés après isolement par "Polymerase Chain Reaction" (PCR) avec des amorces spécifiques des plasmides R388 et pCE328.

Les résultats bruts des dénombrements de ces différentes populations bactériennes présentes au sein des réacteurs à lit fixe à l'équilibre sont reportés en annexe 16. Les moyennes et les écarts types correspondants sont illustrés par le tableau 8.

Dans ce tableau, le transfert par conjugaison du plasmide R388 a été mis en évidence, avec une fréquence apparente moyenne de $(9.3 \pm 2.9) \times 10^{-6}$ transconjugants

Tableau 8 : Les différentes populations bactériennes exprimées en UFC cm⁻² au sein de biofilms mixtes *Escherichia coli* - souches des boues. (UFC = unités formant colonie, N. D. = non détectées avec une limite de détection de 4.5×10^{-2} UFC cm⁻². Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types effectués sur trois expériences).

Les différentes populations bactériennes	Donatrice utilisée	
	<i>E. coli</i> K12 UB1832 (R388)	<i>E. coli</i> K12 UB1832 (pCE328)
Donatrices	$(1.8 \pm 0.5) \times 10^6$	$(3.2 \pm 1.0) \times 10^5$
Réceptrices	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^8$	$(3.1 \pm 1.7) \times 10^8$
Donatrices/Réceptrices	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	$(1.2 \pm 0.4) \times 10^{-3}$
Transconjugants	17 ± 9	N. D.
Transconjugants/Donatrices	$(9.3 \pm 2.9) \times 10^{-6}$	N. D.

par donatrice.

Les taux de croissance μ (h^{-1}) du mélange des 10 souches réceptrices isolées des boues, des bactéries donatrices *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) au sein de biofilms à l'équilibre ont été déterminés de la même manière que pour les biofilms purs *Escherichia coli* étudiés précédemment (partie 4.1.1.2). Les résultats bruts, les moyennes et les écarts types des bactéries fixées, des bactéries en suspension, ainsi que des taux de croissance ont été reportés en annexe 17. Les taux de croissance du mélange des 10 réceptrices, de la donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) sont respectivement : $(1.3 \pm 0.2) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, $(5.4 \pm 0.2) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ et $(5.0 \pm 0.3) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$. Le taux de croissance du mélange des réceptrices est en fait imposé par les populations réceptrices dominantes au sein des biofilms. Ce taux de croissance est comparable à celui de la réceptrice *Escherichia coli* K12 UB281 qui est de $(6.0 \pm 1.2) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, et le taux de croissance de la donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) est comparable à celui de la donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) qui est de $(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$. Les fréquences de transfert du plasmide R388 entre les souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB281 et entre les souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) et les 10 souches des boues peuvent donc être comparées, elles sont respectivement de 9×10^{-6} et de 4×10^{-3} transconjugants (R388) par donatrices. Cette différence d'un facteur 1000 pourrait s'expliquer par exemple, par la présence de plasmides naturels dans les souches des boues de même groupe d'incompatibilité que le plasmide R388.

Par contre, la mobilisation du plasmide pCE328 n'a pas été mise en évidence. Notre limite de détection n'étant pas suffisante ou les dix souches des boues ne contenant pas d'éléments mobilisateurs permettant la formation de cointégrats et le transfert par conduction.

Les rapports donatrices sur réceptrices sont 10 fois supérieurs en présence de la souche donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) qu'en présence de la souche

donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328), ce qui diminue encore les chances de mobiliser le plasmide pCE328 (tableau 8).

4.2.4-Transfert du plasmide recombinant pCE328 en réacteurs "batch-séquencés" avec recyclage de biomasse.

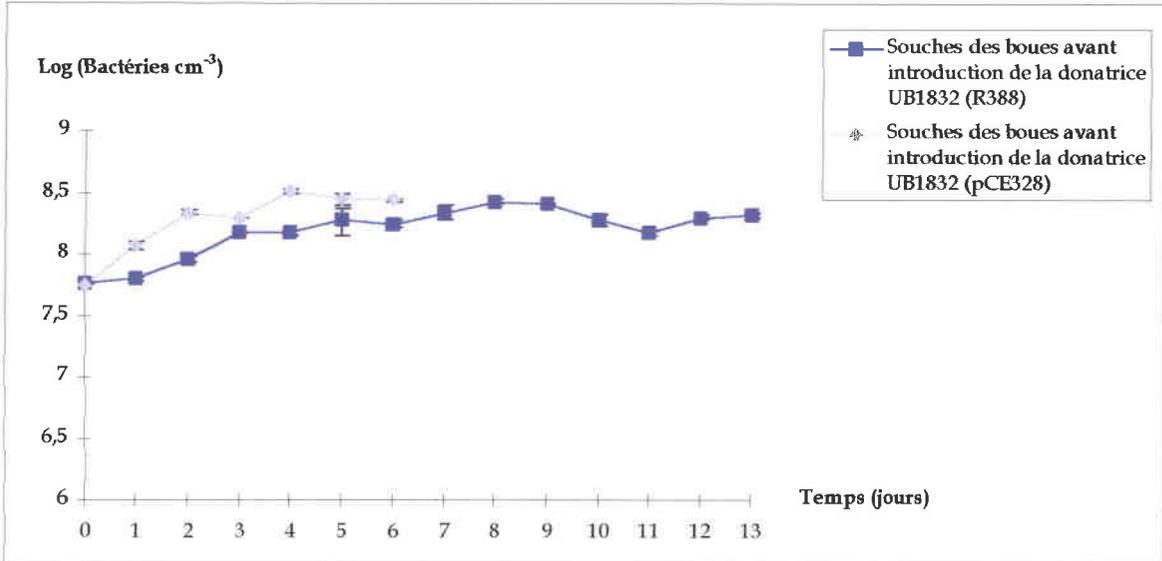
Cette partie concernant les réacteurs "batch-séquencés" a été réalisée en collaboration avec Anne-Marie SIMAO-BEAUNOIR. Ces réacteurs fonctionnent avec des temps de séjours théoriques qui sont de 3 et de 10 jours respectivement pour la phase liquide et la biomasse. L'apport d'éléments nutritifs et le recyclage de la biomasse sont effectués avec une périodicité de 24 heures.

Dans un premier temps, les bactéries originaires des boues sont suivies par mesure de la biomasse bactérienne par épifluorescence jusqu'à un équilibre apparent des réacteurs. Les résultats bruts de ces dénombrements sont reportés en annexe 18. Les moyennes et les écarts types correspondants sont illustrés par la figure 24.

Sur cette figure, le mélange de bactéries réceptrices se stabilise à environ 2×10^8 bactéries cm^{-3} .

Les bactéries donatrices sont introduites dans les réacteurs préalablement estimés à l'équilibre et contenant les réceptrices originaires des boues activées. Chaque jour des prélèvements sont effectués et les UFC sur milieux gélosés sélectifs correspondants aux souches donatrices et réceptrices présentes au sein des réacteurs "batch-séquencés" sont dénombrées par comptage. Les transconjugants sont sélectionnés sur les milieux gélosés sélectifs contenant les antibiotiques de la souche réceptrice et du plasmide présent chez les donatrices. Ils sont vérifiés par amplification par "Polymerase Chain Reaction" (PCR) d'une séquence spécifique des deux plasmides étudiés.

Figure 24 : Suivi du mélange des dix souches réceptrices isolées des boues activées dénombrées par épifluorescence au DAPI dans le réacteur "batch-séquenté" avant introduction des souches donatrices *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) et (pCE328). (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour deux expériences).



Les résultats bruts concernant les différentes populations bactériennes présentes en réacteurs "batch-séquencés" en fonction du temps, ainsi que les valeurs théoriques représentant le lessivage du réacteur dû au taux de dilution ont été reportés en annexe 19 pour les réacteurs contenant la souche donatrice porteuse du plasmide R388 et en annexe 20 pour les réacteurs contenant la souche donatrice porteuse du plasmide pCE328. Les moyennes et les écarts types correspondants sont illustrés par les figures 25-a et 25-b.

Sur ces figures, on peut voir que lorsque les bactéries donatrices sont introduites dans les réacteurs contenant les réceptrices isolées des boues activées, préalablement placés à l'équilibre, la compétition avec les réceptrices originaires des boues activées fait baisser la concentration des bactéries donatrices (pCE328) de 2 log en 20 jours (figure 25-a). Par contre la concentration de bactéries donatrices porteuses du plasmide R388 diminue de moins d'1 log en 20 jours, et cette diminution correspond au taux de dilution de la biomasse bactérienne (figure 25-b), cette donatrice ne se multiplie donc pas dans le réacteur.

Les bactéries réceptrices au sein des deux types de réacteurs "batch-séquencés" se stabilisent autour de 10^8 UFC cm^{-3} . Dans les réacteurs "batch-séquencés" en présence de la souche donatrice contenant pCE328, ce taux de 10^8 UFC cm^{-3} est conservé durant les 20 jours de l'expérience (figure 25-b). Par contre pour les réacteurs contenant la souche donatrice porteuse du plasmide R388, ce taux de 10^8 UFC cm^{-3} diminue à 10^6 UFC cm^{-3} après 2 et 3 jours pour finalement revenir à 10^8 UFC cm^{-3} à partir du cinquième jour et y rester jusqu'à la fin de l'expérience (figure 25-a).

Le transfert du plasmide conjugatif R388 est détecté dès le premier jour après l'introduction des donatrices avec une concentration en transconjugants de $(3.7 \pm 3.0) \times 10^2$ transconjugants. La proportion de ces transconjugants diminue ensuite jusqu'à ne plus être détectée après 20 jours (figure 25-a) et cette diminution est largement

Figure 25-a : Suivi des différentes populations bactériennes en réacteurs "batch-séquencés" : le mélange de 10 souches réceptrices isolées de boues activées et la donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388), ainsi que les transconjugants qui s'y forment. (UFC = unités formant colonie. Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour deux expériences).

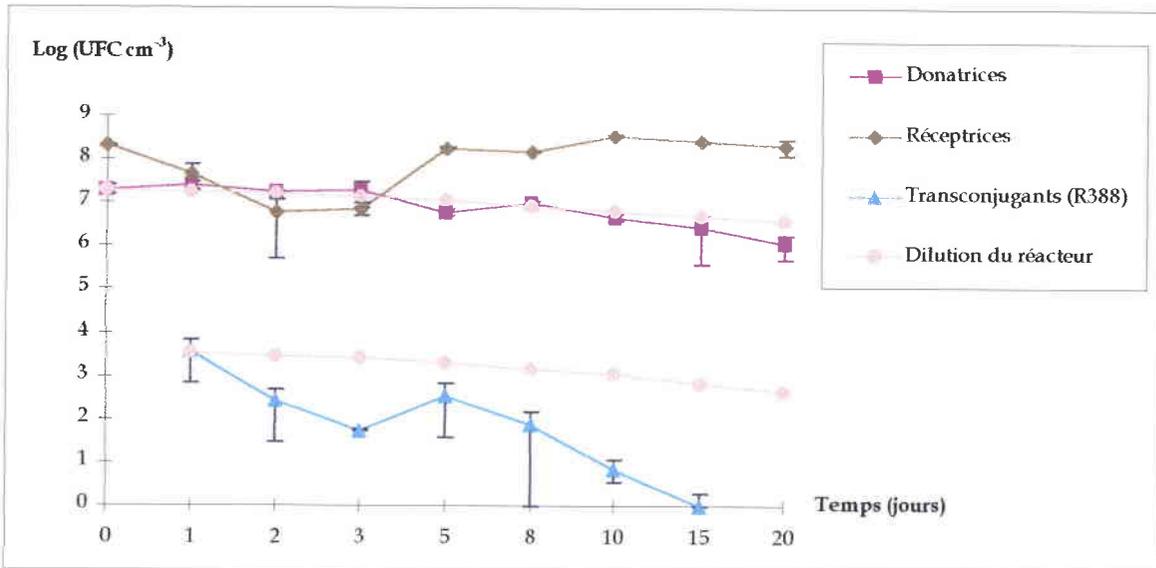
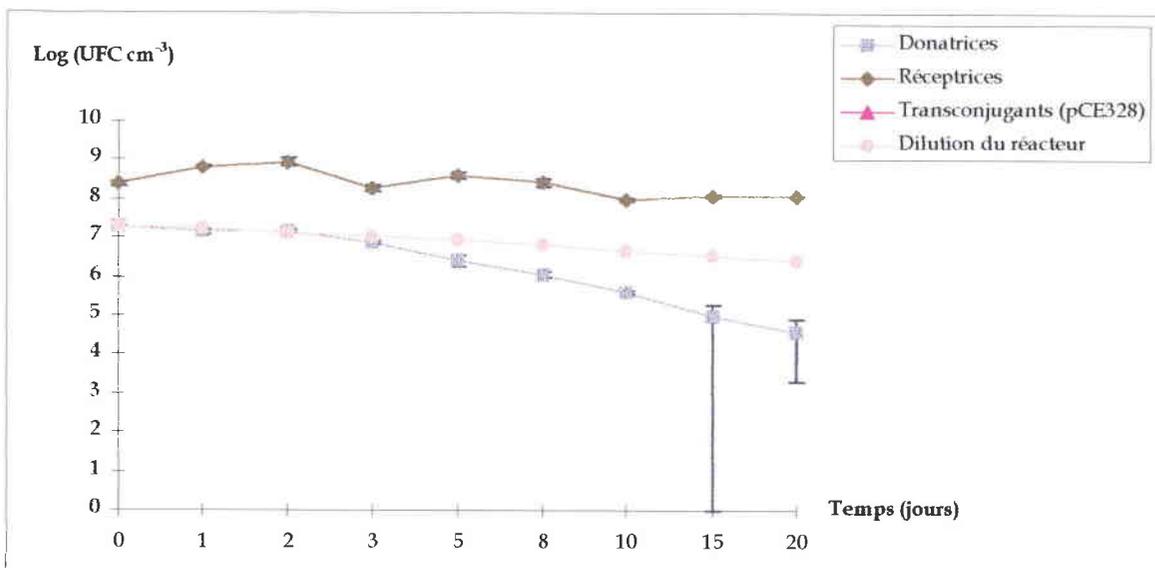


Figure 25-b : Suivi des différentes populations bactériennes en réacteurs "batch-séquencés" : le mélange de 10 souches réceptrices isolées de boues activées et la donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328), ainsi que les transconjugants qui s'y forment. (UFC = unités formant colonie. Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour deux expériences).



supérieure au taux de dilution dû au lessivage des réacteurs, le transconjugants R388 ne se maintient donc pas dans le réacteur.

Tout comme au sein des réacteurs à lit fixe, la mobilisation du plasmide recombinant pCE328 n'a pas été détectée (figure 25-b).

96 à 102 transconjugants (R388) ont été vérifiés par PCR avec des amorces spécifiques : figure 26-a. Des supposés transconjugants sélectionnés sur les milieux sélectifs pour les transconjugants pCE328 ont également été vérifiés par amplification par PCR avec les amorces spécifiques de pCE328 et n'ont donné que des résultats négatifs : figure 26-b.

La mobilisation du plasmide pCE328 n'ayant pu être mise en évidence, nous avons recherché la mobilisation de ce plasmide sur boîtes de Pétri, non plus avec quelques souches isolées des boues mais en utilisant comme éléments mobilisateurs la biomasse totale de boues activées susceptible de contenir des éléments mobilisateurs.

4.3-MOBILISATION DE PLASMIDES RECOMBINANTS PAR LA BIOMASSE DE BOUES ACTIVEES SUR BOITES DE PETRI.

La dissémination du plasmide pCE328 (*tra⁻ mob⁻ oriT⁻*) a été étudiée comparativement à celle du plasmide mobilisable pCE325 (*tra⁻ mob⁻ oriT⁺*). Trois contextes de transfert de ces plasmides recombinants ont été étudiés sur boîtes de Pétri afin de prendre en compte les différentes potentialités de mobilisation par donation et par conduction des boues activées : tableau 2 (Matériel et méthodes 3.7). Une souche réceptrice a été spécialement construite pour cette étude.

Figure 26-a : Amplification d'ADN par PCR des clones isolés sur les milieux sélectifs des transconjugants R388 (a). (PCR = "polymerase chain reaction. Les amorces spécifiques du plasmide R388 sont présentées dans Matériel et Méthodes (3.13). Ligne a : marqueur de poids moléculaire, échelle de 100 paires de bases, lignes b à g : clones supposés contenir le plasmide R388, ligne h : témoin positif = souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388), ligne i : témoin négatif = souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328)).

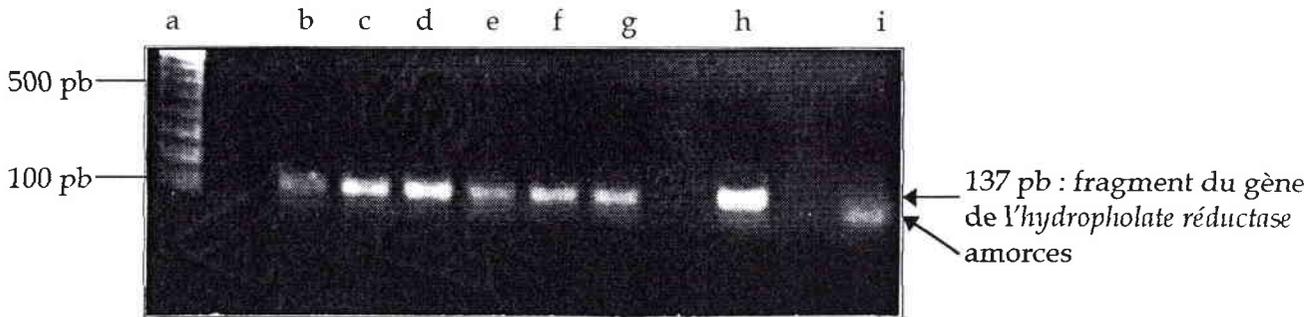
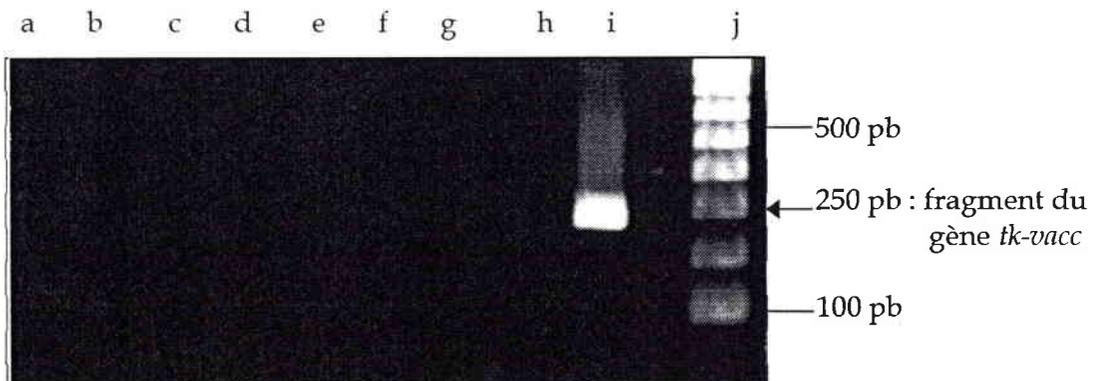


Figure 26-b : Amplification d'ADN par PCR des clones isolés sur les milieux sélectifs des transconjugants pCE328 (a). (PCR = "polymerase chain reaction". Les amorces spécifiques du plasmide pCE328 sont présentées dans Matériel et Méthodes (3.13). Lignes a à g : clones supposés contenir le plasmide pCE328, ligne h : témoin négatif = souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388), ligne i : témoin positif = souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328), ligne j : marqueur de poids moléculaire = échelle de 100 paires de bases).



4.3.1-Construction de la souche réceptrice : *Escherichia coli* K12 UB1832 :: *lux* AB.

La souche *Escherichia coli* K12 UB1832 :: *lux* AB a été construite par Pierre GENEVAUX. Sa construction a été réalisée par transduction généralisée avec le bactériophage P1*vir*, afin d'introduire dans la souche *Escherichia coli* K12 UB281 au niveau de l'opéron xylose, les gènes *lux* AB codant pour l'hétérodimère de l'enzyme de la luciférase initialement présents dans la souche *Escherichia coli* DH1 LF 20156 Cette souche nous a été fournie par le professeur Michael DuBow (Université Mc Gill, Montréal, Canada).

Les gènes *lux* AB introduit dans la souche réceptrice permettront une meilleure vérification des transconjugants par une mesure de production de lumière (induite par le xylose) sur des films autoradiographiques à l'obscurité en plus de la sélection sur milieux sélectifs contenant les antibiotiques de la souche réceptrice et des plasmides présents et de la vérification par hybridation sur colonies et analyse du contenu plasmidique sur gel d'électrophorèse, "Southern-blot" et hybridation avec la sonde "tk-vacc". De plus, cette souche réceptrice est xylose ⁻, alors que les souches donatrices utilisées sont xylose ⁺.

4.3.2-Transfert des plasmides recombinants dans les différents contextes étudiés.

Trois contextes de transfert sur boîtes de Pétri ont été étudiés et sont résumés dans le tableau 2 (Matériel et méthodes 3.7). La première situation de transfert est le transfert diparental : deux souches *Escherichia coli* K12 sont utilisées comme réceptrice et comme donatrice avec les éléments mobilisateurs *tra* et *mob* apportés par les plasmides R388 (*tra* ⁺) et pUB2380 (*mob* ⁻) présents dans la souche réceptrice. Les deux autres contextes de transferts triparentaux sont effectués en présence des boues activées en plus des souches réceptrice et donatrice et avec ou sans les éléments mobilisateurs dans la souche réceptrice.

Les résultats des différentes populations bactériennes obtenues après transfert sur boîtes de Pétri à partir de la donatrice contenant pCE325 sont illustrés par le tableau 9-a.

En ce qui concerne le transfert du plasmide recombinant pCE325, il s'effectue uniquement vers les souches réceptrices *Escherichia coli* K12 UB281 contenant les plasmides R388 et pUB2380 : 1.0×10^4 transconjugants par donatrice (contexte 1) et ce taux de transfert diminue d'un facteur 10 en présence des boues activées : 3.5×10^{-5} transconjugants par donatrice (contexte 3).

Les souches transconjugantes pCE325 vérifiées possèdent les gènes *lux* AB de la souche réceptrice, car elles émettent de la lumière sur des films autoradiographiques (figure 27-a) et de plus elles possèdent le plasmide pCE325, car les colonies hybrident avec la sonde "tk-vacc" (figure 27-b). L'analyse des extraits plasmidiques obtenus à partir de ces clones par électrophorèse puis "Southern-blot" et hybridation avec la sonde "tk-vacc" indique une hybridation au niveau d'une bande dont la taille correspond au plasmide pCE325 (figures 28-a et 28-b). Seul un clone (f) présente une bande plasmidique dont la taille est inférieure de 1.25 fois à celle de pCE325 et qui toutefois hybride avec la sonde "tk-vacc". Les hybridations observées au-dessus et au-dessous de la bande du plasmide pCE325 peuvent s'expliquer par la présence d'ARN messager correspondant au gène "tk-vacc".

Les différentes populations bactériennes obtenues sur boîtes de Pétri en présence de la donatrice (pCE328) sont illustrées par le tableau 9-b.

Le transfert par conduction vers les souches réceptrices du plasmide recombinant pCE328 ou vers les souches des boues du plasmide recombinant pCE328 n'a pas été observé quel que soit le contexte de transfert (présence ou non des plasmides mobilisateurs R388 et pUB2380 et présence ou non des boues activées), malgré des limites de détection allant jusqu'à 6.4×10^{-9} transconjugants par donatrices.

Tableau 9-a : Les différentes populations bactériennes en UFC cm⁻³ présentes sur boîtes de Pétri après transfert du plasmide pCE325 dans les 3 contextes étudiés. (R = réceptrices, D = donatrices, B= boues activées, TC = transconjugants, N. D. = non détectés avec une limite de détection = L. D. exprimée en transconjugants détectables par donatrice).

Contextes étudiés	Transfert par donation du plasmide pCE325					
	R	D	B	TC	TC/D	L. D. (TC/D)
1	2.2 x 10 ⁹	3.5 x 10 ⁶	/	350	1.0 x 10 ⁻⁴	9.5 x 10 ⁻⁸
2	8.0 x 10 ⁸	8.0 x 10 ⁷	4.7 x 10 ⁷	N. D.	N. D.	4.2 x 10 ⁻⁹
3	3.3 x 10 ⁹	2.0 x 10 ⁵	7.0 x 10 ⁸	7	3.5 x 10 ⁻⁵	1.7 x 10 ⁻⁶

Tableau 9-b : Les différentes populations bactériennes en UFC cm⁻³ présentes sur boîtes de Pétri après transfert du plasmide pCE328 dans les 3 contextes étudiés. (R = réceptrices, D = donatrices, B= boues activées, TC = transconjugants, N. D. = non détectés avec une limite de détection = L. D. exprimée en transconjugants détectables par donatrice).

Contextes étudiés	Transfert par donation du plasmide pCE328				
	R	D	B	TC/D	L. D. (TC/D)
1	5.0 x 10 ⁸	7.0 x 10 ⁶	/	N. D.	4.8 x 10 ⁻⁸
2	7.0 x 10 ⁸	5.2 x 10 ⁷	9.0 x 10 ⁸	N. D.	6.4 x 10 ⁻⁹
3	6.0 x 10 ⁸	2.0 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁹	N. D.	1.7 x 10 ⁻⁷

Figure 27-a: Vérification de l'expression des gènes *luxAB* pour les clones supposés transconjugants pCE325 des contextes de transfert 1 et 3. (contrôle positif = souche *Escherichia coli* K12 UB281 ::*lux AB*, contrôle négatif = souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325)).

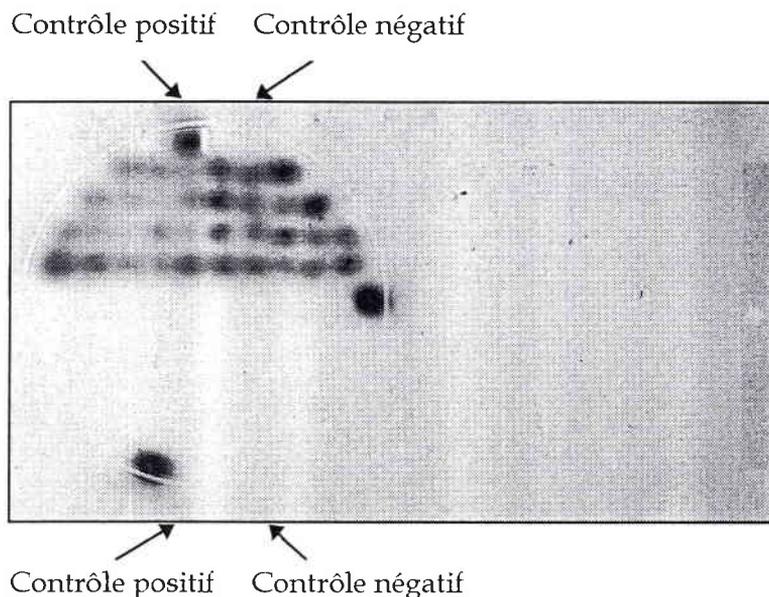


Figure 27-b: Hybridation sur colonies avec la sonde "tk-vacc" des clones supposés transconjugants pCE325. (Le quart supérieur gauche correspond aux contrôles positifs = *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325), le quart supérieur droit correspond aux contrôles négatif = *Escherichia coli* K12 UB281 et la moitié inférieure correspond aux clones supposés transconjugants pCE325 : les 35 premiers clones répondant positivement correspondent aux contextes de transfert 1 et 3, les 17 clones suivants répondant négativement correspondent au contexte de transfert 2).

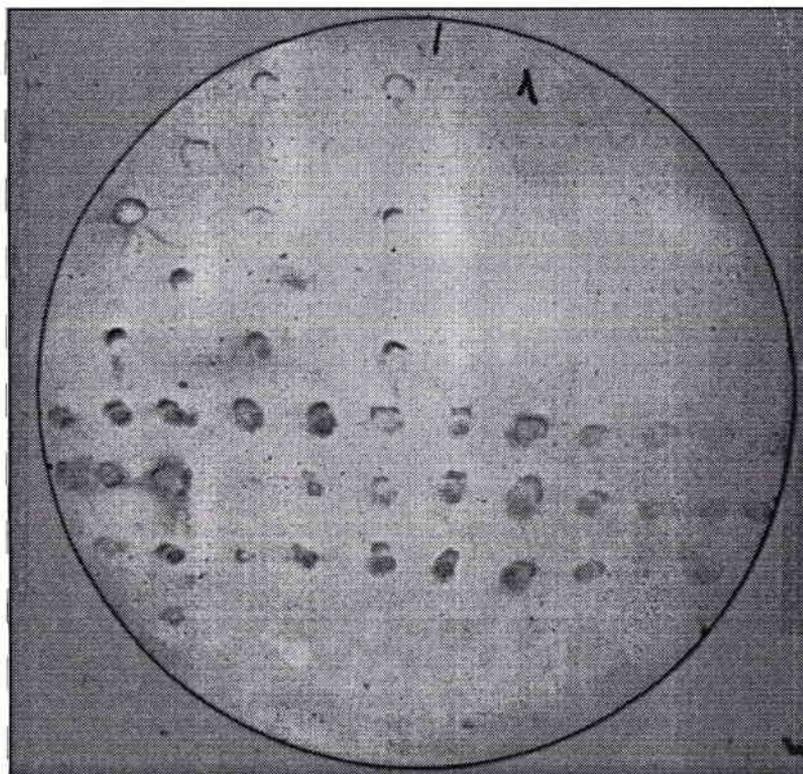


Figure 28-a : Electrophorèse des extraits plasmidiques réalisés à partir des clones supposés transconjugants pCE325 dans les contextes de transfert 1 et 3. (lignes a à k : clones supposés transconjugants pCE325, ligne l : contrôle positif = *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325), ligne m : contrôle négatif = *Escherichia coli* K12 UB281 :: *lux* AB (R388, pUB2380), ligne n : marqueur de poids moléculaire = λ digéré par *Hind* III et *Eco* RI).

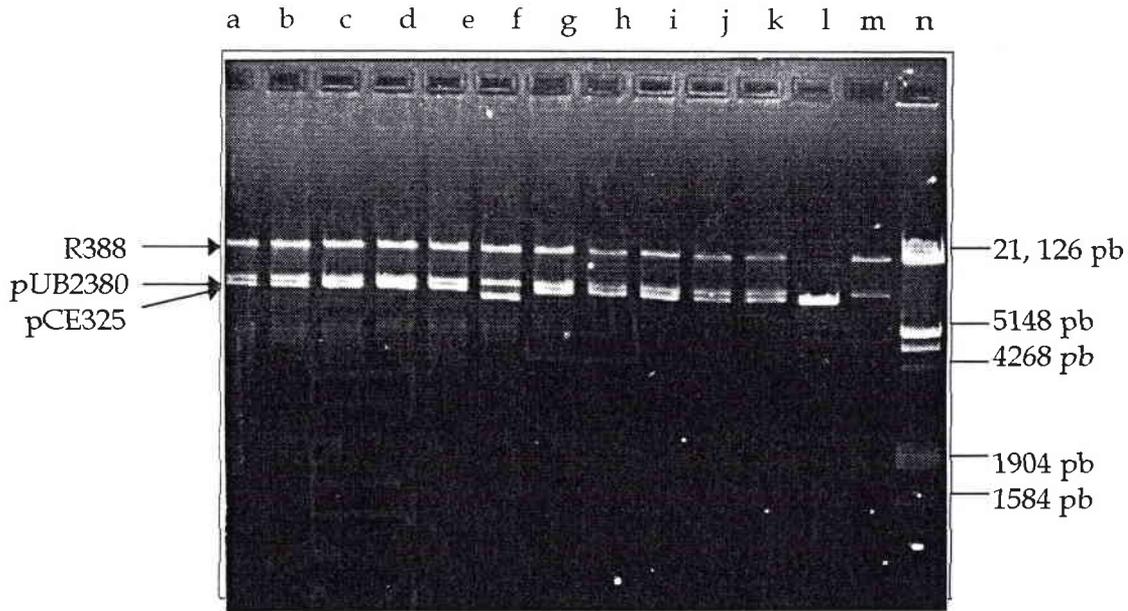
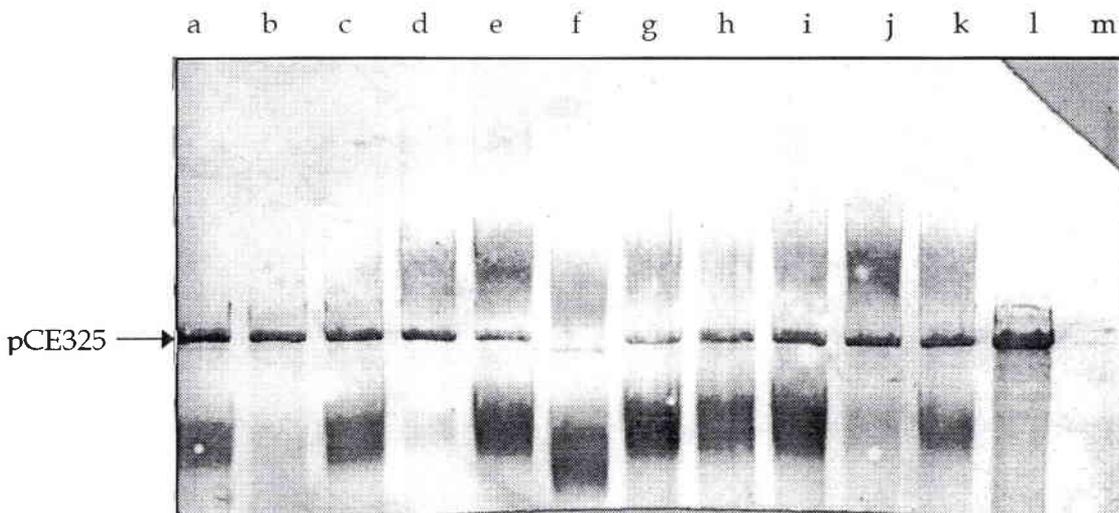


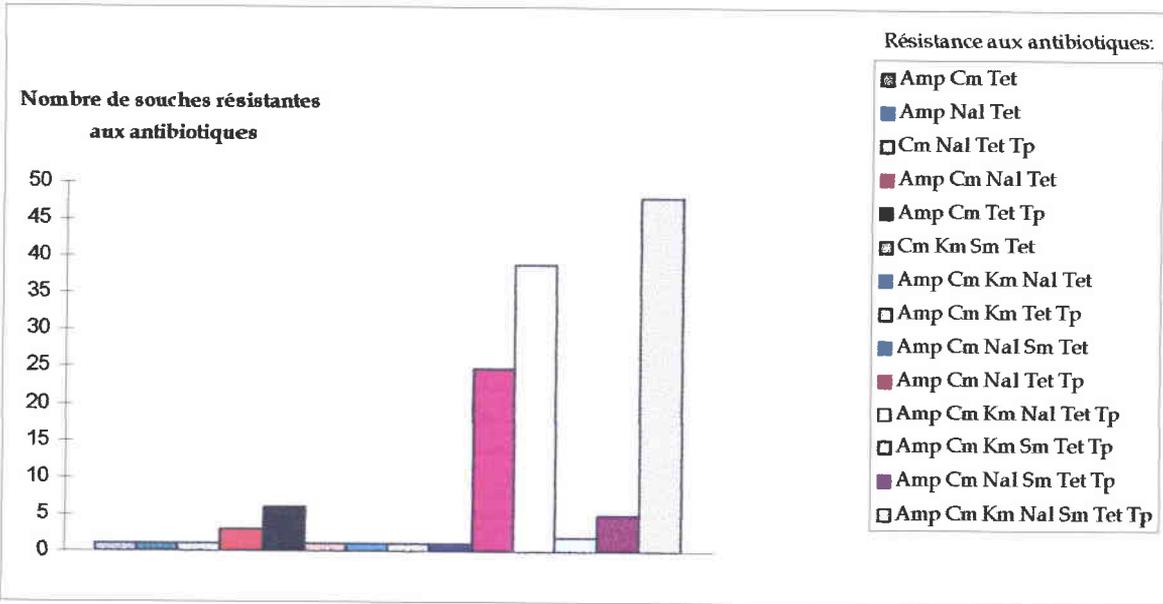
Figure 28-b : "Southern-blot" sur l'extraction plasmidique des clones supposés transconjugants pCE325 des contextes de transfert 1 et 3, hybridation avec la sonde "tk-vacc". (lignes a à k : clones supposés transconjugants pCE325, ligne l : contrôle positif = *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325), ligne m : contrôle négatif = *Escherichia coli* K12 UB281 :: *lux* AB (R388, pUB2380)).



Les supposés transconjugants (pCE328) isolés sur milieux sélectifs ont tous répondu négativement au test des gènes *luxAB* et n'ont pas hybridé avec la sonde "tk-vacc". Ces souches ont été testées sur les 7 résistances aux antibiotiques suivantes : ampicilline, chloramphénicol, kanamycine, acide naladixique, streptomycine, tétracycline et triméthoprim. Les résultats correspondants ont été reportés sur la figure 29.

Cette figure montre que les supposés transconjugants (pCE328) sont en fait des souches des boues multirésistantes aux antibiotiques. Sur les 135 souches étudiées, 122 possèdent au moins 5 résistances aux antibiotiques testés et 94 au moins 6 résistances aux antibiotiques testés.

Figure 29: Les multirésistances des clones supposés transconjugants pCE328 obtenus dans les contextes de transfert 2 et 3. (Amp = ampicilline, Cm = chloramphénicol, Km = kanamycine, Nal = acide nalidixique, Sm = streptomycine, tet = tétracycline, Tp = trimétoprime. 135 clones supposés transconjugants ont été testés).



5) DISCUSSION :

Le transfert de plasmides à ADN recombiné (ADN_r) a été étudié dans différentes situations : le réacteur à lit fixe alimenté en continu (transfert entre deux souches *Escherichia coli* et entre *Escherichia coli* et 10 souches isolées de boues activées de station d'épuration) et le réacteur "batch-séquencé" avec recyclage de biomasse (transfert entre *Escherichia coli* et 10 souches isolées de boues activées de station d'épuration). Le transfert de plasmides à ADN_r a également été étudié sur boîtes de Pétri entre deux souches *Escherichia coli* et en présence ou non de la biomasse totale des boues activées. Ces études de transfert ont été faites en présence de divers éléments mobilisateurs : gènes *tra* et *mob*, séquences d'insertion (IS) déjà identifiées et/ou en présence des souches isolées ou de populations naturelles issues de boues activées susceptibles de les contenir.

Les résultats de transfert obtenus dans ces microcosmes en présence de divers éléments "helpers" sont discutés en trois parties concernant respectivement :

- Le transfert de plasmides à ADN_r entre deux souches *Escherichia coli* au sein de réacteurs à lit fixe alimentés en continu.
- Le transfert de plasmides à ADN_r entre *Escherichia coli* et 10 souches isolées de boues activées au sein des deux microcosmes : réacteur à lit fixe alimenté en continu et réacteur "batch-séquencé" avec recyclage de biomasse.
- La mobilisation de plasmides à ADN_r dans différents contextes génétiques sur boîtes de Pétri.

5.1-Le transfert de plasmides à ADN_r entre deux souches *Escherichia coli* au sein de réacteurs à lit fixe alimentés en continu.

Nos expériences préliminaires, ont permis d'étudier la mobilisation de deux plasmides à ADN_r (pCE325 et pCE328) entre deux souches d'*Escherichia coli* en contrôlant les éléments mobilisateurs présents chez la donatrice dans un réacteur à lit fixe. Elles ont montré que nos conditions expérimentales permettaient de produire et de détecter des transferts génétiques par conjugaison (R388) et par mobilisation (pUB2380 et pCE325). La mobilisation du

plasmide pCE325 a également été mise en évidence dans le tube digestif de souris axéniques (DUVAL-IFLAH *et al.*, 1994) et dans le sol (Rapport Chimie et Ecologie, 1993) avec respectivement des fréquences de 10^{-4} à 10^{-3} et de 10^{-6} transconjugants par donatrice. Les bactéries étant plus ou moins fixées dans ces trois cas de transfert, les différences de fréquences de transfert dans ces trois microcosmes pourraient s'expliquer par des concentrations en nutriments qui augmentent avec les fréquences de transfert. Mais également par des températures et des pH favorables.

Lors de l'analyse des transconjugants R388 sélectionnés dans le contexte de transfert *tra* + *mob* + *oriT* +, on s'est aperçu que les transconjugants R388 contenaient tous le plasmide R388, mais que seulement 21% et 3% de ces souches contenaient respectivement le plasmide pCE325 et le plasmide pUB2380. Le plasmide pUB2380 est donc moins bien transféré que le plasmide pCE325. Or, le plasmide pCE325 a une taille de 7.3 kb et le plasmide pUB2380 a une taille de 8.6 kb, il est possible que la fréquence des transferts par mobilisation diminue lorsque la taille du plasmide mobilisé augmente, parce que cela nécessite peut être une durée de vie plus longue du couple donatrice - réceptrice. C'est la durée de vie de ce couple qui limite le transfert d'ADN chromosomique à partir de souches HFr possédant un plasmide F intégré au niveau du chromosome. Cette différence de fréquence de transfert entre pUB2380 et pCE325 pourrait aussi être liée à des différences au niveau du nombre de copies des deux plasmides. Pour vérifier cette hypothèse du nombre de copies des plasmides pCE325 et pUB2380, il serait intéressant de faire un dosage plasmidique des différents plasmides contenus dans la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE325), ou encore d'utiliser des mutants à différents nombres de copies pour observer l'influence du nombre de copies sur la fréquence de transfert.

L'évaluation des transconjugants R388 obtenus à différents rapports donatrices par réceptrice met en évidence l'augmentation linéaire du logarithme du nombre de transconjugants par réceptrices en fonction du logarithme du rapport donatrices par réceptrice, confirmant les données de FRY & DAY (1990) pour le transfert du plasmide conjugatif pQM1 entre deux souches de *Pseudomonas*. Des pentes équivalentes ont été observées dans les deux cas. Ainsi, le nombre de transconjugants formés augmente avec le nombre de donatrices implantées au sein des biofilms mixtes *Escherichia coli*. De plus, nous

avons observé que l'implantation des bactéries donatrices variaient suivant leur contenu plasmidique, les plasmides auraient donc une influence sur leur propre transfert.

Si l'on considère le transfert du plasmide autotransférable R388 au sein des divers microcosmes dans lesquels il a été étudié : le tube digestif de souris, la biomasse fixée, le sol, les eaux usées, l'eau douce et l'eau de mer (Rapport Chimie et Ecologie, 1993), on peut en déduire l'influence de certains facteurs sur le transfert de ce plasmide. En effet les transconjugants R388 au sein des tubes digestifs de souris sont détectés et s'implantent très bien jusqu'à devenir la population dominante (10^9 UFC g^{-1} de fèces). Car, la présence d'une surface à coloniser et l'apport de nutriments, une température de $37^{\circ}C$ favorable à la croissance d'*Escherichia coli* et le fait que ce soit un milieu naturel des souches *Escherichia coli* permet une forte implantation des donatrices, donc un transfert plus fréquent. Les transconjugants R388 sont également détectés au niveau de l'effluent et des biofilms des réacteurs à lit fixe, ainsi qu'au sein du microcosme sol, ce qui suggère encore l'importance d'un support pour la fixation des bactéries. Par contre les transconjugants R388 ne sont même pas détectés au sein des microcosmes aquatiques, où les nutriments sont moins importants (au plus 114 mg par litre de carbone organique dissous) et le support inexistant, si ce n'est la paroi des récipients utilisés. Le support de fixation des bactéries pourrait avoir une influence sur le maintien dans un système ouvert des cellules porteuses de plasmide (DE TAXIS DU POET *et al.*, 1987), mais aussi indirectement sur le transfert, car les bactéries fixées sont en contact les unes des autres, favorisant ainsi la formation des couples donatrice - réceptrice, donc le transfert par conjugaison. Les nutriments favorisent aussi le transfert, la conjugaison étant un mécanisme énergie dépendant (LEBARON *et al.*, 1993). La non détection des transconjugants dans les milieux aquatiques sans support de fixation peut également être due à la nature des pili conjugatifs codés par le plasmide R388 et qui sont des pili rigides. Ces pili rigides plus cassants sont moins efficaces pour la conjugaison en milieu liquide qu'en milieu solide (LEBARON *et al.*, 1993). En milieu marin, une forte salinité et une faible température sont des conditions de stress qui peuvent gêner le processus de la conjugaison (COMBARRO *et al.*, 1992). Il est possible, qu'en milieux aquatiques comme le milieu marin, que la transduction soit un mécanisme de transfert horizontal d'ADN plus

important que la conjugaison, des expériences effectuées en conditions non stériles en milieu marin ayant permis d'observer des transferts par transduction (SAYE *et al.*, 1987).

L'étude de la stabilité des plasmides portés par les bactéries donatrices au sein des biofilms mixtes *Escherichia coli* a montré que seul le plasmide pCE328 montrait une faible instabilité ségrégationnelle. Une autre étude portant sur la stabilité de ce plasmide ainsi que des plasmides pCE325 et R388 a été réalisée dans différentes souches hôtes : *Escherichia coli* K12 UB1832, UB1636, UB281. La stabilité a été étudiée à partir de bactéries en suspension cultivées en milieu non renouvelé (type "batch") et fixées sur un support et cultivées en continu (type biofilm). En système "batch", les résultats montrent une parfaite stabilité des plasmides étudiés dans les souches choisies. Dans le microcosme biofilm, seul le plasmide pCE325 contenu dans la souche UB281 apparaît instable. Cette instabilité de pCE325 dans la souche UB281 a de plus été étudiée au sein de biofilms alimentés par un effluent contenant différentes concentrations en matières organiques. Cela a permis de mettre en évidence le fait que l'instabilité augmente avec le taux de croissance de la biomasse fixée, ce qui plaide en faveur d'une instabilité ségrégationnelle du plasmide pCE325 dans la souche UB281 (Rapport Chimie et Ecologie, 1993).

Les études des cinétiques d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 contenant ou non les plasmides pCE325 ou pCE328 et les souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) contenant ou non les plasmides pCE325 ou pCE328 ont montré que les souches contenant le plasmide R388 adhéraient 10 fois plus et que l'adhésion était plus forte en présence du plasmide pCE328 qu'en présence du plasmide pCE325. Cette différence d'adhésion en présence du plasmide R388, peut s'expliquer par le fait que le plasmide R388 code pour la synthèse d'un pilus (VALENTINE & KADO, 1989) et que ce type de pilus conjugatif peut augmenter le taux d'adhésion sur des surfaces inanimées. En effet, les pili permettent le contact entre les cellules bactériennes, et dans des cas particuliers, l'agrégation de biomasse sur elle-même sert de matrice d'immobilisation (KLEIN & ZIEHR, 1990). Si ces agrégats se fixent sur un support, ils pourraient augmenter le nombre de bactéries fixées. De la même manière que le pilus permet l'adhésion d'une cellule à une autre, il pourrait permettre l'adhésion sur un support. De plus, des expériences de mutations au niveau des

gènes codant pour les appendices protéiques comme les flagelles et les fimbriae ont montré qu'ils interviennent au niveau de l'adhésion de certaines souches bactériennes *Escherichia coli* (SHI *et al.*, 1992 ; SAARELA *et al.*, 1995). Les pili conjugatifs étant également des appendices protéiques, ils pourraient intervenir dans l'adhésion des souches qui les synthétisent. Il serait donc intéressant d'effectuer des expériences de mutations sur les gènes du plasmide R388 qui codent pour le pilus et/ou d'étudier l'adhésion de différentes souches portant ou non des plasmides conjugatifs codants pour les différents pili (rigide et flexible).

Dans nos expériences de transfert au sein de biofilms mixtes *Escherichia coli*, le transfert du plasmide pCE328 n'a pu être détecté. Cette non détection du transfert par conduction du plasmide pCE328 indique une fréquence trop faible concernant la formation d'un cointégrat du plasmide pCE328 avec le plasmide mobilisable pUB2380 ou le plasmide conjugatif R388, pour être détectée (des séquences inversement répétées (IS) étant présentes sur le plasmide pUB2380 et la transposition du plasmide pUB2380 ayant déjà été observée au niveau du plasmide R388 (BENNET *et al.*, 1986)).

5.2-Transfert de plasmides à ADN_r entre *Escherichia coli* et 10 souches isolées de boues activées au sein de deux microcosmes : le réacteurs à lit fixe alimenté en continu et le réacteur "batch-séquencé".

Dans les expériences de transfert du plasmide pCE328 d'*Escherichia coli* vers des souches isolées de boues activées, quels que soient les réacteurs utilisés, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence la mobilisation du plasmide pCE328 par les souches isolées des boues, contrairement à ROUX *et al.* (1993) qui ont isolés une souche d'eau de rivière sur 245 capable de mobiliser ce plasmide à la fréquence apparente de 2×10^{-9} transconjugants par réceptrice pour une mobilisation triparentale sur boîte de Pétri. La souche mobilisatrice a été identifiée comme *Klebsiella pneumoniae ozonae*, elle contient un transposon de la famille Tn 3 qui a été étudié et séquencé (RINKEL *et al.*, 1994). Ce transposon de 3663 pb appelé Tn 5403 possède deux séquences inversement répétées de 38 pb à chaque extrémité, il code uniquement pour des gènes *tnp A* et *tnp R* impliqués dans la transposition. Dans notre étude,

la co-culture de souches originaires de boues activées utilisées comme population réceptrice a été choisie parce qu'elle semblait permettre dans un test sur boîte la mobilisation par conduction du plasmide pCE328, mais après vérification par PCR des supposés transconjugants pCE328 obtenus, il s'est avéré que ces transconjugants n'étaient que des mutants de souches isolées des boues activées. Le fait que nous n'ayons pas observé le transfert par mobilisation de pCE328 peut être dû au fait que l'événement se produit à une fréquence inférieure à notre limite de détection. En effet, notre limite de détection est de 1.4×10^{-7} transconjugants par donatrice et sur boîtes de Pétri où les conditions sont meilleures qu'au sein du réacteur à lit fixe (nutriments, concentrations bactériennes), le transfert par conduction du plasmide pCE328 est détecté avec une fréquence de 2×10^{-8} transconjugants par donatrice (ROUX *et al.*, 1993). Cette non détection du transfert par mobilisation du plasmide pCE328 dans nos expériences peut aussi s'expliquer par une trop faible survie dans le biofilm de la ou les souches à propriétés mobilisatrices au sein de la population réceptrice pour permettre à l'événement de se produire, ou encore à une trop faible survie des transconjugants pCE328 au sein des biofilms. Pour vérifier ces hypothèses, il serait intéressant de suivre les différentes souches isolées des boues au sein des biofilms et/ou d'introduire les bactéries donatrices en plus grande quantité et/ou d'utiliser en biofilms la souche mobilisatrice isolée par ROUX *et al.* (1993) en ajouts dosés, seule ou avec nos souches isolées des boues.

Le transfert par conjugaison du plasmide R388 vers les souches des boues est observé dans les deux types de réacteurs à lit fixe ou "batch-séquencé". Le fait que nous ne détectons plus de transconjugants R388 dans le réacteur "batch-séquencé" n'est pas dû au recyclage de la biomasse, car la courbe théorique du taux de dilution de la biomasse bactérienne est largement supérieure aux transconjugants détectés au sein du réacteur "batch-séquencé". En effet, on ne détecte plus les transconjugants R388 au bout de 20 jours d'expérience, alors qu'au bout de 20 jours, la courbe théorique de la dilution de la biomasse dans le réacteur nous indique 4.6×10^2 transconjugants cm^{-3} . Cette diminution jusqu'à une disparition du nombre de transconjugants R388 au sein du réacteur est probablement due à un manque de survie de cette souche en présence des souches provenant des boues activées de station d'épuration.

Quand on estime les fréquences de transfert du plasmide R388, on ne peut pas totalement exclure la possibilité de transfert dans les culots obtenus pendant le recyclage de biomasse des réacteurs "batch-séquencés". Cependant, les conditions de centrifugations : température de 4°C et temps de 5 minutes ne sont pas très favorables à la conjugaison. En effet, le transfert par conjugaison de plasmides résistants au mercure n'est pas détecté pour une température de 4°C ou un temps de 5 minutes, les fréquences augmentant quand on passe de 10 à 25°C (respectivement 1.8×10^{-7} et 1.8×10^{-5} transconjugants par réceptrice) et de 5 à 24 heures (respectivement 2.5×10^{-8} et 8×10^{-6} transconjugants par réceptrice) (FRY & DAY, 1990), à faible température et durant un temps de seulement 5 minutes la conjugaison à donc très peu de chance de se produire. De plus, la centrifugation peut provoquer une perte ou une altération des pili rigides du plasmide R388 (LEBARON *et al.*, 1993) rendant peu probable la production de transconjugants pendant le recyclage de la biomasse.

Pour estimer la dissémination des plasmides recombinants, il faut étudier la survie des bactéries donatrices contenant les plasmides recombinants et pas seulement les transconjugants qui se forment, car la survie permet le maintien de l'ADN et plus la donatrice survie, plus les transconjugants seront détectés. Les donatrices introduites parmi les souches des boues activées se maintiennent à un niveau constant au sein de l'effluent des réacteurs à lit fixe ainsi qu'au niveau du biofilm proprement dit, alors qu'elles diminuent d'un facteur 10 et 100 respectivement pour les donatrices porteuses de R388 et pCE328 au sein des réacteurs "batch" à alimentation séquencée. Le plasmide naturel R388 doit conférer à la souche hôte un avantage sélectif par rapport à pCE328 ou bien doit posséder un coût énergétique moindre. La même observation a été faite au niveau du tube digestif de souris (DUVAL-IFLAH *et al.*, 1994) où comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le transconjugant R388 devient la souche dominante.

5.3-Mobilisation de plasmides à ADN_r dans différents contextes génétiques sur boîtes de Pétri.

Le but de ces expériences était de voir si la mobilisation d'ADN recombiné par conduction et donation était rendue possible par la présence d'éléments mobilisateurs dans

les boues activées ("Tn 3 - like" pour la conduction et, *tra* et *mob* pour la donation). Les trois types de transfert étudiés ont été choisis afin de déterminer l'influence de la biomasse des boues activées sur la mobilisation par conduction et donation d'ADN_r, ainsi que l'influence des éléments "helpers" *tra* et *mob* présents chez la réceptrice sur la mobilisation.

Aucun transfert du plasmide pCE325 vers les souches des boues activées n'a été observé sur des boîtes incubées à 25°C, cette limitation de la mobilisation peut s'expliquer par le fait que ces plasmides ne se répliquent que chez *Escherichia coli*, l'incompatibilité plasmidique et la restriction de l'ADN étranger, ainsi qu'à une incomplète reconnaissance de la surface cellulaire entre deux *Enterobacteriaceae* différentes, car les plasmides dérivés des pBR ne transfèrent que vers un petit groupe de la famille des *Enterobacteriaceae* (BOLIVAR, 1978). Les souches *Escherichia coli* ne sont peut être pas assez abondantes au sein des boues activées pour nous permettre la détection de mobilisation.

L'étude de la mobilisation par conduction n'a pas permis de détecter des transconjugants du plasmide pCE328 quel que soit le type de transfert étudié, avec des limites de détection allant jusqu'à 10⁻⁹ transconjugants par donatrice. La mobilisation par conduction de pCE328 a cependant déjà été mise en évidence dans un microcosme composé d'un erlen contenant de l'eau de mer stérile dans lequel sont introduites une souche donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 et une souche mobilisatrice isolée de boues activées *Aeromonas hydrophila* (LEBARON *et al.*, 1994). Les fréquences de transfert obtenues après vérification par PCR avec les amorces spécifique du gène "tk-vacc" de pCE328 sont les suivantes : 8.5 x 10⁻⁶ et 5.2 x 10⁻⁶ transconjugants par donatrice respectivement en eau de mer stérile de salinité 2.2% et 3.5%. Cette souche mobilisatrice fait partie de 14 souches isolées parmi 208 souches prélevées à l'interface eaux usées et eau de mer et capable de mobiliser pCE328.

Ces études montrent donc que la mobilisation de pCE328 est possible par conduction et qu'il existe dans l'environnement des souches susceptibles de mobiliser ce plasmide, mais la présence de nombreuses autres souches non mobilisatrices au sein des boues activées fait que cet événement est moins probable. La probabilité pour la donatrice contenant le

plasmide pCE328 de rencontrer une souche mobilisatrice diluée dans une population importante de bactéries réceptrices est faible.

Lors de la sélection des transconjugants, des souches des boues multirésistantes aux antibiotiques ont été isolées avec le profil de résistance des plasmides pCE (ampicilline^R et chloramphénicol^R) R388 (triméthoprime^R), pUB2380 (kanamycine^R), de la réceptrice (acide nalidixique^R et tétracycline^R) et d'autres résistances en plus comme la streptomycine et la rifampicine. 70% des souches testées sont résistantes à 6 antibiotiques. La multirésistance aux antibiotiques des boues activées a déjà été mise en évidence par TREVORS (1987) et LEBARON *et al.* (1994). LEBARON *et al.* (1994) a montré que sur 208 souches isolées à l'interface eaux usées et eau de mer, 93% de ces souches sont résistantes à au moins un antibiotique. Ces souches ont été identifiées en majorité comme des bactéries Gram négatives hétérotrophes (*Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Aeromonas*, *Escherichia coli*, ...), et seuls 7% des souches sont des bactéries Gram positives. TREVORS (1987) a isolé 30 souches d'un réacteur de boues activées utilisées pour la biodégradation de métaux parmi lesquelles il a pu identifier des *Pseudomonas*, des *Shigella*, des *Bacillus*, des *Aeromonas*, etc...Quatre-vingt pour-cent de ces souches possèdent au moins une résistance à un antibiotique et 5% de ces souches sont résistantes à 5 antibiotiques. Ces expériences renforcent la nécessité de vérification moléculaire des transconjugants, la sélection par les résistances aux antibiotiques n'étant pas suffisante, de plus des gènes eucaryotes utilisés comme marqueur de l'OGMs permettent une identification plus fiable des transconjugants.

CONCLUSIONS :

L'objectif de cette étude était de voir si des plasmides dépourvus de gènes de transfert *tra*, *mob* et dépourvus ou non d'origine de transfert étaient susceptibles d'être mobilisés par la biomasse de boues activées. La mobilisation a été étudiée au sein de deux types de microcosmes : le réacteur à lit fixe alimenté en continu et le réacteur "batch-séquencé" avec recyclage de biomasse et sur boîtes de Pétri. Cette étude était en fait une partie du travail de tout un groupe de chercheurs dont l'objectif était d'étudier la dissémination et le maintien

d'ADN recombiné au sein de différents microcosmes. Les microcosmes ont été choisis de manière à représenter les différents types d'environnements dans lesquels des micro-organismes à ADN recombiné sont susceptibles d'être relargués accidentellement, à savoir, les milieux aquatiques (eau douce, eau de mer, eaux usées), l'interface eau - support inorganique (biofilms), le milieu sol, le tube digestif d'un mollusque marin (moule) et d'un mammifère (souris). Le but étant de valider l'emploi de microcosmes bien définis utilisables en routine pour évaluer et prédire le comportement de micro-organismes génétiquement modifiés.

Le réacteur à lit fixe alimenté en continu standardisé permet de détecter le transfert par conjugaison de plasmides *tra*⁺ et par mobilisation de plasmides *tra*⁻ *mob*⁺ *oriT*⁺ et *tra*⁻ *mob*⁻ *oriT*⁺ entre deux souches *Escherichia coli*. Ainsi, ce réacteur devrait permettre d'observer l'évolution des OGMs dans le milieu naturel (survie et croissance) et le transfert vers des souches autochtones.

La survie des bactéries donatrices :

La survie des bactéries donatrices est un événement clé, nécessaire au transfert par conjugaison ou à la mobilisation d'ADN_r.

La survie des donatrices au sein d'un biofilm soumis à un flux dépend de leur implantation. L'implantation au sein d'un biofilm mixte *Escherichia coli* - *Escherichia coli* varie suivant le contenu plasmidique de la souche donatrice. Cette différence d'implantation est due à une différence d'adhésion, et une meilleure adhésion est provoquée par un nombre de copies de plasmides plus important.

De plus, nous avons mis en évidence que la présence du plasmide R388 codant pour un pilus conjugatif permettait d'augmenter l'adhésion d'un facteur 10 sur une surface inanimée.

Les bactéries donatrices *Escherichia coli* porteuse du plasmide pCE328 ou R388 restent stables au sein de l'effluent de réacteurs à lit fixe alimentés en continu contenant une

population de 10 souches isolées de boues activées à l'équilibre apparent, alors qu'au sein de réacteur à alimentation séquencée contenant une population de 10 souches isolées de boues activées à l'équilibre apparent, les bactéries donatrices diminuent de 1 à 2 log respectivement pour les donatrices contenant le plasmide R388 ou pCE328. La présence de surfaces solides pouvant servir de support pour la fixation des micro-organismes est un facteur de stabilisation des bactéries donatrices et des éventuels transconjugants formés. Ce qui peut expliquer les transferts plus importants en biofilms qu'en suspension.

Transfert des plasmides à ADN recombinés par donation (pCE325) ou par conduction (pCE328) :

Le transfert par donation du plasmide pCE325 (*oriT* +) a été observé uniquement en présence des éléments mobilisateurs *tra* (R388) et *mob* (pUB2380) que ce soit au sein de biofilms mixtes *Escherichia coli* - *Escherichia coli*, ou sur boîtes de Pétri. De plus, la fréquence de mobilisation par donation diminue d'un facteur 10 sur boîtes de Pétri en présence de la biomasse de boues activées. La biomasse de boues activées n'a pas un rôle mobilisateur important dans nos expériences, des souches mobilisatrices ont déjà été isolées de l'environnement mais se trouvent diluées dans la biomasse des souches non mobilisatrices.

⇒ Enfin, et surtout : les constructions de plasmides recombinants dépourvus de gènes *tra*, *mob* et d'origine de transfert ont une faible probabilité de dissémination puisque la mobilisation de pCE328 n'a jamais été observée quel que soit le microcosme et le contexte étudié. En effet, même dans des conditions expérimentales favorables aux transferts génétiques en terme de température, densité cellulaire, contact entre cellules et éléments nutritifs, la dissémination du plasmide recombinant pCE328 n'a pas pu être détectée. Ce qui fait que cet événement est peu probable dans les conditions naturelles.

**6) RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES :**

ANGLES M. L., MARSHALL K. C. & GOODMAN A. E., 1993, Plasmid transfer between marine bacteria in the aqueous phase and biofilms in reactor microcosms, Appl. Environ. Microbiol., 59 (3), 843-850.

APPLEGATE D. H. & BRYERS J. D., 1991, Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processus, Biotechnol. Bioeng., 37, 17-25.

BAKKE R., TRULEAR M. G., ROBINSON J. A. & CHARACKLIS W. G., 1984, Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilm : steady state, Biotech. Bioeng., 26, 1418-1424.

BALE M. J., FRY J. C. & DAY M. J., 1988, Transfer and occurrence of large mercury resistance plasmids in river epilithon, Appl. Environ. Microbiol., 54 (4), 972-978.

BAUDA P., DOLLARD M.-A. & BLOCK J. C., 1993, Analysis of biofilm growth rate in a packed bed bioreactor, Biofouling, 6, 305-316.

BAUDA P., LALLEMENT C. & MANEM J., 1995, Plasmid content evaluation of activated sludge, Wat. Res., 29 (1), 371-374.

BENNETT P. M., GRINSTED J., CHOI C. L. & RICHMOND M. H., 1978, Characterization of Tn 501 a transposon determining resistance to mercuric ions, Mol. G. Genet., 159, 101-106.

BENNETT P. M., HERITAGE J., COMANDUCI A. & DOOD H. M., 1986, Evolution of R plasmids by replicon fusion, J. Antimicrob. Chemother., 18, 103-111.

BENNETT P. M. & RICHMOND M. H., 1976, Translocation of a discrete piece of deoxyribonucleic acid and *amp* gene between replicons in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 126, 1-6.

BERG G. & TREVORS J. T., 1990, Bacterial conjugation between *Escherichia coli* and *Pseudomonas* spp. donor and recipient cells in soil, J. Ind. Microbiol., 5, 79-84.

BLOCK J.-C., 1992, Biofilms in drinking water distribution systems, in Biofilms - Science and Technology, MELO L. F. *et al.* (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 469-485.

BOLIVAR F., 1978, Construction & characterization of new cloning vehicles. IV. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique *Eco* RI site for selection of *Eco* RI generated recombinant DNA molecules, Gene, 4, 121-136.

BRADLEY D. E., 1980, Morphological and serological relationship of conjugative pili, Plasmid, 4, 155-169.

BRADLEY D. E., 1981, Conjugative pili of plasmids in *Escherichia coli* K12 and *Pseudomonas*, in Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids, LEVY *et al.* (eds), Plenum Publishing, New-York, 217-226.

BRADLEY D. E., 1983, Specification of the conjugative pili and surface mating systems of *Pseudomonas* plasmids, J. Gen. Microbiol., 129, 2545-2556.

BRADLEY D. E., 1984, Characteristics and function of thick and thin conjugative pili determined by transfer-derepressed plasmids of incompatibility groups I, I2, I5, B, K and Z, J. Gen. Microbiol., 130, 1489-1502.

BRADLEY D. E., TAYLOR D. E. & COHEN D. R., 1980, Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K12, J. Bacteriol., 143, 1466-1470.

BRYERS J. D., 1994, Biofilms and technological implications of microbial cell adhesion, Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, 2, 9-23.

BRYERS J. D. & BANKS M. K., 1990, Assessment of biofilm ecodynamics, in Physiology of Immobilized Cells, DE BONT J. A. M. *et al.* (eds), Elsevier Publ., Amsterdam, 49-62.

BRYERS J. D. & CHARACKLIS W. G., 1992, Biofilm laboratory methods : the use of flow reactors, in Biofilms- Science and Biotechnology, MELO L. F. *et al.* (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 615-629.

CAPDEVILLE B. & ROLS J. L., 1992, Introduction to biofilms in water and wastewater treatment, in Biofilms- Science and Biotechnology, MELO L. F. *et al.* (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 13-20.

CARLOS F. A.-C. & CHICURELL M. E., 1992, Bacterial plasmids and gene flux, Cell, 70, 189-199.

COMBARRO M. P., GAUTHIER M. & BREITTMAYER V. A., 1992, Conjugative transfer of R plasmid between *Escherichia coli* strains on saline selective media and in water, J. Microbiol. Methods, 14, 207-215.

COOK D. M. & FARRAND S. K., 1992, The *oriT* transfer region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTi C58 shares DNA sequence identity with the transfer origins of RSF1010 and RK2/RP4 and with T-region borders, J. Bacteriol., 174, 6238-6246.

COVARRUBIAS L., CERVANTES L., COVARRUBIAS A., SOBERON X., VICHIDO I., BLANCO A., KUPERSZTOCH-PORTNOY Y. M. & BOLIVAR F., 1981, Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328, Gene, 13, 25-35.

DATTA N. & HEDGES R. W., 1972, Trimethoprim resistance conferred by W plasmid in *Enterobacteriaceae*, J. Gen. Microbiol., 72, 349-355.

DE TAXIS DU POET P., ARCAND Y., BERNIER R., BARBOTIN J. N. & THOMAS D., 1987, Plasmid stability in immobilized and free recombinant *Escherichia coli* JM105 (pKK223-200) :

importance of oxygen diffusion, growth rate, and plasmid copy number, Appl. Environ. Microbiol., 53 (7), 1548-1555.

DOYLE R. J., MATTHEWS T. S. & STREIPS U. N., 1980, Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall, J. Bacteriol., 143, 471-480.

DUVAL-IFLAH Y., GAINCH I., OURIET M. F., LETT M. C. & HUBERT J. C., 1994, Recombinant DNA transfer to *Escherichia coli* from human faecal origin in vitro and in digestive tract of gnotobiotic mice, FEMS Microbiol. Ecol., 15, 79-88.

ELWOOD D. C., KEEVIL C. W., MARSH P. D., BROWN C. M. & WARDELL J. N., 1982, Surface associated growth, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 297, 517-532.

ERIKSON L. & ALM B., 1991, Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties, Wat. Sci. Tech., 24 (7), 21-28.

FLETCHER M., 1992, The measurement of bacterial attachment to surfaces in static systems, in Biofilms - Sciences and Technology, MELO F. *et al.* (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 603-614.

FRENKEL L. & BREMER H., 1986, Laboratory methods : Increased amplification of plasmid pBR322 by low concentrations of chloramphenicol, DNA, 5 (6), 539-544.

FROST L. S., 1992, Bacterial conjugation : everybody's doin'it, Can. J. Microbiol., 38, 1091-1096.

FRY J. C. & DAY M. J., 1990, Plasmid transfer in the epilithon, in Bacterial Genetics in Natural Environments, FRY J. C. & DAY M. J. (eds), Chapman & Hall, 55-77.

FUJITA M., IKE M. & SUZUKI H., 1993, Screening of plasmids from wastewater bacteria, Wat. Res., 27 (6), 949-953.

GEALT M. A., CHAI M. D., ALPERT K. B. & BOYER J. C., 1985, Transfer of plasmid pBR322 and pBR325 in wastewater from laboratory strains of *Escherichia coli* to bacteria indigenous to waste disposal system, Appl. Environ. Microbiol., 49 (4), 836-841.

GLEW J. G., ANGLE J. S. & SADOWSKY M. J., 1993, In vivo transfer of pR68.45 from *Pseudomonas aeruginosa* into indigenous soil bacteria, Microb. Releases, 1, 237-241.

GOWLAND P. C. & SLATER J. H., 1984, Transfer and stability of drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K12, Microb. Ecol., 10, 1-13.

GUINEY D. G. & LANKA E., 1989, Conjugative transfer of Inc P plasmids, in Promiscuous Plasmids of Gram-negative Bacteria, THOMAS C. M. (ed), Academic Press, London, 27-56.

GUZZO A. & DUBOW M. S., 1991, Construction of stable, single-copy luciferase gene fusion in *Escherichia coli*, Arch. Microbiol., 156, 444-448.

HANAHAHAN D., 1987, Mechanisms of DNA transformation, in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium - Cellular and Molecular biology* (Vol. 2), NEIDHARDT *et al.* (eds), ASM Washington D. C., 1177-1183.

HEINEMANN J. A. & SPRAGUE G. F., 1991, Transmission of plasmid DNA to yeast by conjugation with bacteria, Meth. Enzymol., 194, 187-195.

HENSCHKE R. B. & SCHMIDT F. R. J., 1990, Plasmid mobilization from genetically engineered bacteria to members of the indigenous soil microflora in situ, Curr. Microbiol., 20, 105-110.

HILL K. E., FRY J. C. & WEIGHTMAN A., 1994, Gene transfer in the aquatic environment : persistence and mobilization of the catabolic recombinant pD10 in the epilithon, Microbiology, 140, 1555-1563.

HILL K. E., WEIGHTMAN A. & FRY J. C., 1992, Isolation and screening of plasmids from the epilithon which mobilize recombinant plasmid pD10, Appl. Environ. Microbiol., 58 (4), 1292-1300.

INOMATA K., NISHIKAWA M. & YOSHIDA K., 1994, The yeast *Saccharomyces kluyveri* as a recipient eukaryote in transkingdom conjugation : behavior of transmitted plasmids in transconjugants, J. Bacteriol., 176 (15), 4470-4473.

JIMENEZ B., CAPDEVILLE B., ROQUES H. & FAUP G. M., 1987, Design considerations for nitrification and denitrification process using two fixed bed reactors in series, Wat. Sci. Tech., 19, 139-150.

JOHNSON D. A. & WILLETS N. S., 1980, Tn 2301, a transposon construct carrying the entire transfer region of the F plasmid, J. Bacteriol., 143, 1171-1178.

JORAND F., GUICHERD P., URBAIN V., MANEM J. & BLOCK J. C., 1994, Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory-grown bacteria, Wat. Sci. Tech., 30 (11), 211-218.

KEEN H., GLYNNE A., PICKUP J. C., VIBERTI G. C., BILOUS R. W., JARRETT R. J. & MARSDEN R., 1980, Human insulin produced by recombinant DNA technology : safety and hypoglycaemic potency in healthy men, Lancet., 2, 398-401.

KILBANE J. J. & MALAMY M. H., 1980, F factor mobilization of non-conjugative chimeric plasmids in *Escherichia coli* : general mechanisms and a role for site specific *rec A*-independent recombination at *ori VI*, J. Mol. Biol., 143, 73-93.

KING L. K. & PARKER B. C., 1988, A simple, rapid method for enumerating total viable and metabolically active bacteria in groundwater, Appl. Environ. Microbiol., 54 (6), 1630-1631.

KLEIN J. & ZIEHR H., 1990, Immobilization of microbial cells by adsorption, J. Biotechnol., 16, 1-16.

KRUSE H. & SORUM H., 1994, Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments, Appl. Environ. Microbiol., 60 (11), 4015-4021.

LEBARON Ph., BATAILLER N. & BALEUX B., 1994, Mobilization of a recombinant non conjugative plasmid at the interface between wastewater and the marine coastal environment, FEMS Microbiol. Ecol., 15, 61-70.

LEBARON Ph., ROUX B., LETT M. C. & BALEUX B., 1993, Effects of pili rigidity and energy availability on conjugative plasmid transfer in aquatic environments, Microb. Releases, 2, 127-133.

LEDERBERG J. & TATUM E. L., 1946, Gene recombination in *Escherichia coli*, Nature, 158, 558.

LESER T. D., 1995, Validation of microbial community structure and ecological functional parameters in an aquatic microcosm designed for testing genetically engineered microorganisms, Microb. Ecol., 29, 183-201.

LORENZ M. G. & WACKERNAGEL W., 1990, Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-absorbed DNA, Arch. Microbiol., 154, 380-385.

MAC CLURE N. C., FRY J. C. & WEIGHTMAN A. J., 1990, Gene transfer in activated sludge, in Bacterial Genetics in Natural Environments, FRY J. C. & DAY M. J. (eds), Chapman & Hall, 111-129.

MAC DONALD J. A., SMETS B. F. & RITTMANN B. E., 1992, The effects of energy availability on the conjugative-transfer kinetics of plasmids RP4, Wat. Res., 26 (4), 461-468.

MAC KAY P., PASEK M., MAGAZIN M., KOVACICR. T., ALLET B., STAHL S., GILBERT W., SCHELLER H., BRUCE S. A. & MURRAY K., 1981, Production of immunologically active surface antigens of hepatitis B virus by *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4510-4514.

MAC PHERSON P. & GEALT M. A., 1986, Isolation of indigenous wastewater bacterial strains capable of mobilizing plasmid, Appl. Environ. Microbiol., 51 (5), 904-909.

MAGUIN E., DUWAT P., HEGE T., EHRLICH D. & GRUSS A., 1992, New thermosensitive plasmid for Gram positive bacteria, J. Bacteriol., 174 (17), 5633-5638.

MANCINI P., FERTELS S., NAVE D. & GEALT M. A., 1987, Mobilization of plasmid pHSV106 from *E. coli* HB101 in a laboratory-scale waste treatment facility, Appl. Environ. Microbiol., 53 (4), 665-671.

MARTIAL J. A., HALLEWELL R. A., BAXTER J. D. & GOODMAN H. M., 1979, Human growth hormone : complementary DNA cloning and expression in bacteria, Science, 205, 602-607.

MERGEAY M., NIES D., SCHLEGEL H. G., GERITS J., CHARLES P. & VAN GIJSEGEM F., 1985, *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound to heavy metals, J. Bacteriol., 162 (1), 328-334.

MILLER J. H., 1992, Unit II : Matings between male and female cells, in Experiments in Molecular Genetics, MILLER J. H. (ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York, 61-109.

NAGATA S., TAIRA H., HALL A., JOHNSRUD L., STREULI M., ECSODI J., BOLL W., CANTELL K. & WEISSMANN C., 1980, Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity, Nature, 284, 316-320.

NOVICK R. P., CLOWES S. R. C., COHEN S. N., CURTISS III R., DATTA N. & FALKOW S., 1976, Uniform nomenclature for bacterial plasmids : a proposal, Bacteriol. Rev., 40 (1), 168-189.

PANICKER M. M. & MINCKLEY E. G. Jr, 1992, Purification and properties of the F factor Tra D protein an inner membrane conjugal transfer protein, J. Biol. Chem., 267, 12761-12766.

PAUL J. H., FRISCHER M. E. & THURMOND J. M., 1991, Gene transfer in marine water column and sediment microcosms by natural plasmid transformation, Appl. Environ. Microbiol., 57 (5), 1509-1515.

PORTER K. G. & FEIG Y. S., 1980, The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, Limnol. Oceanogra., 25 (5), 943-947.

Rapport Chimie et Ecologie, 1993, Evaluation des risques liés à la dissémination dans l'environnement des micro-organismes à ADN recombiné : Etude comparative du comportement de différentes constructions génétiques au sein de plusieurs écosystèmes, 289p.

RINKEL M., HUBERT J. C., ROUX B. & LETT M. C., 1994, Transposon Tn 5403, a mobilization helper element : complete nucleotide sequence and distribution in aquatic strains, FEMS Microbiol. Ecol., 15, 89-96.

ROGALLA F. & PAYRAUDEAU M., 1988, Tertiary nitrification with fixed biomass reactors, Wat. Supply, 6, 347-354.

ROSENBERG M., GUINICK D. & ROSENBERG E., 1980, Adherence of bacteria to hydrocarbons, a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity, FEMS Microbiol. Lett., 9, 29-33.

ROSENBERG M. & ROSENBERG E., 1985, Bacterial adherence at the hydrocarbon-water interface, Oil Petrochem. Poll., 2, 155-162.

ROUX B., LEBARON P., HUBERT J. C. & LETT M. C., 1993, Occurrence of transposable elements in aquatic bacteria strains involvement in the mobilization of pBR-type plasmids, Microb. Releases, 1, 223-228.

SAARELA S., TAIRA S., NURMIAHO-LASSILA E., MAKKONEN A. & RHEN M., 1995, The *Escherichia coli* G-fimbrial lectin protein participates both in fimbrial biogenesis and recognition of the receptor N-acetyl-D-glucosamine, J. Bacteriol., 177, 1477-1484.

SALYERS A. A., SHOEMAKER N. B. & LHING-YEW L., 1995, Minireview : in the drivers seat : the *Bacteroides* conjugative transposons and the elements they mobilize, J. Bacteriol., 177 (20), 5727-5731.

SAMBROOK J., FRITSCH E. F. & MANIATIS T., 1989, in Molecular Cloning : a Laboratory Manual, 2nd Edn, IRWIN N. *et al.* (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York.

SANDT C. H. & HERSON D. S., 1991, Mobilization of the genetically engineered plasmid pHSV106 from *Escherichia coli* HB101 (pHSV106) to *Enterobacter cloacae* in drinking water, Appl. Environ. Microbiol., 57 (1), 194-200.

SANTOS V.A., TRAMPER J. & WIJFFELS R. H., 1992, in Biofilms - Science and Technology, MELO L. F. *et al.* (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 449-453.

SAYE D. J., OGUNSEITAN O., SAYLER G. S. & MILLER R. V., 1987, Potential for transduction of plasmids in a natural freshwater environment : effect of plasmid donor concentration and a natural microbial community on transduction in *Pseudomonas aeruginosa*, Appl. Environ. Microbiol., 53, 987-995.

SHI W., ZHOU Y., WILD J., ADLER J. & CROSS C. A., 1992, DnaK, DnaJ, and GrpE are required for flagellum synthesis in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 174, 6256-6263.

SIEBEL M. & CHARACKLIS W. G., 1991, Observations of binary population biofilms, Biotechnol. Bioeng., 37, 778-789.

SMIT E. & VAN ELSAS J. D., 1990, Determination of plasmid transfer frequency in soil consequences of bacterial mating on selective agar media, Curr. Microbiol., 21, 151-157.

SMIT E., VENNE D. & VAN ELSAS J. D., 1993, Mobilization of a recombinant Inc Q plasmid between bacteria on agar and soil via cotransfer or retrotransfer, Appl. Environ. Microbiol., 59, 2257-2263.

SOBERON X., COVARRUBIAS L. & BOLIVAR F., 1980, Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325, Gene, 9, 287-305.

STAL L. J., BOCK E., BOUWER E. J., DOUGLAS L. J., GUTNICK D. L., HECKMANN K. D., HIRSCH P., KOLBEL-BOELKE J. M., MARSHALL K. C., PROSSER J. I., SCHUTT C. & WATANABE Y., 1989, Cellular and physiology and interactions of biofilms organisms, in Structure and Function of Biofilm, CHARACKLIS *et al.* (eds), Bernhard S., Dahlem Konferenzen, 269-286.

STEELE J. L. & MAC KAY L. L., 1989, Conjugal transfer of genetic material in *lactococci* : a review, J. Dairy Sci., 72, 3388-3397.

STOTZKY G. & BABICH H., 1986, Survival of, and genetic transfer by, genetically bacteria in natural environments, Adv. Appl. Microbiol., 31, 93-138.

TOP E., MERGEAY M., SPRINGAEL D. & VERSTRAETE W., 1990, Gene escape model : transfer of heavy metal resistance genes from *Escherichia coli* to *Alcaligenes eutrophus* on agar plates and in soil samples, Appl. Environ. Microbiol., 56 (8), 2471-2479.

TOP E., VANDRULLEGHEM P., MERGEAY M. & VERSTRAETE W., 1992, Determination of the mechanistic mathematical modeling, J. Bacteriol., 174, 5953-5960.

TREVORS J. T., 1987, Identification of plasmid containing bacteria in an activated sludge reactor, Toxicity Assessment : An International Quaterly, 2, 283-291.

TREVORS J. T., BARKAY T. & BOURQUIN A. W., 1987, Gene transfer among bacteria in soil and aquatic environments : a review, Can. J. Microbiol., 33, 191-198.

TREVORS J. T., VAN ELSAS J. D., STARODUB M. E. & VAN OVERBEEK L. S., 1990, *Pseudomonas fluorescens* survival and plasmid RP4 transfer in agricultural water, Wat. Res., 24 (6), 751-755.

URBAIN V., BLOCK J. C. & MANEM J., 1993, Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach, Wat. Res., 27, 829-838.

VALENTINE C. R., & KADO C. I., 1989, Molecular genetics of Inc W plasmids, in Promiscuous Plasmids of Gram-negative Bacteria, THOMAS C. M. (ed), Academic Press Limited, 125-163.

VAN ELSAS J. D., TREVORS J. T., STARODUB M. E. & VAN OVERBEEK L. S., 1990, Transfer of plasmid RP4 between pseudomonads after introduction into soils : influence of spatial and temporal aspects of inoculation, FEMS Microbiol. Ecol., 73, 1-12.

WEIR J. P. & MOSS B., 1983, Nucleotide sequence of the vaccinia virus thymidine kinase gene and the nature of spontaneous frameshift mutation, J. Virol., 46 (2), 530-537

ZAMBRISKY P., TEMPE J. & SCHELL J., 1989, Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants, Cell, 56, 193-201.

ZURITA M., BOLIVAR F. & SOBERON X., 1984, Construction and characterization of new cloning vehicles. VII. Construction of plasmid pBR327 *par*, a completely sequenced, stable derivatives of pBR327 containing the *par* locus of pSC101, Gene, 28, 119-122.

7) ANNEXES :

Annexe 1 : Résultats bruts du suivi des souches réceptrice et donatrices pures au sein de l'effluent de réacteurs à biofilms déterminées par épifluorescence au DAPI et exprimées en bactéries cm⁻³. (Les valeurs pour trois réacteurs différents par souche, les moyennes et les écarts types sur ces valeurs ont été reportés).

Souches étudiées	Temps (jours)					
	0	1	2	3	4	5
<i>Escherichia coli</i> K12 UB281	2.1 × 10 ⁺⁸	4.9 × 10 ⁺⁶	7.6 × 10 ⁺⁷	6.0 × 10 ⁺⁷	7.3 × 10 ⁺⁷	6.3 × 10 ⁺⁷
	1.9 × 10 ⁺⁸	4.8 × 10 ⁺⁶	4.3 × 10 ⁺⁷	6.8 × 10 ⁺⁷	5.9 × 10 ⁺⁷	5.7 × 10 ⁺⁷
	2.5 × 10 ⁺⁸	5.3 × 10 ⁺⁶	5.1 × 10 ⁺⁷	5.9 × 10 ⁺⁷	6.4 × 10 ⁺⁷	6.7 × 10 ⁺⁷
	Moyenne ± écart type	(2.2 ± 0.3) × 10⁺⁸	(5.0 ± 0.3) × 10⁺⁶	(5.7 ± 1.7) × 10⁺⁷	(6.2 ± 0.5) × 10⁺⁷	(6.5 ± 0.7) × 10⁺⁷
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE325)	2.1 × 10 ⁺⁸	2.6 × 10 ⁺⁵	2.0 × 10 ⁺⁶	4.5 × 10 ⁺⁶	7.0 × 10 ⁺⁶	2.5 × 10 ⁺⁶
	2.0 × 10 ⁺⁸	5.0 × 10 ⁺⁵	4.1 × 10 ⁺⁶	7.3 × 10 ⁺⁶	5.4 × 10 ⁺⁶	7.2 × 10 ⁺⁶
	1.9 × 10 ⁺⁸	3.2 × 10 ⁺⁵	1.2 × 10 ⁺⁶	6.1 × 10 ⁺⁶	4.0 × 10 ⁺⁶	9.0 × 10 ⁺⁶
	Moyenne ± écart type	(2.0 ± 0.1) × 10⁺⁸	(3.6 ± 1.2) × 10⁺⁵	(2.4 ± 1.5) × 10⁺⁶	(6.0 ± 1.4) × 10⁺⁶	(5.5 ± 1.5) × 10⁺⁶
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE328)	2.4 × 10 ⁺⁸	6.1 × 10 ⁺⁵	2.1 × 10 ⁺⁶	3.4 × 10 ⁺⁶	2.7 × 10 ⁺⁶	1.8 × 10 ⁺⁶
	1.8 × 10 ⁺⁸	3.2 × 10 ⁺⁵	3.2 × 10 ⁺⁶	5.3 × 10 ⁺⁶	5.0 × 10 ⁺⁶	3.5 × 10 ⁺⁶
	2.2 × 10 ⁺⁸	4.9 × 10 ⁺⁵	4.1 × 10 ⁺⁶	2.5 × 10 ⁺⁶	3.4 × 10 ⁺⁶	6.1 × 10 ⁺⁶
	Moyenne ± écart type	(2.1 ± 0.3) × 10⁺⁸	(4.7 ± 1.5) × 10⁺⁵	(3.1 ± 1.0) × 10⁺⁶	(3.7 ± 1.4) × 10⁺⁶	(3.7 ± 1.2) × 10⁺⁶
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325)	2.2 × 10 ⁺⁸	2.5 × 10 ⁺³	3.4 × 10 ⁺⁴	4.2 × 10 ⁺⁴	3.9 × 10 ⁺⁴	2.6 × 10 ⁺⁴
	2.0 × 10 ⁺⁸	4.4 × 10 ⁺³	2.1 × 10 ⁺⁴	2.4 × 10 ⁺⁴	2.1 × 10 ⁺⁴	2.5 × 10 ⁺⁴
	2.2 × 10 ⁺⁸	5.0 × 10 ⁺³	1.9 × 10 ⁺⁴	1.2 × 10 ⁺⁴	0.7 × 10 ⁺⁴	2.0 × 10 ⁺⁴
	Moyenne ± écart type	(2.1 ± 0.1) × 10⁺⁸	(4.0 ± 1.3) × 10⁺³	(2.5 ± 0.8) × 10⁺⁴	(2.6 ± 1.5) × 10⁺⁴	(2.2 ± 1.6) × 10⁺⁴
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328)	2.3 × 10 ⁺⁸	4.6 × 10 ⁺⁵	3.2 × 10 ⁺⁶	2.1 × 10 ⁺⁶	3.4 × 10 ⁺⁶	3.0 × 10 ⁺⁶
	2.1 × 10 ⁺⁸	2.2 × 10 ⁺⁵	4.9 × 10 ⁺⁶	4.4 × 10 ⁺⁶	4.7 × 10 ⁺⁶	2.5 × 10 ⁺⁶
	2.0 × 10 ⁺⁸	3.7 × 10 ⁺⁵	2.1 × 10 ⁺⁶	3.9 × 10 ⁺⁶	2.2 × 10 ⁺⁶	3.9 × 10 ⁺⁶
	Moyenne ± écart type	(2.1 ± 0.1) × 10⁺⁸	(3.5 ± 1.2) × 10⁺⁵	(3.4 ± 1.4) × 10⁺⁶	(3.5 ± 1.2) × 10⁺⁶	(3.4 ± 1.2) × 10⁺⁶

Annexe 2 : Résultats bruts des caractéristiques des biofilms de réceptrices ou de donatrices pures à l'équilibre. (X_{sus} correspond aux bactéries dans l'effluent du réacteur ; X_{fix} correspond aux bactéries fixées au sein du biofilm et μ correspond au taux de croissance du biofilm à l'équilibre. Les valeurs pour trois expérimentations par souche, les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Souches étudiées	X_{sus} (bactéries cm^{-3})	X_{fix} (bactéries cm^{-2})	μ (h^{-1})
<i>Escherichia coli</i> K12 UB281	6.3 x 10 ⁷ 5.7 x 10 ⁷ 6.7 x 10 ⁷	4.0 x 10 ⁸ 2.2 x 10 ⁸ 3.1 x 10 ⁸	1.0 x 10 ⁻² 1.6 x 10 ⁻² 1.4 x 10 ⁻²
Moyenne ± écart type	(6.2 ± 0.5) x 10 ⁷	(3.1 ± 0.9) x 10 ⁸	(1.3 ± 0.3) x 10 ⁻²
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE325)	2.5 x 10 ⁶ 7.2 x 10 ⁶ 9.0 x 10 ⁶	3.2 x 10 ⁷ 4.6 x 10 ⁷ 7.2 x 10 ⁷	4.9 x 10 ⁻³ 9.8 x 10 ⁻³ 7.9 x 10 ⁻³
Moyenne ± écart type	(6.2 ± 3.3) x 10 ⁶	(5.0 ± 2.0) x 10 ⁷	(7.5 ± 2.5) x 10 ⁻³
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE328)	1.8 x 10 ⁶ 3.5 x 10 ⁶ 6.1 x 10 ⁶	9.2 x 10 ⁷ 6.4 x 10 ⁷ 5.8 x 10 ⁷	1.2 x 10 ⁻³ 3.4 x 10 ⁻³ 6.6 x 10 ⁻³
Moyenne ± écart type	(3.8 ± 2.2) x 10 ⁶	(7.1 ± 1.8) x 10 ⁷	(3.7 ± 2.7) x 10 ⁻³
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325)	2.6 x 10 ⁴ 2.5 x 10 ⁴ 2.0 x 10 ⁴	2.2 x 10 ⁵ 2.9 x 10 ⁵ 2.4 x 10 ⁵	7.4 x 10 ⁻³ 5.4 x 10 ⁻³ 5.2 x 10 ⁻³
Moyenne ± écart type	(2.4 ± 0.3) x 10 ⁴	(2.5 ± 0.4) x 10 ⁵	(6.0 ± 1.2) x 10 ⁻³
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328)	3.0 x 10 ⁶ 2.5 x 10 ⁶ 3.9 x 10 ⁶	1.6 x 10 ⁸ 0.9 x 10 ⁸ 1.2 x 10 ⁸	1.2 x 10 ⁻³ 1.7 x 10 ⁻³ 2.0 x 10 ⁻³
Moyenne ± écart type	(3.1 ± 0.7) x 10 ⁶	(1.2 ± 0.3) x 10 ⁸	(1.6 ± 0.4) x 10 ⁻³

Annexe 3: Résultats bruts de la survie des donatrices en UFC cm⁻³ au sein de l'effluent des réacteurs à biofilms mixtes de réceptrices et de donatrices. (UFC = unités formant colonie. Les donatrices sont introduites dans les réacteurs à biofilms contenant des réceptrices à l'équilibre. Les valeurs pour trois expérimentations au moins par souche, les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Souches étudiées	Temps (jours)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE325)	2.4 × 10 ⁺⁸	7.9 × 10 ⁺⁴	5.0 × 10 ⁺⁴	3.3 × 10 ⁺⁴	4.0 × 10 ⁺⁴	1.6 × 10 ⁺⁴	5.4 × 10 ⁺⁴	7.4 × 10 ⁺⁴
	3.6 × 10 ⁺⁸	3.9 × 10 ⁺⁴	3.0 × 10 ⁺⁴	2.0 × 10 ⁺⁴	4.0 × 10 ⁺⁴	7.0 × 10 ⁺⁴	1.4 × 10 ⁺⁴	3.0 × 10 ⁺⁴
	3.5 × 10 ⁺⁸	8.0 × 10 ⁺⁴	6.5 × 10 ⁺⁴	8.6 × 10 ⁺⁴	5.0 × 10 ⁺⁴	1.1 × 10 ⁺⁴	3.0 × 10 ⁺⁴	2.7 × 10 ⁺⁴
	3.3 × 10 ⁺⁸	5.2 × 10 ⁺⁴	4.4 × 10 ⁺⁴	9.5 × 10 ⁺⁴	4.2 × 10 ⁺⁴	3.1 × 10 ⁺⁴	4.7 × 10 ⁺⁴	3.0 × 10 ⁺⁴
	Moyenne ± écart type	(3.2 ± 0.5) × 10⁺⁸	(6.2 ± 2.0) × 10⁺⁴	(4.7 ± 1.4) × 10⁺⁴	(5.8 ± 3.7) × 10⁺⁴	(4.3 ± 0.5) × 10⁺⁴	(3.2 ± 2.7) × 10⁺⁴	(3.6 ± 1.8) × 10⁺⁴
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE328)	6.5 × 10 ⁺⁸	4.1 × 10 ⁺⁴	3.2 × 10 ⁺⁴	15.1 × 10 ⁺³	14.1 × 10 ⁺³	6.1 × 10 ⁺³	8.4 × 10 ⁺³	3.3 × 10 ⁺³
	6.8 × 10 ⁺⁸	1.1 × 10 ⁺⁴	0.4 × 10 ⁺⁴	1.2 × 10 ⁺³	2.4 × 10 ⁺³	1.3 × 10 ⁺³	3.5 × 10 ⁺³	4.4 × 10 ⁺³
	6.2 × 10 ⁺⁸	0.6 × 10 ⁺⁴	0.5 × 10 ⁺⁴	2.1 × 10 ⁺³	8.1 × 10 ⁺³	1.3 × 10 ⁺³	3.5 × 10 ⁺³	6.5 × 10 ⁺³
	6.3 × 10 ⁺⁸	3.7 × 10 ⁺⁴	4.3 × 10 ⁺⁴	11.4 × 10 ⁺³	10.2 × 10 ⁺³	5.4 × 10 ⁺³	5.2 × 10 ⁺³	5.6 × 10 ⁺³
	Moyenne ± écart type	(6.4 ± 0.3) × 10⁺⁸	(2.4 ± 1.8) × 10⁺⁴	(2.1 ± 1.9) × 10⁺⁴	(7.4 ± 6.9) × 10⁺³	(8.7 ± 4.9) × 10⁺³	(3.5 ± 2.6) × 10⁺³	(5.1 ± 2.3) × 10⁺³
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325)	1.6 × 10 ⁺⁸	8.4 × 10 ⁺⁴	3.1 × 10 ⁺³	1.3 × 10 ⁺³	3.7 × 10 ⁺³	5.0 × 10 ⁺³	9.0 × 10 ⁺²	6.1 × 10 ⁺²
	1.9 × 10 ⁺⁸	0.1 × 10 ⁺⁴	0.6 × 10 ⁺³	0.1 × 10 ⁺³	0.1 × 10 ⁺³	0.5 × 10 ⁺³	1.2 × 10 ⁺²	1.2 × 10 ⁺²
	1.7 × 10 ⁺⁸	0.4 × 10 ⁺⁴	0.5 × 10 ⁺³	0.1 × 10 ⁺³	0.1 × 10 ⁺³	0.6 × 10 ⁺³	2.2 × 10 ⁺²	1.3 × 10 ⁺²
	1.6 × 10 ⁺⁸	0.3 × 10 ⁺⁴	0.5 × 10 ⁺³	0.1 × 10 ⁺³	0.2 × 10 ⁺³	0.3 × 10 ⁺³	4.3 × 10 ⁺²	5.7 × 10 ⁺²
	3.3 × 10 ⁺⁸	4.5 × 10 ⁺⁴	2.1 × 10 ⁺³	3.2 × 10 ⁺³	1.8 × 10 ⁺³	0.8 × 10 ⁺³	4.5 × 10 ⁺²	4.1 × 10 ⁺²
	3.2 × 10 ⁺⁸	5.0 × 10 ⁺⁴	3.2 × 10 ⁺³	7.0 × 10 ⁺³	1.8 × 10 ⁺³	4.2 × 10 ⁺³	4.3 × 10 ⁺²	5.2 × 10 ⁺²
	3.4 × 10 ⁺⁸	5.3 × 10 ⁺⁴	3.5 × 10 ⁺³	3.0 × 10 ⁺³	1.0 × 10 ⁺³	1.2 × 10 ⁺³	0.5 × 10 ⁺²	5.3 × 10 ⁺²
	6.7 × 10 ⁺⁸	4.5 × 10 ⁺⁴	5.5 × 10 ⁺³	1.4 × 10 ⁺³	5.3 × 10 ⁺³	4.4 × 10 ⁺³	4.0 × 10 ⁺²	3.1 × 10 ⁺²
	6.9 × 10 ⁺⁸	5.9 × 10 ⁺⁴	6.4 × 10 ⁺³	1.6 × 10 ⁺³	6.1 × 10 ⁺³	5.4 × 10 ⁺³	3.3 × 10 ⁺²	2.7 × 10 ⁺²
	6.5 × 10 ⁺⁸	1.8 × 10 ⁺⁴	6.0 × 10 ⁺³	5.7 × 10 ⁺³	2.3 × 10 ⁺³	1.8 × 10 ⁺³	8.5 × 10 ⁺²	1.5 × 10 ⁺²
	6.3 × 10 ⁺⁸	2.1 × 10 ⁺⁴	9.0 × 10 ⁺³	2.0 × 10 ⁺³	1.0 × 10 ⁺³	0.9 × 10 ⁺³	4.5 × 10 ⁺²	5.2 × 10 ⁺²
	Moyenne ± écart type	(3.9 ± 2.2) × 10⁺⁸	(3.5 ± 2.7) × 10⁺⁴	(3.7 ± 2.8) × 10⁺³	(2.3 ± 2.2) × 10⁺³	(2.1 ± 2.0) × 10⁺³	(2.3 ± 2.0) × 10⁺³	(4.2 ± 2.6) × 10⁺²
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328)	6.4 × 10 ⁺⁸	7.2 × 10 ⁺⁵	0.9 × 10 ⁺⁵	1.9 × 10 ⁺⁴	0.4 × 10 ⁺⁴	2.2 × 10 ⁺⁴	3.1 × 10 ⁺⁴	1.4 × 10 ⁺⁴
	3.2 × 10 ⁺⁸	13.4 × 10 ⁺⁵	2.2 × 10 ⁺⁵	0.6 × 10 ⁺⁴	3.1 × 10 ⁺⁴	0.9 × 10 ⁺⁴	2.2 × 10 ⁺⁴	3.2 × 10 ⁺⁴
	1.8 × 10 ⁺⁸	4.9 × 10 ⁺⁵	1.1 × 10 ⁺⁵	3.2 × 10 ⁺⁴	1.3 × 10 ⁺⁴	2.3 × 10 ⁺⁴	1.4 × 10 ⁺⁴	2.5 × 10 ⁺⁴
	Moyenne ± écart type	(3.8 ± 2.3) × 10⁺⁸	(8.5 ± 4.4) × 10⁺⁵	(1.4 ± 0.7) × 10⁺⁵	(1.9 ± 1.3) × 10⁺⁴	(1.6 ± 1.3) × 10⁺⁴	(1.8 ± 0.8) × 10⁺⁴	(2.2 ± 0.8) × 10⁺⁴

Annexe 4 : Résultats bruts de la survie des réceptrices en UFC cm⁻³ au sein de l'effluent des réacteurs à biofilms mixtes de réceptrices et de donatrices, suivant le contexte génétique étudié. (UFC = unités formant colonie. Les valeurs pour trois expérimentations au moins par souche, les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Contextes étudiées	Temps (jours)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
<i>tra + mob + oriT⁺</i>	6.5 × 10 ⁺⁷ 4.2 × 10 ⁺⁷ 3.4 × 10 ⁺⁷ 4.3 × 10 ⁺⁷	7.3 × 10 ⁺⁷ 3.7 × 10 ⁺⁷ 3.3 × 10 ⁺⁷ 3.0 × 10 ⁺⁷	2.6 × 10 ⁺⁷ 4.5 × 10 ⁺⁷ 5.0 × 10 ⁺⁷ 3.9 × 10 ⁺⁷	4.0 × 10 ⁺⁷ 4.3 × 10 ⁺⁷ 2.5 × 10 ⁺⁷ 5.3 × 10 ⁺⁷	4.7 × 10 ⁺⁷ 5.2 × 10 ⁺⁷ 5.8 × 10 ⁺⁷ 4.5 × 10 ⁺⁷	6.2 × 10 ⁺⁷ 6.1 × 10 ⁺⁷ 1.3 × 10 ⁺⁷ 3.8 × 10 ⁺⁷	5.0 × 10 ⁺⁷ 4.1 × 10 ⁺⁷ 2.7 × 10 ⁺⁷ 5.3 × 10 ⁺⁷	7.4 × 10 ⁺⁷ 2.7 × 10 ⁺⁷ 1.7 × 10 ⁺⁷ 5.8 × 10 ⁺⁷
Moyenne ± écart type	(4.6 ± 1.3) × 10⁺⁷	(4.3 ± 2.0) × 10⁺⁷	(4.0 ± 1.0) × 10⁺⁷	(4.0 ± 1.1) × 10⁺⁷	(5.0 ± 0.6) × 10⁺⁷	(4.3 ± 2.3) × 10⁺⁷	(4.3 ± 1.2) × 10⁺⁷	(4.4 ± 2.6) × 10⁺⁷
<i>tra + mob + oriT⁻</i>	6.1 × 10 ⁺⁷ 4.3 × 10 ⁺⁷ 3.9 × 10 ⁺⁷ 3.2 × 10 ⁺⁷	5.1 × 10 ⁺⁷ 5.3 × 10 ⁺⁷ 3.1 × 10 ⁺⁷ 3.9 × 10 ⁺⁷	4.3 × 10 ⁺⁷ 3.6 × 10 ⁺⁷ 3.4 × 10 ⁺⁷ 1.3 × 10 ⁺⁷	1.2 × 10 ⁺⁷ 5.0 × 10 ⁺⁷ 4.7 × 10 ⁺⁷ 7.5 × 10 ⁺⁷	4.1 × 10 ⁺⁷ 5.9 × 10 ⁺⁷ 6.8 × 10 ⁺⁷ 4.5 × 10 ⁺⁷	3.2 × 10 ⁺⁷ 3.9 × 10 ⁺⁷ 3.3 × 10 ⁺⁷ 2.1 × 10 ⁺⁷	1.3 × 10 ⁺⁷ 3.7 × 10 ⁺⁷ 5.0 × 10 ⁺⁷ 2.0 × 10 ⁺⁷	4.5 × 10 ⁺⁷ 10.8 × 10 ⁺⁷ 4.9 × 10 ⁺⁷ 0.8 × 10 ⁺⁷
Moyenne ± écart type	(4.4 ± 1.2) × 10⁺⁷	(4.3 ± 1.0) × 10⁺⁷	(3.1 ± 1.3) × 10⁺⁷	(4.6 ± 2.6) × 10⁺⁷	(5.3 ± 1.2) × 10⁺⁷	(3.1 ± 0.7) × 10⁺⁷	(3.0 ± 1.7) × 10⁺⁷	(5.2 ± 4.1) × 10⁺⁷
<i>tra + mob + oriT⁺</i>	5.7 × 10 ⁺⁷ 3.2 × 10 ⁺⁷ 4.2 × 10 ⁺⁷ 3.9 × 10 ⁺⁷ 9.3 × 10 ⁺⁷ 5.9 × 10 ⁺⁷ 6.6 × 10 ⁺⁷ 8.1 × 10 ⁺⁷ 5.6 × 10 ⁺⁷ 5.1 × 10 ⁺⁷ 4.9 × 10 ⁺⁷	4.2 × 10 ⁺⁷ 1.1 × 10 ⁺⁷ 1.9 × 10 ⁺⁷ 3.4 × 10 ⁺⁷ 6.2 × 10 ⁺⁷ 4.9 × 10 ⁺⁷ 3.9 × 10 ⁺⁷ 2.3 × 10 ⁺⁷ 3.3 × 10 ⁺⁷ 3.4 × 10 ⁺⁷ 5.2 × 10 ⁺⁷	2.5 × 10 ⁺⁷ 2.1 × 10 ⁺⁷ 5.0 × 10 ⁺⁷ 4.6 × 10 ⁺⁷ 4.4 × 10 ⁺⁷ 8.9 × 10 ⁺⁷ 8.5 × 10 ⁺⁷ 4.8 × 10 ⁺⁷ 5.3 × 10 ⁺⁷ 5.2 × 10 ⁺⁷ 6.1 × 10 ⁺⁷	2.7 × 10 ⁺⁷ 4.3 × 10 ⁺⁷ 5.6 × 10 ⁺⁷ 3.6 × 10 ⁺⁷ 2.4 × 10 ⁺⁷ 3.9 × 10 ⁺⁷ 5.9 × 10 ⁺⁷ 6.2 × 10 ⁺⁷ 5.4 × 10 ⁺⁷ 4.1 × 10 ⁺⁷ 5.2 × 10 ⁺⁷	6.4 × 10 ⁺⁷ 7.0 × 10 ⁺⁷ 5.3 × 10 ⁺⁷ 1.7 × 10 ⁺⁷ 4.9 × 10 ⁺⁷ 5.2 × 10 ⁺⁷ 4.3 × 10 ⁺⁷ 4.2 × 10 ⁺⁷ 4.3 × 10 ⁺⁷ 5.4 × 10 ⁺⁷ 7.2 × 10 ⁺⁷	3.9 × 10 ⁺⁷ 3.5 × 10 ⁺⁷ 1.5 × 10 ⁺⁷ 1.9 × 10 ⁺⁷ 3.5 × 10 ⁺⁷ 9.9 × 10 ⁺⁷ 5.3 × 10 ⁺⁷ 6.1 × 10 ⁺⁷ 3.8 × 10 ⁺⁷ 6.3 × 10 ⁺⁷ 6.0 × 10 ⁺⁷	4.8 × 10 ⁺⁷ 5.7 × 10 ⁺⁷ 6.2 × 10 ⁺⁷ 1.3 × 10 ⁺⁷ 1.5 × 10 ⁺⁷ 1.3 × 10 ⁺⁷ 1.4 × 10 ⁺⁷ 1.2 × 10 ⁺⁷ 7.0 × 10 ⁺⁷ 5.6 × 10 ⁺⁷ 6.6 × 10 ⁺⁷	4.2 × 10 ⁺⁷ 6.6 × 10 ⁺⁷ 7.0 × 10 ⁺⁷ 3.4 × 10 ⁺⁷ 9.1 × 10 ⁺⁷ 2.1 × 10 ⁺⁷ 1.4 × 10 ⁺⁷ 4.1 × 10 ⁺⁷ 4.3 × 10 ⁺⁷ 6.1 × 10 ⁺⁷ 5.6 × 10 ⁺⁷
Moyenne ± écart type	(5.7 ± 1.8) × 10⁺⁷	(3.6 ± 1.5) × 10⁺⁷	(5.2 ± 2.1) × 10⁺⁷	(4.5 ± 1.3) × 10⁺⁷	(5.1 ± 1.5) × 10⁺⁷	(4.7 ± 2.4) × 10⁺⁷	(3.9 ± 2.5) × 10⁺⁷	(4.9 ± 2.2) × 10⁺⁷
<i>tra + mob + oriT⁺</i>	3.0 × 10 ⁺⁷ 3.9 × 10 ⁺⁷ 4.7 × 10 ⁺⁷	3.2 × 10 ⁺⁷ 3.7 × 10 ⁺⁷ 4.5 × 10 ⁺⁷	2.9 × 10 ⁺⁷ 3.2 × 10 ⁺⁷ 4.3 × 10 ⁺⁷	1.4 × 10 ⁺⁷ 2.5 × 10 ⁺⁷ 4.7 × 10 ⁺⁷	4.6 × 10 ⁺⁷ 4.2 × 10 ⁺⁷ 5.4 × 10 ⁺⁷	4.2 × 10 ⁺⁷ 4.9 × 10 ⁺⁷ 5.7 × 10 ⁺⁷	4.3 × 10 ⁺⁷ 5.1 × 10 ⁺⁷ 5.6 × 10 ⁺⁷	3.8 × 10 ⁺⁷ 6.4 × 10 ⁺⁷ 5.3 × 10 ⁺⁷
Moyenne ± écart type	(3.9 ± 0.8) × 10⁺⁷	(3.8 ± 0.6) × 10⁺⁷	(3.5 ± 0.7) × 10⁺⁷	(2.9 ± 1.7) × 10⁺⁷	(4.7 ± 0.6) × 10⁺⁷	(4.9 ± 0.7) × 10⁺⁷	(5.0 ± 0.6) × 10⁺⁷	(5.2 ± 1.3) × 10⁺⁷
Moyenne ± écart type pour les 4 contextes	(5.0 ± 1.6) × 10⁺⁷	(3.9 ± 1.4) × 10⁺⁷	(4.4 ± 1.8) × 10⁺⁷	(4.2 ± 1.6) × 10⁺⁷	(5.1 ± 1.2) × 10⁺⁷	(4.4 ± 2.0) × 10⁺⁷	(3.9 ± 2.0) × 10⁺⁷	(4.9 ± 2.5) × 10⁺⁷

Annexe 5 : Résultats bruts du dénombrement des bactéries par épifluorescence au DAPI (bactéries cm^{-3}) et par comptage des unités formant colonies (UFC cm^{-3}) sur un même échantillon.

Dénombrement par épifluorescence	Dénombrement des UFC
1.2×10^8	1.0×10^8
1.9×10^8	2.1×10^8
1.3×10^8	1.1×10^8
5.3×10^8	4.2×10^8
2.4×10^8	2.5×10^8
5.2×10^7	4.3×10^7
4.0×10^7	4.4×10^7
2.8×10^7	2.1×10^7
2.5×10^7	2.0×10^7
9.4×10^7	8.2×10^7
4.3×10^6	4.1×10^6
3.3×10^6	2.9×10^6
3.5×10^6	3.0×10^6
5.7×10^6	4.2×10^6
1.2×10^6	1.3×10^6
1.1×10^5	9.0×10^4
6.0×10^5	5.2×10^5
4.6×10^5	4.1×10^5
3.9×10^5	3.0×10^5
2.5×10^5	2.2×10^5

Annexe 6 : Résultats bruts des caractéristiques des biofilms mixtes à l'équilibre suivant les contextes étudiés. (UFC = unités formant colonie, X_{sus} correspond aux UFC dans l'effluent du réacteur, X_{fix} correspond aux UFC fixées au sein du biofilm. Les valeurs pour au moins trois réacteurs différents par contexte, les moyennes et les écarts types sur ces valeurs ont été reportés).

Contextes étudiés	X_{sus} (UFC cm ⁻³)	X_{fix} (UFC cm ⁻²)
<u><i>tra⁺ mob⁺ oriT⁺</i></u>	7.4 x 10 ⁷	2.7 x 10 ⁸
<i>Escherichia coli</i> K12 UB281	2.7 x 10 ⁷	2.2 x 10 ⁸
	1.7 x 10 ⁷	0.3 x 10 ⁸
	5.8 x 10 ⁷	3.1 x 10 ⁸
Moyenne ± écart type	(4.4 ± 2.6) x 10 ⁷	(2.1 ± 1.3) x 10 ⁸
<u><i>tra⁺ mob⁺ oriT⁻</i></u>	7.4 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁶
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE325)	3.0 x 10 ⁴	0.4 x 10 ⁶
	2.7 x 10 ⁴	0.1 x 10 ⁶
	3.0 x 10 ⁴	2.2 x 10 ⁶
Moyenne ± écart type	(4.0 ± 2.2) x 10 ⁴	(1.2 ± 1.1) x 10 ⁶
<u><i>tra⁺ mob⁺ oriT⁻</i></u>	4.5 x 10 ⁷	3.2 x 10 ⁸
<i>Escherichia coli</i> K12 UB281	10.8 x 10 ⁷	4.6 x 10 ⁸
	4.9 x 10 ⁷	4.7 x 10 ⁸
	0.8 x 10 ⁷	0.6 x 10 ⁸
Moyenne ± écart type	(5.2 ± 4.1) x 10 ⁷	(3.3 ± 1.9) x 10 ⁸
<u><i>tra⁺ mob⁻ oriT⁻</i></u>	3.3 x 10 ³	2.5 x 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE328)	4.4 x 10 ³	5.1 x 10 ⁵
	6.5 x 10 ³	11.2 x 10 ⁵
	5.6 x 10 ³	1.2 x 10 ⁵
Moyenne ± écart type	(5.0 ± 1.4) x 10 ³	(5.0 ± 4.4) x 10 ⁵
<u><i>tra⁺ mob⁻ oriT⁺</i></u>	4.2 x 10 ⁷	1.8 x 10 ⁸
<i>Escherichia coli</i> K12 UB281	6.6 x 10 ⁷	0.9 x 10 ⁸
	7.0 x 10 ⁷	0.09 x 10 ⁸
	3.4 x 10 ⁷	4.1 x 10 ⁸
	9.1 x 10 ⁷	1.8 x 10 ⁸
	2.1 x 10 ⁷	0.08 x 10 ⁸
	1.4 x 10 ⁷	0.1 x 10 ⁸
	4.1 x 10 ⁷	1.4 x 10 ⁸
	4.3 x 10 ⁷	2.4 x 10 ⁸
	6.1 x 10 ⁷	3.8 x 10 ⁸
	5.6 x 10 ⁷	0.8 x 10 ⁸
Moyenne ± écart type	(4.9 ± 2.2) x 10 ⁷	(1.6 ± 1.4) x 10 ⁸
<u><i>tra⁺ mob⁻ oriT⁻</i></u>	6.1 x 10 ²	3.2 x 10 ³
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325)	1.2 x 10 ²	2.4 x 10 ³
	1.3 x 10 ²	0.9 x 10 ³
	5.7 x 10 ²	9.4 x 10 ³
	4.1 x 10 ²	3.4 x 10 ³
	5.2 x 10 ²	0.3 x 10 ³
	5.3 x 10 ²	2.0 x 10 ³
	3.1 x 10 ²	2.5 x 10 ³
	2.7 x 10 ²	4.6 x 10 ³
	1.5 x 10 ²	9.3 x 10 ³
	5.2 x 10 ²	2.2 x 10 ³
Moyenne ± écart type	(3.8 ± 1.9) x 10 ²	(3.6 ± 3.0) x 10 ³
<u><i>tra⁺ mob⁻ oriT⁺</i></u>	3.8 x 10 ⁷	0.6 x 10 ⁸
<i>Escherichia coli</i> K12 UB281	6.4 x 10 ⁷	2.1 x 10 ⁸
	5.3 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁸
Moyenne ± écart type	(5.2 ± 1.3) x 10 ⁷	(1.4 ± 0.8) x 10 ⁸
<u><i>tra⁺ mob⁻ oriT⁻</i></u>	1.4 x 10 ⁴	1.7 x 10 ⁷
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328)	3.2 x 10 ⁴	9.6 x 10 ⁷
	2.5 x 10 ⁴	4.4 x 10 ⁷
Moyenne ± écart type	(2.4 ± 0.9) x 10 ⁴	(5.2 ± 4.0) x 10 ⁷

Annexe 7 : Résultats bruts des transconjugants exprimées en UFC cm⁻² obtenus après transfert au sein de biofilms mixtes à l'équilibre *Escherichia coli* K12 : réceptrices + donatrices dans différents contextes génétiques et après déduction des faux transconjugants qui peuvent se former sur les milieux sélectifs. (UFC = unités formant colonie, TC = transconjugants, N. D. = non détectées avec une limite de détection de 4.5 x 10⁻² UFC cm⁻². Les valeurs pour trois expérimentations au moins par contexte, les moyennes et les écarts types sur ces valeurs ont été reportés).

Les transconjugants obtenus	Contextes étudiés et plasmides contenus dans la donatrice			
	<i>tra⁺ mob⁺ oriT⁺</i> R388, pUB2380, pC325	<i>tra⁺ mob⁺ oriT⁻</i> R388, pUB2380, pC328	<i>tra⁺ mob⁻ oriT⁺</i> R388, pCE325	<i>tra⁺ mob⁻ oriT⁻</i> R388, pCE328
TCR388	1435 960 234 596	56 66 98 24	13 11 7 44 14 3 8 12 15 21 10	1956 7704 4920
Moyenne ± écart type	806 ± 513	61 ± 30	14 ± 11	4860 ± 2874
TCpUB2380	10 8 1 2	2 2 4 1	/	/
Moyenne ± écart type	5 ± 4	2 ± 1		
TCpCE325	29 20 3 4	/	N. D.	/
Moyenne ± écart type	14 ± 13			
TCpCE328	/	N. D.	/	N. D.

Annexe 8: Absorbances à 620 nm en fonction du temps et à différents temps permettant de déterminer le taux de croissance maximum de trois souches bactériennes 1) *Escherichia coli* K12 - 2) *Escherichia coli* K12 (pCE325) - 3) *Escherichia coli* K12 (pCE328). (Les valeurs en triplicat ainsi que les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Temps (heures)	Concentration en milieu nutritif L. B.											
	1.5			1			1/5			1/10		
	1)	2)	3)	1)	2)	3)	1)	2)	3)	1)	2)	3)
0	0.015	0.016	0.013	0.018	0.019	0.013	0.018	0.018	0.014	0.017	0.019	0.015
	0.015	0.017	0.012	0.016	0.018	0.013	0.017	0.018	0.014	0.017	0.018	0.015
	0.012	0.015	0.013	0.014	0.020	0.013	0.019	0.018	0.014	0.014	0.017	0.015
Moyenne± écart type	0.014± 0.001	0.016± 0.001	0.013± 0.001	0.016± 0.002	0.019± 0.001	0.013± 0.000	0.018± 0.001	0.018± 0.000	0.014± 0.000	0.016± 0.002	0.018± 0.001	0.015± 0.000
1	0.014	0.019	0.019	0.018	0.022	0.018	0.020	0.023	0.020	0.017	0.023	0.021
	0.014	0.018	0.018	0.018	0.021	0.019	0.019	0.022	0.020	0.017	0.022	0.020
	0.016	0.020	0.018	0.016	0.023	0.019	0.021	0.024	0.020	0.019	0.024	0.020
Moyenne± écart type	0.015± 0.001	0.019± 0.001	0.018± 0.001	0.017± 0.001	0.022± 0.001	0.019± 0.001	0.020± 0.001	0.023± 0.001	0.020± 0.000	0.018± 0.001	0.023± 0.001	0.020± 0.001
2	0.022	0.026	0.024	0.021	0.024	0.025	0.026	0.029	0.025	0.021	0.026	0.025
	0.022	0.026	0.026	0.021	0.023	0.024	0.027	0.028	0.025	0.020	0.025	0.025
	0.024	0.026	0.025	0.019	0.019	0.024	0.028	0.030	0.026	0.022	0.027	0.025
Moyenne± écart type	0.023± 0.001	0.026± 0.000	0.025± 0.001	0.020± 0.001	0.022± 0.003	0.024± 0.001	0.027± 0.001	0.029± 0.001	0.025± 0.001	0.021± 0.001	0.026± 0.001	0.025± 0.000
3	0.041	0.037	0.046	0.035	0.039	0.042	0.041	0.039	0.047	0.030	0.036	0.040
	0.041	0.036	0.044	0.038	0.038	0.040	0.042	0.038	0.046	0.035	0.035	0.039
	0.041	0.038	0.042	0.035	0.040	0.037	0.043	0.040	0.046	0.031	0.037	0.039
Moyenne± écart type	0.041± 0.000	0.037± 0.001	0.044± 0.002	0.036± 0.002	0.039± 0.001	0.040± 0.002	0.042± 0.001	0.039± 0.001	0.046± 0.001	0.032± 0.003	0.036± 0.001	0.039± 0.001
4	0.080	0.083	0.084	0.077	0.083	0.090	0.068	0.074	0.073	0.056	0.058	0.061
	0.086	0.084	0.082	0.079	0.082	0.093	0.072	0.075	0.071	0.055	0.060	0.061
	0.086	0.083	0.080	0.081	0.081	0.097	0.073	0.075	0.073	0.060	0.060	0.060
Moyenne± écart type	0.084± 0.003	0.083± 0.001	0.082± 0.002	0.079± 0.002	0.082± 0.001	0.093± 0.003	0.071± 0.003	0.075± 0.001	0.072± 0.001	0.057± 0.003	0.059± 0.001	0.061± 0.001
5	0.189	0.166	0.182	0.167	0.170	0.176	0.122	0.119	0.111	0.094	0.097	0.096
	0.193	0.169	0.178	0.167	0.169	0.179	0.125	0.118	0.105	0.097	0.097	0.096
	0.188	0.162	0.176	0.169	0.174	0.177	0.125	0.115	0.101	0.094	0.099	0.096
Moyenne± écart type	0.190± 0.003	0.166± 0.004	0.179± 0.003	0.168± 0.001	0.171± 0.003	0.177± 0.002	0.124± 0.002	0.117± 0.002	0.106± 0.005	0.095± 0.002	0.098± 0.001	0.096± 0.000
6	0.369	0.307	0.333	0.302	0.292	0.306	0.185	0.183	0.186	0.145	0.129	0.125
	0.375	0.304	0.329	0.302	0.298	0.296	0.189	0.181	0.187	0.144	0.132	0.124
	0.372	0.309	0.339	0.299	0.295	0.301	0.190	0.181	0.182	0.146	0.132	0.122
Moyenne± écart type	0.372± 0.003	0.307± 0.003	0.334± 0.005	0.301± 0.002	0.295± 0.003	0.301± 0.005	0.188± 0.003	0.182± 0.001	0.185± 0.002	0.145± 0.001	0.131± 0.002	0.124± 0.002
7	0.569	0.517	0.551	0.437	0.430	0.420	0.254	0.235	0.241	0.184	0.172	0.166
	0.579	0.512	0.546	0.439	0.438	0.402	0.255	0.232	0.238	0.191	0.179	0.161
	0.582	0.522	0.542	0.444	0.439	0.412	0.262	0.232	0.231	0.195	0.179	0.161
Moyenne± écart type	0.577± 0.007	0.517± 0.005	0.543± 0.002	0.440± 0.004	0.436± 0.005	0.411± 0.009	0.257± 0.004	0.233± 0.002	0.237± 0.005	0.190± 0.006	0.177± 0.004	0.163± 0.003

Annexe 9: Absorbances des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 - *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) - *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) et du témoin positif d'hydrophobicité : *Enterobacter hirae*. (Les valeurs de l'absorbance à 400 nm pour trois expérimentations par souche et par quantité d'hexadécane ajouté, ainsi que les moyennes et les écarts types correspondants ont été reportés).

Souches étudiées	Quantité d'hexadécane (µl) ajouté aux différentes suspensions bactériennes					
	0	200	350	500	650	1500
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832	1.082 1.080 1.095	1.074 1.081 1.077	1.080 1.091 1.075	1.086 1.092 1.079	1.067 1.077 1.081	1.074 1.076 1.087
Moyenne ± écart type	1.086 ±0.008	1.077 ±0.003	1.082 ±0.008	1.086 ±0.006	1.075 ±0.007	1.079 ±0.007
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325)	1.034 1.022 1.041	1.016 1.024 1.008	1.022 1.039 1.034	1.038 1.045 1.029	1.041 1.048 1.034	1.023 1.030 1.015
Moyenne ± écart type	1.032 ±0.010	1.016 ±0.008	1.032 ±0.009	1.037 ±0.008	1.041 ±0.007	1.023 ±0.007
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328)	1.031 1.042 1.029	1.025 1.042 1.014	1.026 1.041 1.019	1.031 1.050 1.029	1.030 1.046 1.024	1.033 1.038 1.029
Moyenne ± écart type	1.034 ±0.007	1.027 ±0.014	1.029 ±0.011	1.037 ±0.012	1.033 ±0.011	1.037 ±0.003
<i>Enterobacter hirae</i>	1.108 1.101 1.109	0.994 0.983 0.996	0.953 0.936 0.941	0.911 0.903 0.921	0.889 0.875 0.885	0.675 0.639 0.632
Moyenne ± écart type	1.106 ±0.004	0.991 ±0.007	0.943 ±0.009	0.912 ±0.009	0.883 ±0.007	0.649 ±0.023

Annexe 10 : Résultats bruts du suivi de l'adhésion sur pastilles de silicone de différentes souches bactériennes *Escherichia coli* K12 UB1832 contenant au moins le plasmide R388 exprimée en bactéries cm⁻² au cours du temps. (Les valeurs de trois expérimentations différentes, ainsi que les moyennes et les écarts types correspondants ont été reportés).

Souches étudiées	Temps (minutes)					
	0	5	30	60	120	240
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388)	3.7 × 10 ⁵ 2.9 × 10 ⁵ 3.2 × 10 ⁵	4.6 × 10 ⁵ 5.1 × 10 ⁵ 7.0 × 10 ⁵	5.2 × 10 ⁵ 6.2 × 10 ⁵ 8.8 × 10 ⁵	18.4 × 10 ⁵ 15.1 × 10 ⁵ 14.1 × 10 ⁵	21.3 × 10 ⁵ 16.6 × 10 ⁵ 17.2 × 10 ⁵	23.4 × 10 ⁵ 32.1 × 10 ⁵ 26.1 × 10 ⁵
Moyenne ± écart type	(3.3 ± 0.4) × 10 ⁵	(5.6 ± 1.3) × 10 ⁵	(6.7 ± 1.9) × 10 ⁵	(15.9 ± 2.2) × 10 ⁵	(18.4 ± 2.6) × 10 ⁵	(27.2 ± 4.4) × 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325)	1.4 × 10 ⁵ 3.0 × 10 ⁵ 2.4 × 10 ⁵	4.8 × 10 ⁵ 3.8 × 10 ⁵ 4.6 × 10 ⁵	7.1 × 10 ⁵ 6.2 × 10 ⁵ 7.1 × 10 ⁵	19.5 × 10 ⁵ 18.4 × 10 ⁵ 16.5 × 10 ⁵	24.3 × 10 ⁵ 22.9 × 10 ⁵ 22.1 × 10 ⁵	41.0 × 10 ⁵ 28.8 × 10 ⁵ 36.4 × 10 ⁵
Moyenne ± écart type	(2.3 ± 0.8) × 10 ⁵	(4.4 ± 0.5) × 10 ⁵	(6.8 ± 0.5) × 10 ⁵	(18.1 ± 1.5) × 10 ⁵	(23.1 ± 1.1) × 10 ⁵	(35.4 ± 6.2) × 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328)	1.8 × 10 ⁵ 2.1 × 10 ⁵ 2.2 × 10 ⁵	4.3 × 10 ⁵ 8.5 × 10 ⁵ 7.0 × 10 ⁵	18.4 × 10 ⁵ 11.1 × 10 ⁵ 11.2 × 10 ⁵	37.0 × 10 ⁵ 36.2 × 10 ⁵ 38.5 × 10 ⁵	43.1 × 10 ⁵ 45.3 × 10 ⁵ 40.4 × 10 ⁵	60.5 × 10 ⁵ 60.7 × 10 ⁵ 51.8 × 10 ⁵
Moyenne ± écart type	(2.0 ± 0.2) × 10 ⁵	(6.6 ± 2.1) × 10 ⁵	(13.6 ± 4.2) × 10 ⁵	(37.2 ± 1.2) × 10 ⁵	(42.9 ± 2.4) × 10 ⁵	(57.7 ± 5.1) × 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325) curée en <i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388)	2.6 × 10 ⁵ 2.1 × 10 ⁵ 1.9 × 10 ⁵	5.9 × 10 ⁵ 5.4 × 10 ⁵ 5.9 × 10 ⁵	8.9 × 10 ⁵ 8.0 × 10 ⁵ 8.9 × 10 ⁵	15.4 × 10 ⁵ 15.9 × 10 ⁵ 15.0 × 10 ⁵	17.7 × 10 ⁵ 17.8 × 10 ⁵ 18.2 × 10 ⁵	26.5 × 10 ⁵ 26.8 × 10 ⁵ 26.4 × 10 ⁵
Moyenne ± écart type	(2.5 ± 0.4) × 10 ⁵	(5.7 ± 0.3) × 10 ⁵	(8.6 ± 0.5) × 10 ⁵	(15.4 ± 0.4) × 10 ⁵	(17.9 ± 0.3) × 10 ⁵	(26.6 ± 0.2) × 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328) curée en <i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388)	2.4 × 10 ⁵ 1.6 × 10 ⁵ 1.2 × 10 ⁵	7.1 × 10 ⁵ 5.3 × 10 ⁵ 3.7 × 10 ⁵	9.3 × 10 ⁵ 7.0 × 10 ⁵ 8.6 × 10 ⁵	15.7 × 10 ⁵ 13.8 × 10 ⁵ 13.1 × 10 ⁵	18.7 × 10 ⁵ 16.1 × 10 ⁵ 17.3 × 10 ⁵	29.2 × 10 ⁵ 26.3 × 10 ⁵ 26.0 × 10 ⁵
Moyenne ± écart type	(1.7 ± 0.6) × 10 ⁵	(5.4 ± 1.7) × 10 ⁵	(8.3 ± 1.2) × 10 ⁵	(14.2 ± 1.3) × 10 ⁵	(17.4 ± 1.3) × 10 ⁵	(27.2 ± 1.8) × 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388) transformée en <i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325)	2.0 × 10 ⁵ 1.9 × 10 ⁵ 2.1 × 10 ⁵	4.5 × 10 ⁵ 4.0 × 10 ⁵ 4.4 × 10 ⁵	7.3 × 10 ⁵ 6.4 × 10 ⁵ 7.1 × 10 ⁵	18.0 × 10 ⁵ 16.5 × 10 ⁵ 16.5 × 10 ⁵	22.6 × 10 ⁵ 22.9 × 10 ⁵ 22.1 × 10 ⁵	30.8 × 10 ⁵ 30.9 × 10 ⁵ 30.2 × 10 ⁵
Moyenne ± écart type	(2.0 ± 0.1) × 10 ⁵	(4.3 ± 0.3) × 10 ⁵	(6.9 ± 0.5) × 10 ⁵	(17.0 ± 0.9) × 10 ⁵	(22.5 ± 0.4) × 10 ⁵	(30.6 ± 0.4) × 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388) transformée en <i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328)	2.0 × 10 ⁵ 1.7 × 10 ⁵ 1.9 × 10 ⁵	6.1 × 10 ⁵ 5.4 × 10 ⁵ 7.0 × 10 ⁵	12.2 × 10 ⁵ 10.9 × 10 ⁵ 14.0 × 10 ⁵	34.2 × 10 ⁵ 33.8 × 10 ⁵ 35.6 × 10 ⁵	41.7 × 10 ⁵ 43.9 × 10 ⁵ 44.9 × 10 ⁵	53.4 × 10 ⁵ 53.3 × 10 ⁵ 58.6 × 10 ⁵
Moyenne ± écart type	(1.9 ± 0.1) × 10 ⁵	(6.2 ± 0.8) × 10 ⁵	(12.4 ± 1.6) × 10 ⁵	(34.5 ± 0.9) × 10 ⁵	(43.5 ± 1.6) × 10 ⁵	(55.1 ± 3.0) × 10 ⁵

Annexe 11 : Résultats bruts du suivi de l'adhésion sur pastilles de silicone des souches bactériennes *Escherichia coli* K12 UB1832, *Escherichia coli* K12 UB1832 traitée au DCCD, *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325), *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328 amplifié) exprimée en bactéries cm⁻² au cours du temps. (Les valeurs de trois expérimentations différentes, les moyennes et les écarts types correspondants ont été reportés, DCCD = NN' dicyclohexylcarbodiimide).

Souches étudiées	Temps (minutes)					
	0	5	30	60	120	240
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832	0.9 × 10 ⁵ 1.4 × 10 ⁵ 1.1 × 10 ⁵	2.1 × 10 ⁵ 2.3 × 10 ⁵ 1.9 × 10 ⁵	2.7 × 10 ⁵ 2.6 × 10 ⁵ 2.5 × 10 ⁵	2.7 × 10 ⁵ 3.2 × 10 ⁵ 2.7 × 10 ⁵	2.9 × 10 ⁵ 3.4 × 10 ⁵ 2.9 × 10 ⁵	3.3 × 10 ⁵ 3.8 × 10 ⁵ 3.2 × 10 ⁵
Moyenne ± écart type	(1.1 ± 0.2) x 10 ⁵	(2.1 ± 0.2) x 10 ⁵	(2.6 ± 0.1) x 10 ⁵	(2.9 ± 0.3) x 10 ⁵	(3.1 ± 0.3) x 10 ⁵	(3.4 ± 0.3) x 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 traitée au DCCD	1.0 × 10 ⁵ 1.0 × 10 ⁵ 1.0 × 10 ⁵	1.8 × 10 ⁵ 1.7 × 10 ⁵ 1.8 × 10 ⁵	2.5 × 10 ⁵ 2.5 × 10 ⁵ 2.5 × 10 ⁵	2.5 × 10 ⁵ 2.6 × 10 ⁵ 2.8 × 10 ⁵	3.0 × 10 ⁵ 2.9 × 10 ⁵ 3.1 × 10 ⁵	3.5 × 10 ⁵ 3.3 × 10 ⁵ 3.6 × 10 ⁵
Moyenne ± écart type	(1.0 ± 0.0) x 10 ⁵	(1.8 ± 0.1) x 10 ⁵	(2.5 ± 0.0) x 10 ⁵	(2.6 ± 0.1) x 10 ⁵	(3.0 ± 0.1) x 10 ⁵	(3.5 ± 0.1) x 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (pCE325)	0.4 × 10 ⁵ 0.5 × 10 ⁵ 0.8 × 10 ⁵	1.1 × 10 ⁵ 1.4 × 10 ⁵ 1.9 × 10 ⁵	3.3 × 10 ⁵ 1.6 × 10 ⁵ 1.7 × 10 ⁵	2.2 × 10 ⁵ 2.4 × 10 ⁵ 2.1 × 10 ⁵	3.0 × 10 ⁵ 2.1 × 10 ⁵ 2.7 × 10 ⁵	2.9 × 10 ⁵ 3.1 × 10 ⁵ 3.0 × 10 ⁵
Moyenne ± écart type	(0.6 ± 0.2) x 10 ⁵	(1.5 ± 0.4) x 10 ⁵	(2.2 ± 0.9) x 10 ⁵	(2.2 ± 0.1) x 10 ⁵	(2.6 ± 0.5) x 10 ⁵	(3.0 ± 0.1) x 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (pCE328)	0.4 × 10 ⁵ 0.4 × 10 ⁵ 0.4 × 10 ⁵	1.5 × 10 ⁵ 1.4 × 10 ⁵ 1.4 × 10 ⁵	1.6 × 10 ⁵ 1.6 × 10 ⁵ 1.5 × 10 ⁵	2.5 × 10 ⁵ 2.6 × 10 ⁵ 2.6 × 10 ⁵	2.9 × 10 ⁵ 3.0 × 10 ⁵ 3.2 × 10 ⁵	3.6 × 10 ⁵ 3.6 × 10 ⁵ 3.9 × 10 ⁵
Moyenne ± écart type	(0.4 ± 0.1) x 10 ⁵	(1.4 ± 0.1) x 10 ⁵	(1.6 ± 0.1) x 10 ⁵	(2.6 ± 0.1) x 10 ⁵	(3.0 ± 0.1) x 10 ⁵	(3.7 ± 0.2) x 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (pCE328 amplifié)	1.8 × 10 ⁵ 1.4 × 10 ⁵ 1.5 × 10 ⁵	2.9 × 10 ⁵ 3.1 × 10 ⁵ 2.8 × 10 ⁵	3.4 × 10 ⁵ 3.3 × 10 ⁵ 3.2 × 10 ⁵	4.1 × 10 ⁵ 4.2 × 10 ⁵ 4.2 × 10 ⁵	5.0 × 10 ⁵ 4.9 × 10 ⁵ 5.2 × 10 ⁵	8.6 × 10 ⁵ 10.0 × 10 ⁵ 9.8 × 10 ⁵
Moyenne ± écart type	(1.6 ± 0.2) x 10 ⁵	(2.9 ± 0.1) x 10 ⁵	(3.3 ± 0.1) x 10 ⁵	(4.2 ± 0.1) x 10 ⁵	(5.0 ± 0.1) x 10 ⁵	(9.5 ± 0.8) x 10 ⁵

Annexe 12: Adhésion après 240 minutes (bactéries cm^{-2}) de différentes souches en fonction de l'ADN plasmidique contenu dans les différentes souches étudiées. (Les valeurs de trois expérimentations différentes, ainsi que les moyennes et les écarts types correspondants ont été reportés).

Souches étudiées	Adhésion en 240 minutes	$\mu\text{g d'ADN} \times 10^{-8}$ bactéries
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (pCE325)	2.5×10^5 2.6×10^5 2.2×10^5	8.0 7.0 7.0
Moyenne \pm écart type	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^5$	7.3 ± 0.6
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (pCE328)	3.2×10^5 3.2×10^5 3.5×10^5	8.0 8.3 8.1
Moyenne \pm écart type	$(3.3 \pm 0.2) \times 10^5$	8.1 ± 0.1
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (pCE328 amplifié)	6.8×10^5 8.6×10^5 8.3×10^5	22.5 23.4 21.0
Moyenne \pm écart type	$(7.9 \pm 1.0) \times 10^5$	22.3 ± 1.2
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388)	19.7×10^5 29.2×10^5 22.9×10^5	9.5 10.4 8.6
Moyenne \pm écart type	$(23.9 \pm 4.8) \times 10^5$	9.5 ± 0.9
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325)	39.6×10^5 25.8×10^5 34.0×10^5	11.1 10.2 9.4
Moyenne \pm écart type	$(33.1 \pm 6.9) \times 10^5$	10.2 ± 0.8
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328)	58.7×10^5 58.6×10^5 49.6×10^5	13.5 12.2 11.6
Moyenne \pm écart type	$(55.6 \pm 5.2) \times 10^5$	12.4 ± 1.0

Annexe 13 : Résultats bruts des plasmides cotransférés dans une même souche réceptrice par vérification de la croissance sur un milieu gélosé ne contenant qu'un seul antibiotique. (Rif = rifampicine : résistance chromosomique de la souche donatrice, Cm = chloramphénicol : résistance des plasmides pCE325 et pCE328, Km = kanamycine : résistance du plasmide pUB2380, Tp = trimétoprime : résistance du plasmide R388, Nal = acide nalidixique : résistance chromosomique de la souche réceptrice, TC = transconjugants. Les valeurs pour au moins trois expériences par contexte génétique, ainsi qu'entre parenthèses : les moyennes et les écarts types des rapports transconjugants qui croissent sur antibiotique isolé par transconjugants vérifiés ont été reportés).

Souches donatrices et contextes étudiés	Milieux gélosés +	Souches réceptrices isolées comme transconjugants :		
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE325)		90-95-100-76 TC R388 vérifiés	49-41-40-42 TC pUB2380 vérifiés	65-71-62-59 TC pCE25 vérifiés
	Rif	0-0-0-0 (0.00 ± 0.00)	0-0-0-0 (0.00 ± 0.00)	0-0-0-0 (0.00 ± 0.00)
	Cm	22-17-20-17 (0.21 ± 0.03)	40-30-33-34 (0.79 ± 0.04)	65-71-62-59 (1.00 ± 0.00)
	Km	2-4-3-4 (0.03 ± 0.01)	49-41-40-42 (1.00 ± 0.00)	17-18-16-13 (0.25 ± 0.02)
	Tp	90-95-100-76 (1.00 ± 0.00)	49-41-40-42 (1.00 ± 0.00)	65-71-62-58 (0.99 ± 0.01)
	Nal	90-95-100-76 (1.00 ± 0.00)	49-41-40-42 (1.00 ± 0.00)	65-71-62-59 (1.00 ± 0.00)
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE328)		110-102-109-114 TC R388 vérifiés	60-71-57-60 TC pUB2380 vérifiés	TC pCE328
	Rif	0-0-0-0 (0.00 ± 0.00)	0-0-0-0 (0.00 ± 0.00)	0-0-4-6 Résistance à tous les anti-
	Cm	0-0-0-0 (0.00 ± 0.00)	0-0-0-0 (0.00 ± 0.00)	0-0-4-6 biotiques = mélange de
	Km	15-12-13-19 (0.13 ± 0.02)	60-71-57-60 (1.00 ± 0.00)	0-0-4-6 bactéries donatrices et
	Tp	110-102-109-114 (1.00 ± 0.00)	60-71-57-60 (1.00 ± 0.00)	0-0-4-6 réceptrices.
	Nal	110-102-109-114 (1.00 ± 0.00)	60-71-57-60 (1.00 ± 0.00)	Pas de TC(pCE328)
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE325)		92-110-122-108-94-139-88-79-101-115-138 TC R388 vérifiés	/	TC pCE325
	Rif	0-0-0-0-0-0-0-0-0-0 (0 ± 0)		
	Cm	0-0-0-0-0-0-0-0-0-0 (0 ± 0)		
	Tp	92-110-122-108-94-139-88-79-101-115-138 (1.00 ± 0.00)		
	Nal	92-110-122-108-94-139-88-79-101-115-138 (1.00 ± 0.00)		
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388, pCE328)		62-59-58 TC R388 vérifiés	/	TC pCE328
	Rif	0-0-0 (0.00 ± 0.00)		25-27-28 Résistance à tous les
	Cm	0-0-0 (0.00 ± 0.00)		25-27-28 antibiotiques = mélange
	Tp	62-59-58 (1.00 ± 0.00)		25-27-28 de bactéries donatrices
	Nal	62-59-58 (1.00 ± 0.00)		25-27-28 et réceptrices.
				Pas de TC(pCE328)

Annexe 14 : Résultats bruts de la stabilité des plasmides des bactéries donatrices fixées au sein de biofilms mixtes à l'équilibre. (Rif = rifampicine : résistance chromosomique de la souche donatrice, Cm = chloramphénicol : résistance des plasmides pCE325 et pCE328, Km = kanamycine : résistance du plasmide pUB2380, Tp = triméthoprim : résistance du plasmide R388, Nal = acide nalidixique : résistance chromosomique de la souche réceptrice, TC = transconjugants. Les valeurs pour au moins trois expériences par contexte génétique, ainsi qu'entre parenthèses : les moyennes et les écarts types des rapports donatrices qui croissent sur antibiotique isolé par transconjugants vérifiés ont été reportés).

Souches donatrices et contextes génétiques étudiées	Milieux gélifiés +	Donatrices vérifiées
<i>tra⁺ mob⁺ oriT⁺</i>		70-81-75-60
Escherichia coli K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE325)	Nal Cm Tp Km Rif	0-0-0-0 (0.00 ± 0.00) 70-81-75-60 (1.00 ± 0.00) 70-81-75-60 (1.00 ± 0.00) 70-81-75-60 (1.00 ± 0.00) 70-81-75-60 (1.00 ± 0.00)
<i>tra⁺ mob⁺ oriT⁻</i>		72-79-83-69
Escherichia coli K12 UB1832 (R388, pUB2380, pCE328)	Nal Cm Tp Km Rif	0-0-0-0 (0.00 ± 0.00) 60-69-71-52 (0.83 ± 0.05) 72-79-83-69 (1.00 ± 0.00) 72-79-83-69 (1.00 ± 0.00) 72-79-83-69 (1.00 ± 0.00)
<i>tra⁺ mob⁻ oriT⁺</i>		62-53-60-54-59-56-61-51-60-62-62
Escherichia coli K12 UB1832 (R388, pCE325)	Nal Cm Tp Rif	0-0-0-0-0-0-0-0-0-0 (0.00 ± 0.00) 62-53-60-54-59-56-61-51-60-62-62 (1.00 ± 0.00) 62-53-60-54-59-56-61-51-60-62-62 (1.00 ± 0.00) 62-53-60-54-59-56-61-51-60-62-62 (1.00 ± 0.00)
<i>tra⁺ mob⁻ oriT⁻</i>		30-30-30
Escherichia coli K12 UB1832 (R388, pCE328)	Nal Cm Tp Rif	0-0-0 (0.00 ± 0.00) 28-28-29 (0.94 ± 0.02) 30-30-30 (1.00 ± 0.00) 30-30-30 (1.00 ± 0.00)

Annexe 15 : Résultats bruts de la survie des donatrices en UFC cm⁻³ au sein de l'effluent des réacteurs à lit fixe contenant la souche donatrice et le mélange de 10 souches réceptrices isolées de boues activées. (Les donatrices sont introduites dans les réacteurs contenant le mélange de réceptrices à l'équilibre. Les valeurs pour trois expérimentations par souche, les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Temps (jours)	Souches étudiées			
	Mélange des 10 réceptrices des boues	<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388)	Mélange des 10 réceptrices des boues	<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (pCE328)
0	6.2 x 10 ⁷ 5.4 x 10 ⁷ 6.1 x 10 ⁷	6.7 x 10 ⁸ 6.2 x 10 ⁸ 6.4 x 10 ⁸	5.2 x 10 ⁷ 4.4 x 10 ⁷ 6.1 x 10 ⁷	6.8 x 10 ⁸ 7.0 x 10 ⁸ 6.5 x 10 ⁸
Moyenne ± écart type	(5.9 ± 0.4) x 10 ⁷	(6.4 ± 0.2) x 10 ⁸	(5.2 ± 0.8) x 10 ⁷	(6.8 ± 0.2) x 10 ⁸
1	7.7 x 10 ⁷ 6.2 x 10 ⁷ 5.4 x 10 ⁷	2.5 x 10 ⁴ 4.2 x 10 ⁴ 3.8 x 10 ⁴	6.8 x 10 ⁷ 4.9 x 10 ⁷ 5.1 x 10 ⁷	11.2 x 10 ⁴ 8.1 x 10 ⁴ 11.6 x 10 ⁴
Moyenne ± écart type	(6.4 ± 1.2) x 10 ⁷	(3.5 ± 0.9) x 10 ⁴	(5.6 ± 1.0) x 10 ⁷	(10.3 ± 1.9) x 10 ⁴
2	5.5 x 10 ⁷ 4.9 x 10 ⁷ 5.2 x 10 ⁷	0.7 x 10 ⁴ 1.2 x 10 ⁴ 1.1 x 10 ⁴	2.3 x 10 ⁷ 4.4 x 10 ⁷ 5.3 x 10 ⁷	2.5 x 10 ⁴ 1.8 x 10 ⁴ 2.6 x 10 ⁴
Moyenne ± écart type	(5.2 ± 0.3) x 10 ⁷	(1.1 ± 0.3) x 10 ⁴	(4.0 ± 1.5) x 10 ⁷	(2.3 ± 0.4) x 10 ⁴
3	4.0 x 10 ⁷ 5.1 x 10 ⁷ 4.3 x 10 ⁷	1.1 x 10 ⁴ 1.4 x 10 ⁴ 1.1 x 10 ⁴	5.9 x 10 ⁷ 4.7 x 10 ⁷ 5.6 x 10 ⁷	6.6 x 10 ⁴ 5.2 x 10 ⁴ 7.1 x 10 ⁴
Moyenne ± écart type	(4.5 ± 0.6) x 10 ⁷	(1.2 ± 0.2) x 10 ⁴	(5.4 ± 0.6) x 10 ⁷	(6.3 ± 1.0) x 10 ⁴
4	2.8 x 10 ⁷ 6.2 x 10 ⁷ 5.2 x 10 ⁷	2.4 x 10 ⁴ 2.1 x 10 ⁴ 1.2 x 10 ⁴	3.4 x 10 ⁷ 5.9 x 10 ⁷ 4.5 x 10 ⁷	6.5 x 10 ⁴ 4.8 x 10 ⁴ 5.8 x 10 ⁴
Moyenne ± écart type	(4.7 ± 1.7) x 10 ⁷	(1.9 ± 0.6) x 10 ⁴	(4.6 ± 1.2) x 10 ⁷	(5.7 ± 0.8) x 10 ⁴
5	3.3 x 10 ⁷ 3.4 x 10 ⁷ 6.1 x 10 ⁷	2.5 x 10 ⁴ 1.3 x 10 ⁴ 1.0 x 10 ⁴	6.1 x 10 ⁷ 5.1 x 10 ⁷ 4.2 x 10 ⁷	5.3 x 10 ⁴ 4.6 x 10 ⁴ 5.4 x 10 ⁴
Moyenne ± écart type	(4.3 ± 1.6) x 10 ⁷	(1.6 ± 0.8) x 10 ⁴	(5.1 ± 0.9) x 10 ⁷	(5.1 ± 0.4) x 10 ⁴

Annexe 16 : Résultats bruts des différentes populations exprimées en UFC cm⁻² au sein de biofilms mixtes à l'équilibre : donatrice et mélange des 10 souches réceptrices isolées des boues activées, suivant le plasmide contenu dans la souche donatrice. (UFC = unités formant colonie, N. D. = non détectées avec une limite de détection de 4.5×10^{-2} UFC cm⁻². Les transconjugants sont estimés après déduction des faux transconjugants qui peuvent se former sur les milieux sélectifs. Les valeurs pour trois expérimentations différentes, ainsi que les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Les différentes populations bactériennes	Plasmides contenus dans la souche <i>Escherichia coli</i> K12 UB1832	
	R388	pCE328
Donatrices	2.4×10^6 1.4×10^6 1.6×10^6	2.5×10^5 4.3×10^5 2.8×10^5
Moyenne ± écart type	$(1.8 \pm 0.5) \times 10^6$	$(3.2 \pm 1.0) \times 10^5$
Réceptrices	1.3×10^8 0.9×10^8 1.1×10^8	1.6×10^8 5.0×10^8 2.7×10^8
Moyenne ± écart type	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^8$	$(3.1 \pm 1.7) \times 10^8$
Transconjugants	26 28 17	N. D. N. D. N. D.
Moyenne ± écart type	17 ± 9	

Annexe 17 : Résultats bruts des caractéristiques des biofilms de réceptrices isolées des boues ou de donatrices pures à l'équilibre. (X_{sus} correspond aux bactéries dans l'effluent du réacteur ; X_{fix} correspond aux bactéries fixées au sein du biofilm et μ correspond au taux de croissance du biofilm à l'équilibre. Les valeurs pour trois expérimentations par souche, les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Souches étudiées	X_{sus} (bactéries cm^{-3})	X_{fix} (bactéries cm^{-2})	μ (h^{-1})
Réceptrices	8.4×10^7 9.1×10^7 7.5×10^7	4.8×10^8 4.5×10^8 3.1×10^8	1.1×10^{-2} 1.3×10^{-2} 1.5×10^{-2}
Moyenne \pm écart type	$(8.3 \pm 0.8) \times 10^7$	$(4.1 \pm 0.9) \times 10^8$	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^{-2}$
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (R388)	5.2×10^5 6.1×10^5 4.2×10^5	5.9×10^6 7.3×10^6 4.8×10^6	5.5×10^{-3} 5.2×10^{-3} 5.5×10^{-3}
Moyenne \pm écart type	$(5.2 \pm 0.9) \times 10^5$	$(6.0 \pm 1.2) \times 10^6$	$(5.4 \pm 0.2) \times 10^{-3}$
<i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 (pCE328)	3.1×10^6 2.4×10^6 1.9×10^6	3.9×10^7 3.2×10^7 2.2×10^7	5.0×10^{-3} 4.7×10^{-3} 5.4×10^{-3}
Moyenne \pm écart type	$(2.5 \pm 0.6) \times 10^6$	$(3.1 \pm 0.8) \times 10^7$	$(5.0 \pm 0.3) \times 10^{-3}$

Annexe 18 : Résultats bruts du suivi du mélange des 10 souches réceptrices isolées de boues activées avant introduction des donatrices au sein de réacteurs "batch-séquencés" par mesure de l'épifluorescence au DAPI et exprimées en bactéries cm^{-3} . (Les valeurs pour deux réacteurs différents par expérience, les moyennes et les écarts types sur ces valeurs ont été reportés).

Temps (jours)	Mélange des 10 souches réceptrices avant introduction de la donatrice contenant le plasmide R388	Mélange des 10 souches réceptrices avant introduction de la donatrice contenant le plasmide pCE328
0	5.8×10^7 5.8×10^7 $(5.8 \pm 0.0) \times 10^7$	5.7×10^7 5.7×10^7 $(5.7 \pm 0.0) \times 10^7$
1	6.7×10^7 6.0×10^7 $(6.3 \pm 0.3) \times 10^7$	1.3×10^8 1.1×10^8 $(1.2 \pm 0.1) \times 10^8$
2	8.5×10^7 9.8×10^7 $(9.1 \pm 0.6) \times 10^7$	2.3×10^8 2.1×10^8 $(2.2 \pm 0.1) \times 10^8$
3	1.5×10^8 1.5×10^8 $(1.5 \pm 0.0) \times 10^8$	2.0×10^8 2.0×10^8 $(2.0 \pm 0.0) \times 10^8$
4	1.6×10^8 1.5×10^8 $(1.5 \pm 0.1) \times 10^8$	3.5×10^8 3.2×10^8 $(53.3 \pm 0.1) \times 10^8$
5	1.4×10^8 2.4×10^8 $(1.9 \pm 0.5) \times 10^8$	3.2×10^8 2.5×10^8 $(2.8 \pm 0.3) \times 10^8$
6	1.7×10^8 1.9×10^8 $(1.8 \pm 0.1) \times 10^8$	2.9×10^8 2.7×10^8 $(2.8 \pm 0.1) \times 10^8$
7	1.9×10^8 2.6×10^8 $(2.2 \pm 0.3) \times 10^8$	/
8	2.9×10^8 2.6×10^8 $(2.7 \pm 0.1) \times 10^8$	/
9	2.6×10^8 2.6×10^8 $(2.6 \pm 0.0) \times 10^8$	/
10	1.7×10^8 2.1×10^8 $(1.9 \pm 0.2) \times 10^8$	/
11	1.6×10^8 1.5×10^8 $(1.5 \pm 0.1) \times 10^8$	/
12	1.9×10^8 2.1×10^8 $(2.0 \pm 0.1) \times 10^8$	/
13	2.2×10^8 2.1×10^8 $(2.1 \pm 0.1) \times 10^8$	/

Annexe 19: Résultats bruts du suivi en UFC cm⁻³ des différentes populations bactériennes en réacteurs "batch-séquencés": le mélange de 10 souches réceptrices isolées de boues activées, la donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) et les transconjugants R388, ainsi que les valeurs théoriques dues au taux de dilution de la biomasse des donatrices et des transconjugants: chaque jour 1/10 de la biomasse bactérienne est éliminée. (UFC = unités formant colonie. Les transconjugants sont estimés après déduction des faux transconjugants qui peuvent se former sur les milieux sélectifs. Les valeurs pour deux expériences, ainsi que les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Temps (jours)	Les différentes populations bactériennes			Taux de dilution de la biomasse bactérienne	
	Donatrices	Réceptrices	Transconjugants	Donatrices	Transconjugants
0	1.5 × 10 ⁷ 2.7 × 10 ⁷	2.2 × 10 ⁸ 2.1 × 10 ⁸	0 0	2.1 × 10 ⁷	/
Moyennes ± écart type	(2.1 ± 0.6) × 10 ⁷	(2.1 ± 0.1) × 10 ⁸	0 ± 0		
1	3.2 × 10 ⁷ 2.1 × 10 ⁷	8.0 × 10 ⁷ 1.8 × 10 ⁷	6800 700	1.9 × 10 ⁷	3375
Moyennes ± écart type	(2.6 ± 0.5) × 10 ⁷	(4.9 ± 3.1) × 10 ⁷	3750 ± 3050		
2	1.9 × 10 ⁷ 1.9 × 10 ⁷	1.2 × 10 ⁷ 5.0 × 10 ⁵	500 29	1.7 × 10 ⁷	3038
Moyennes ± écart type	(1.9 ± 0.0) × 10 ⁷	(6.2 ± 5.7) × 10 ⁶	264 ± 235		
3	3.3 × 10 ⁷ 0.8 × 10 ⁷	1.0 × 10 ⁷ 5.1 × 10 ⁶	61 53	1.5 × 10 ⁷	2734
Moyennes ± écart type	(2.0 ± 1.2) × 10 ⁷	(7.5 ± 2.4) × 10 ⁶	57 ± 4		
5	5.1 × 10 ⁶ 7.5 × 10 ⁶	1.8 × 10 ⁸ 2.1 × 10 ⁸	680 40	1.2 × 10 ⁷	2215
Moyennes ± écart type	(6.3 ± 1.2) × 10 ⁶	(1.9 ± 0.1) × 10 ⁸	360 ± 320		
8	1.0 × 10 ⁷ 1.1 × 10 ⁷	1.6 × 10 ⁸ 1.6 × 10 ⁸	150 0	9.0 × 10 ⁶	1616
Moyennes ± écart type	(1.0 ± 0.1) × 10 ⁷	(1.6 ± 0.0) × 10 ⁸	75 ± 75		
10	4.0 × 10 ⁶ 5.7 × 10 ⁶	3.5 × 10 ⁸ 4.0 × 10 ⁸	12 2	7.3 × 10 ⁶	1309
Moyennes ± écart type	(4.8 ± 0.8) × 10 ⁶	(3.7 ± 0.2) × 10 ⁸	7 ± 5		
15	4.0 × 10 ⁵ 5.4 × 10 ⁶	2.5 × 10 ⁸ 3.0 × 10 ⁸	2 0	4.3 × 10 ⁶	773
Moyennes ± écart type	(2.9 ± 2.5) × 10 ⁶	(2.7 ± 0.2) × 10 ⁸	1 ± 1		
20	5.0 × 10 ⁵ 1.9 × 10 ⁶	3.2 × 10 ⁸ 1.3 × 10 ⁸	N. D. N. D.	2.5 × 10 ⁶	456
Moyennes ± écart type	(1.2 ± 0.7) × 10 ⁶	(2.2 ± 0.9) × 10 ⁸			

Annexe 20: Résultats bruts du suivi en UFC cm⁻³ des différentes populations bactériennes en réacteurs "batch-séquencés": le mélange de 10 souches réceptrices isolées de boues activées, la donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) et les transconjugants pCE328, ainsi que les valeurs théoriques dues au taux de dilution de la biomasse des donatrices : chaque jour 1/10 de la biomasse bactérienne est éliminée. (UFC = unités formant colonie. Les transconjugants sont estimés après déduction des faux transconjugants qui peuvent se former sur les milieux sélectifs. Les valeurs pour deux expériences, ainsi que les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Temps (jours)	Les différentes populations bactériennes			Taux de dilution de la biomasse bactérienne
	Donatrices	Réceptrices	Transconjugants	Donatrices
0	2.0 × 10 ⁷ 2.0 × 10 ⁷	2.2 × 10 ⁸ 2.9 × 10 ⁸	0 0	2.0 × 10 ⁷
Moyennes ± écart type	(2.0 ± 0.0) × 10 ⁷	(2.5 ± 0.3) × 10 ⁸	0 ± 0	
1	1.3 × 10 ⁷ 1.7 × 10 ⁷	6.7 × 10 ⁸ 7.0 × 10 ⁸	N. D. N. D.	1.8 × 10 ⁷
Moyennes ± écart type	(1.5 ± 0.2) × 10 ⁷	(6.8 ± 0.1) × 10 ⁸		
2	1.4 × 10 ⁷ 1.6 × 10 ⁷	1.1 × 10 ⁹ 7.0 × 10 ⁸	N. D. N. D.	1.6 × 10 ⁷
Moyennes ± écart type	(1.5 ± 0.1) × 10 ⁷	(9.0 ± 2.0) × 10 ⁸		
3	8.5 × 10 ⁶ 7.1 × 10 ⁶	1.5 × 10 ⁸ 2.4 × 10 ⁸	N. D. N. D.	1.4 × 10 ⁷
Moyennes ± écart type	(7.8 ± 0.7) × 10 ⁶	(1.9 ± 0.4) × 10 ⁸		
5	1.9 × 10 ⁶ 3.6 × 10 ⁶	3.4 × 10 ⁸ 5.0 × 10 ⁸	N. D. N. D.	1.2 × 10 ⁷
Moyennes ± écart type	(2.7 ± 0.8) × 10 ⁶	(4.2 ± 0.8) × 10 ⁸		
8	1.0 × 10 ⁶ 1.4 × 10 ⁶	3.3 × 10 ⁸ 2.1 × 10 ⁸	N. D. N. D.	9.0 × 10 ⁶
Moyennes ± écart type	(1.2 ± 0.2) × 10 ⁶	(2.7 ± 0.6) × 10 ⁸		
10	3.7 × 10 ⁵ 4.5 × 10 ⁵	0.9 × 10 ⁸ 1.2 × 10 ⁸	N. D. N. D.	7.3 × 10 ⁶
Moyennes ± écart type	(4.1 ± 0.4) × 10 ⁵	(1.0 ± 0.1) × 10 ⁸		
15	1.0 × 10 ³ 2.0 × 10 ⁵	1.3 × 10 ⁸ 1.2 × 10 ⁸	N. D. N. D.	4.3 × 10 ⁶
Moyennes ± écart type	(1.0 ± 1.0) × 10 ⁵	(1.2 ± 0.1) × 10 ⁸		
20	2.0 × 10 ³ 8.0 × 10 ⁴	1.2 × 10 ⁸ 1.2 × 10 ⁸	N. D. N. D.	2.5 × 10 ⁶
Moyennes ± écart type	(4.1 ± 3.9) × 10 ⁴	(1.2 ± 0.0) × 10 ⁸		

8) RÉSUMÉ :

Le relargage accidentel de micro-organismes génétiquement modifiés (GEMS) est possible dans les milieux naturels, il faut donc pouvoir évaluer le devenir de ces GEMS. Pour cela, le transfert et la survie de ces GEMS dans divers microcosmes représentatifs de l'environnement constituent une information pertinente. Dans cette optique, avons donc décidé d'étudier le transfert et la survie de plasmides à ADN recombiné dans des réacteurs à lit fixe alimentés en continu (biofilms) et des réacteurs "batch-séquencés", choisis comme modèles du traitement biologique d'eaux usées.

Notre travail a porté sur la validation de réacteurs à lit fixe pour l'étude du transfert de plasmides recombinants entre deux souches *Escherichia coli*, ensuite sur le transfert d'un plasmide recombinant entre *Escherichia coli* et des souches isolées de boues activées au sein de réacteurs à lit fixe et en réacteurs "batch-séquencés" et enfin sur la mobilisation de plasmides recombinants par la biomasse de boues activées sur boîtes de Pétri.

Le transfert de plasmides recombinants entre souches d'*Escherichia coli* K12 au sein de réacteurs à lit fixe a été réalisé dans différents contextes en présence ou en absence d'éléments mobilisateurs *tra* porté par le plasmide R388 et *mob* porté par le plasmide pUB2380. Les donatrices ont été introduites dans le réacteur à lit fixe quand le biofilm de bactéries réceptrices se trouve à un état d'équilibre apparent. L'implantation des donatrices au sein de biofilms mixtes varie de $(3.6 \pm 3.0) \times 10^3$ UFC cm⁻² pour la donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) à $(5.2 \pm 1.3) \times 10^7$ UFC cm⁻² pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328). Cette différence d'implantation des donatrices a été étudiée, et il en a été conclu que l'implantation de la souche donatrice suivant le contenu plasmidique n'était pas liée à une différence de croissance, ni à une différence d'hydrophobicité des différentes donatrices. Mais que cette différence de fixation pourrait être liée à une vitesse d'adhésion plus importante pour la souche contenant le plasmide pCE328. Cette vitesse d'adhésion étant elle-même liée à un plus fort nombre de copies du plasmide pCE328 comparativement à pCE325. De plus, lors des cinétiques d'adhésion, il a été

montré que la présence du plasmide R388 multipliait d'un facteur 10 la vitesse d'adhésion des souches hôtes. Cette augmentation de la vitesse d'adhésion pourrait être due à la présence des pili conjugatifs codés par le plasmide R388.

Le transfert du plasmide pCE325 (*oriT*⁺) n'est détecté que dans le contexte le plus favorable, c'est à dire en présence des gènes *tra* et *mob* avec une fréquence apparente de $(1.6 \pm 1.0) \times 10^{-5}$ transconjugants par donatrice. Alors que le transfert du plasmide pCE328 (*oriT*⁻) n'est détecté dans aucun des contextes. Le regroupement de tous les résultats concernant le plasmide R388 quel que soit le contexte génétique étudié, nous a permis d'établir une corrélation positive significative ($R=0.82$) entre le nombre de transconjugants R388 formés et le nombre de donatrices colonisant les biofilms mixtes. Cette relation nous montre que le nombre de transconjugants formés augmentent avec le nombre de donatrices présentes au sein des biofilms.

Cette étude au sein de biofilms mixtes d'*Escherichia coli* n'ayant pas permis de détecter le transfert du plasmide pCE328 (*oriT*⁻), nous avons décidé d'étudier la mobilisation de ce plasmide par des souches isolées de boues activées au sein de réacteurs à lit fixe et en réacteurs "batch-séquencés", comparativement au plasmide conjugatif R388. Des éléments mobilisateurs comme les transposons pouvant se trouver au sein de ces souches des boues.

Les possibilités de mobilisation du plasmide pCE328 (*oriT*⁻) par des souches provenant de boues activées ont donc été étudiées. Un mélange de dix souches bactériennes isolées de boues activées a été cultivé soit fixé sur un support dans un réacteur à lit fixe alimenté en continu, soit en suspension dans un réacteur "batch-séquencé" avec recyclage de biomasse. Après avoir atteint un état d'équilibre apparent, la population bactérienne des deux types de réacteurs a été utilisée comme population réceptrice pour évaluer la dissémination du plasmide pCE328. La dissémination de ce plasmide recombinant non conjugatif (*oriT*⁻) a été étudiée comparativement à celle du plasmide naturel conjugatif R388 à large spectre d'hôte.

La survie des souches d'*Escherichia coli* porteuses, soit du plasmide pCE328, soit du plasmide R388, et introduites dans les réacteurs de boues activées a été évaluée à partir de mesures effectuées dans l'effluent des deux types de réacteurs. Dans l'effluent du réacteur à lit fixe, les donatrices sont toujours stables dès le premier jour de fonctionnement et se maintiennent entre 10^4 à 10^5 UFC cm^{-3} , alors qu'au niveau des réacteurs à alimentation séquencée, les donatrices diminuent. Les donatrices porteuses du plasmide pCE328 diminuent de deux log en 20 jours, alors que celles porteuses du plasmide R388 diminuent de moins d'un log en 20 jours. Cette diminution de moins d'un log en 20 jours étant en fait du au taux de dilution de la biomasse bactérienne.

Dans tous les cas, la mobilisation du plasmide pCE328 n'a pas été détectée. Le transfert du plasmide conjugatif R388, utilisé ici comme témoin positif de conjugaison a été observé dans les souches provenant de boues activées dans les deux types de réacteurs. Toutefois, la stabilisation des transconjugants n'a été observée que dans la biomasse fixée avec, un taux de transfert de $(9.3 \pm 2.9) \times 10^{-6}$ transconjugants par donatrice.

La mobilisation du plasmide pCE328 n'ayant toujours pas été mise en évidence, nous avons décidé d'augmenter les chances de transfert en se plaçant sur boîtes de Pétri et en utilisant la biomasse totale des boues activées.

La mobilisation du plasmide pCE328 dépourvu d'origine de transfert a été étudiée comparativement à celle du plasmide pCE325 portant une origine de transfert. Cette étude de mobilisation a été réalisée en présence ou en absence des éléments "helpers" *tra* porté par le plasmide R388 et *mob* porté par le plasmide pUB2380 et en présence ou en absence de la biomasse totale des boues activées susceptibles de contenir des éléments mobilisateurs comme les transposons.

Seule la mobilisation du plasmide pCE325 a pu être mise en évidence. De plus, ce plasmide est mobilisé uniquement quand les plasmides "helpers" R388 et

pUB2380 sont présents dans la souche réceptrice, et le nombre de transconjugants par donatrice diminue d'un facteur 10 en présence de la biomasse des boues activées. Les taux de transfert étant de 10^{-4} transconjugants par donatrice en absence des boues activées et 3.5×10^{-5} transconjugants par donatrice en présence des boues activées. La mobilisation par conduction du plasmide pCE328 n'a pas pu être mise en évidence malgré une limite de détection allant jusqu'à 6.9×10^{-9} transconjugants par donatrice.

9) TRAVAUX PUBLIES :

Recombinant plasmid DNA mobilization by activated sludge strains grown in fixed-bed or sequenced-batch reactors

N. Frank, A.M. Simao-Beauvoir, M.A. Dollard, P. Bauda *

Microbiology Laboratory, Centre des Sciences de l'Environnement, 1 rue des Recollets, 57040 Metz Cedex 1, France

Received 20 November 1995; revised 16 July 1996; accepted 16 July 1996

Abstract

The possibilities of mobilizing recombinant DNA (rDNA) by strains from activated sludge have been studied. A mixture of ten bacterial strains isolated from activated sludge was grown on a support in a continuously fed fixed-bed reactor or in suspension in a sequenced-batch reactor with biomass recycling. After reaching steady state, the bacteria in both types of reactors were used as the recipient population for evaluating the dissemination of the non-conjugative and non-mobilizable recombinant plasmid pCE328. The dissemination of this plasmid, derived from pBR328 (*tra*⁻, *mob*⁻, *oriT*⁻), was studied in comparison with that of pCE325 (pBR325 derivative *tra*⁻, *mob*⁻, *oriT*⁺) and that of the natural broad host range conjugative plasmid R388 (IncW). Initially the mobilization properties of pBR type recombinant plasmids between two strains of *Escherichia coli* were determined in the fixed-bed reactor. Only the mobilization of the recombinant plasmid bearing a transfer origin (pCE325) was observed. The survival of *E. coli* strains bearing either the non-transferable plasmid pCE328 or the conjugative plasmid R388 and added to the activated sludge reactors was measured in the effluent of both types of reactors. In the fixed-bed reactor effluent, the donor populations remained stable after three days of operation and reached 10³ to 10⁵ colony forming units (cfu) ml⁻¹, whereas they decreased in the sequenced-batch reactors: donors bearing the pCE328 plasmid decreased by 2 log units in 20 days, whereas those bearing the R388 plasmid decreased by less than 1 log unit. Mobilization of the pCE328 plasmid could not be detected in any case. Transfer of the conjugative plasmid R388, used as a positive propagation control, was detected in strains arising from activated sludge in both types of reactors. Nevertheless, establishment of transconjugants was observed only in the fixed biomass at the rate of 10⁻⁷ transconjugants per recipient.

Keywords: Genetically engineered microorganism; Mobilization; Biofilm; Sequenced-batch reactor

1. Introduction

Risk assessment related to accidental release of genetically engineered microorganisms needs to

evaluate the potentialities of rDNA dissemination within autochthonous bacteria. Three mechanisms of horizontal DNA transfer are well known: natural transformation, transduction and conjugation. Transduction and transformation are encountered primarily between strains of identical or closely related species, whereas conjugation can involve a broader spectrum of bacterial species [1]; inter-Gram conjugal transfers

* Corresponding author. Tel: +33 87 75 81 84; Fax: +33 87 75 81 89.

have thus been reported [2]. In contrast to other modes of transfer, conjugation is effective since the DNA transferred is a replicon, and its maintenance thus does not require homologous recombination with the genome of the recipient strains. This mode of genetic transfer is limited primarily by plasmid incompatibility and restriction-modification systems.

Recombinant plasmids generally lack mobilizer genes (*mob*) and transfer genes (*tra*) by construction and therefore are not self-transferable. Some may bear a transfer origin (*oriT*⁺) and their transfer is made possible by the presence of bacteria in the natural medium bearing conjugative plasmids and mobilizer genes (*tra*⁺, *mob*⁺) compatible with the transfer origin of the recombinant plasmid [3]. Another possibility of transfer mechanism is retromobilization in which bacteria carrying transfer and mobilizer genes can become recipients for non self-transferable plasmids [4]. In addition, plasmids lacking the *oriT* sequence can transfer only by the participation of class II Tn3 family transposons [5]. These transposons possess a replicative transposition mechanism during which a cointegrate is formed between two DNA molecules [6,7].

The present study verified the transfer properties of recombinant pBR-type plasmids bearing or lacking a transfer origin, in the presence and absence of 'helper' elements: *tra*⁺ harbored by the R388 plasmid and *mob*⁺ encoded by pUB2380.

We also investigated the transfer of two plasmids to strains obtained from activated sludge: (i) recombinant plasmid pCE328 (*oriT*⁻) derived from pBR328 [8–11] including the vaccinia virus thymidine kinase gene as a tracer sequence; and (ii) a natural conjugative plasmid, R388 (IncW). Transfer of the recombinant plasmid pCE328 to activated sludge strains was evaluated in comparison to that of the natural conjugative plasmid R388 in two types of reactors, both representative of the biological processing of waste water, where bacterial biomass could reach an apparent steady state after a given operating period. A fixed-bed continuously fed reactor was used to study the propagation of plasmids within the fixed biomass. A sequenced-batch reactor with biomass recycling was used to study the propagation of the same plasmids in a suspended biomass. Sequenced-batch reactors were chosen to obtain in small sludge volume (200 ml) a dissociation between biomass and hydraulic retention times as operated in waste water biological treatment plant.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains and plasmids used are described in Table 1. The strains from activated sludge were

Table 1
Characteristics of strains and plasmids

		Genotypes	References
Strains	<i>E. coli</i> K12 UB1832	<i>his</i> ⁻ , <i>try</i> ⁻ , <i>lys</i> ⁻ , Sm ^r , Rif ^r , <i>lac</i> ⁻	[12]
	<i>E. coli</i> K12 UB281	<i>pro</i> ⁻ , <i>met</i> ⁻ , Nal ^r	[13]
	Ten strains isolated from activated sludge	Amp ^r	This study
Plasmids	R388 (33 kb) originated from <i>E. coli</i>	Tp ^r , Su ^r , <i>tra</i> ⁺ , IncW	[14]
	pCE325 (6.5 kb) plasmid derived from pBR325	Amp ^r , Cm ^r , <i>oriT</i> ⁺ , <i>tk-vacc</i> , <i>par</i>	[8,9]
	pCE328 (5.5 kb) plasmid derived from pBR328	Amp ^r , Cm ^r , <i>oriT</i> ⁻ , <i>tk-vacc</i> , <i>par</i>	[9–11]
	pUB2380 (8.6 kb) <i>E. coli</i> plasmid from the liquid manure of a pig farm	Km ^r , <i>mob</i> ⁺	[15]

lac⁻, auxotrophic for lactose-fermentation; *his*⁻, auxotrophy for histidine; *try*⁻, auxotrophy for tryptophan; *lys*⁻, auxotrophy for lysine; *pro*⁻, auxotrophy for proline; *met*⁻, auxotrophy for methionine; *tra*⁺, transfer genes; *mob*⁺, mobilization genes; *oriT*⁺, transfer origin gene; *tk-vacc*, vaccinia virus thymidine kinase gene used as tracer [16]; *par*, gene from pBR327-*par* involved in the partition mechanism [17]; Tp^r, trimethoprim resistance; Su^r, sulfamide resistance; Amp^r, ampicillin resistance; Cm^r, chloramphenicol resistance; Km^r, kanamycin resistance; Sm^r, streptomycin resistance; Rif^r, rifampicin resistance; Nal^r, nalidixic acid resistance.

obtained from the Metz waste water treatment plant. Ten strains were chosen according to properties allowing discrimination with donor strain. Three of the ten clones could be identified by API 20 E tests (bioMérieux, Cat. No. 20100) as *Klebsiella oxytoca*, two others were shown to belong to *Enterobacter* and *Klebsiella* genus. They were isolated on minimal M9 agar medium [18] in the presence of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG, Interchim, Cat. No. UP848530) at a concentration of $144 \mu\text{g ml}^{-1}$ and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal, Interchim, Cat. No. UP4053430) at a concentration of $120 \mu\text{g ml}^{-1}$. Blue colonies (lactose⁺) selected on this medium were then isolated on Fluorocult agar (Merck, Cat. No. 4038), for rapid detection of *E. coli* under UV light. Nine non-fluorescent clones and one fluorescent clone were selected and stored. These ten clones were facultatively anaerobic Gram-negative bacteria.

2.2. Media and culture conditions

Strains of *E. coli* and the clones obtained from sludge were grown in Luria Bertani medium (LB), pH 7.2, containing 10 g tryptone (bioMérieux, Cat. No. 51091), 5 g yeast extract (bioMérieux, Cat. No. 23121), 5 g sodium chloride (Merck, Cat. No. 6404) and H₂O to 1 l. Cultures of donor and recipient bacteria used in the exponential phase to inoculate the reactors were grown in LB medium. They were centrifuged at $8000 \times g$ for 5 min at 4°C and resuspended in LB medium at 1:100 in order to obtain an absorbance of 0.6 at 620 nm. A mixture composed of equal volumes of each of the suspensions of recipient sludge strains was prepared.

The selective agar media used were Mueller-Hinton agar (MH, Diagnostics Pasteur, Cat. No. 64884) for *E. coli* strains and minimal M9 agar medium containing β -lactose (Sigma, Cat. No. L-3750) for strains isolated from the treatment plant sludge. Selective agents were aseptically incorporated in autoclaved media from 100-fold concentrated stock solutions. The final concentrations were: nalidixic acid (Sigma, Cat. No. N-8878) $40 \mu\text{g ml}^{-1}$; kanamycin (Sigma, Cat. No. K-4000) $25 \mu\text{g ml}^{-1}$; streptomycin (Sigma, Cat. No. S-6501); $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol (Sigma, Cat. No. C-0378) $25 \mu\text{g ml}^{-1}$; trimethoprim (Sigma, Cat. No. T-7883) $25 \mu\text{g ml}^{-1}$

and rifampicin (Sigma, Cat. No. R-3501) $100 \mu\text{g ml}^{-1}$.

2.3. Bacterial cell counts by epifluorescence microscopy

The determination of bacterial cell counts by epifluorescence microscopy was adapted from King and Parker [19] and from Porter and Feig [20]. Samples stored in 5% formaldehyde (Merck, Cat. No. 4003) were diluted in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.1 (Tris-hydroxymethyl-aminomethane, Sigma, Cat. No. T-1378; hydrochloric acid, Merck, Cat. No. 319 2500) sterilized by filtration (Analytapore filters A2902512, $0.22 \mu\text{m}$ porosity), in order to establish a total number of 10^6 to 10^7 cells/9 ml. One ml of stock solution of 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI, Sigma, Cat. No. D1388) at a final concentration of $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ and filtered just before use through a $0.22 \mu\text{m}$ filter was added to the sample. After stirring for 15 min, the mixture was filtered under low pressure through a previously moistened, black polycarbonate membrane (Millipore, Cat. No. GTBPO4700, 47 mm diameter, $0.22 \mu\text{m}$ porosity). Slides were read by epifluorescence microscopy ($\lambda_{\text{excitation}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} > 390 \text{ nm}$). Thirty microscopic fields were randomly counted.

2.4. Production of bacterial biofilms

Biofilms were produced in fixed-bed reactors composed of glass columns 20 cm long and 4 cm in diameter, packed with 4 mm diameter glass beads used as the support to bind microorganisms and then to permit growth. A column feed circuit continuously supplied nutrients to the reactor. The circuit included a rapid circulation loop that ensured homogeneous distribution of the nutrients in the reactor (for a more complete description, see Ref. [21]). The reactors were inoculated by cell suspensions in 0.01 strength LB medium containing bacteria (recipients) in exponential phase at an absorbance of 0.6 at 620 nm.

The reactors were run in the following conditions: LB medium diluted 1:100 and containing 60 ppm dissolved organic carbon, hydraulic residence time 1 h, feed rate 150 ml h^{-1} , dilution rate 1.07 h^{-1} , recycling rate 18500 ml h^{-1} , reactor surface 2450 cm^2 , reactor volume 140 ml, temperature 25°C, pH 6.5.

2.5. Study of genetic transfers by mobilization in continuously grown biofilms

Initially, a biofilm was formed only of recipient bacteria (*E. coli* K12 UB281 or sludge strain depending on the experiment). The steady state of this biofilm was estimated by daily absorbance measurements at 620 nm and bacterial counts by epifluorescence microscopy, both conducted on the reactor output effluent [21]. After the recipient biofilm reached steady state (3–5 days), donor bacteria were added at the approximate ratio of 1 donor per 10 recipients. Recipient densities were estimated by epifluorescence microscopy after detachment from glass beads by sonication (Biolock 600 W H72441 Sonicator, 30 s, 80% of active cycle, 20 W) or by Vortex mixing.

When donors were added to the reactor, interstitial liquid was removed from the column and it was filled with the suspension of donor bacteria. The reactor was then run as a batch system without external nutrient supply for 5 h, but with the recycling circuit connected to ensure homogeneous distribution of the microorganisms in the reactor. The above-mentioned operating conditions were then re-established.

The appearance of transconjugants was evaluated daily in samples taken from the reactor output by determining colony forming units (cfu) appearing on transconjugant-selective medium after 24 h at 37°C for *E. coli* to *E. coli* transfers and after 48 h at room temperature for transfers from *E. coli* to sludge strains.

After the mixed donor-recipient-transconjugant biofilm reached steady state, the reactor was stopped and 9 samples of biofilm support material were taken throughout the entire reactor height. The biofilm was detached by sonication (Biolock 600 W H72441 Sonicator, 30 s, 80% of active cycle, 20 W) or by Vortex mixing. The supernatant was recovered for epifluorescence counting of total bacteria and enumeration of cfu for total donors, recipients and transconjugants. Table 1 lists the different plasmid-encoded elements in the donor strains used.

During each experiment (conducted in triplicate), control reactors containing only the donor or recipient strains were run in parallel in order to prepare a control for the production of transconjugants (TC) in selective Petri dishes during incubation.

2.6. Sequenced-batch reactor with biomass recycling

The activated sludge microcosm was a 200 ml sequenced-batch reactor prepared in a 500 ml Erlenmeyer flask. It was fed by an artificial sewage adapted from Bouillot et al. [22] containing the following (in mg l⁻¹): soluble starch (Sigma) 500; sucrose (Merck) 210; methionine (Sigma) 22.5; urea (Prolabo) 40; acetic acid (Merck) 130; pancreatic hydrolysate of casein (Biomérieux) 120 and disodium hydrogenphosphate (Prolabo) 20. Artificial sewage was prepared daily from a 20 × concentrated stock solution sterilized by autoclaving and diluted with tap water. The water used was obtained from the Metz city water system, whose chemical oxygen demand (COD) was 14 ± 1 ppm. The COD/N/P

Table 2

Bacterial populations obtained after plasmid transfer between two strains of *E. coli* K12 in different genetic contexts in biofilms at equilibrium

	<i>E. coli</i> K12 UB1832 donor strains containing plasmids			
	R388, pUB2380, pCE325	R388, pUB2380, pCE328	R388, pCE325	R388, pCE328
D	(1.2 ± 1.1) × 10 ⁶	(5.0 ± 4.4) × 10 ⁵	(3.6 ± 3.0) × 10 ³	(5.2 ± 4.0) × 10 ⁷
R	(2.1 ± 1.3) × 10 ⁸	(3.3 ± 1.9) × 10 ⁸	(1.6 ± 1.4) × 10 ⁸	(1.4 ± 0.8) × 10 ⁸
TC pCE325	14 ± 13	–	N.D.	–
TC pCE328	–	N.D.	–	N.D.
TC pUB2380	5 ± 4	2 ± 1	–	–
TC R388	806 ± 513	61 ± 30	14 ± 11	4860 ± 2874

The values are expressed in cfu cm⁻²; D, donors; R, recipients; TC, transconjugants; N.D., not detected, detection limit is 1 cfu ml⁻¹ or 4.5 × 10⁻² cfu cm⁻²; R388 plasmid is *tra*⁺; pUB3280 plasmid is *mob*⁺; pCE325 plasmid is *oriT*⁺; pCE328 plasmid is *oriT*⁻; data are means of at least three experiments with corresponding standard deviation.

ratio was 200:7.1:1 and the COD of the effluent was 1 g l^{-1} . Every 24 h, 46 ml were removed and centrifuged for 5 min at $12000 \times g$ at 4°C . The pellet was taken up in 66 ml synthetic effluent before being re-introduced into the reactor, and 20 ml of the reactor volume were sampled for epifluorescence microscopic analysis of the bacterial population. The COD was determined on the same sample after eliminating the biomass by centrifugation (5 min at $12000 \times g$ at 4°C). This reactor is thus characterized by a hydraulic residence time of 3 days and a sludge age of 10 days.

2.7. Genetic transfers by mobilization in the sequenced-batch reactor

Bacterial suspensions were prepared as described above. Recipient bacteria were added to the reactor with 200 ml of effluent diluted 1:3. The activated sludge microcosm was first brought to steady state before adding the donor bacteria.

Donors in exponential phase were added to the microcosm at the ratio of one donor per 10 recipients (determined by epifluorescence). They were suspended in the effluent at the moment of its renewal. The parameters monitored were residual COD, total bacteria by epifluorescence, total cfu, cfu of recipients, cfu of donors, cfu of transconjugants; temperature was 25°C and pH was 7.5. For each transfer experiment of plasmids pCE328 and R388, one 'donor only' reactor and one 'recipient only' reactor were maintained in parallel with the test reactors in order to determine transconjugants formed in Petri dishes of selective medium used for transconjugants enumeration.

2.8. Verification of transconjugants

After two successive isolations, the phenotype of selected transconjugant clones was verified by transfer to separate media containing different antibiotics specific to the clones. Transconjugants of plasmids pCE328 and R388, obtained in *E. coli* to sludge strains transfers, were also verified by direct polymerase chain reaction (PCR) using specific primers for pCE328 (fragment of the thymidine kinase gene of 250 bp): $5'$ -ATGTTTGACAGCTTATCATC- $3'$ and $5'$ -TTCTTATCATGCGTCCATAG- $3'$ and spe-

cific primers for R388 (Simonet, personal communication) corresponding to a fragment of the hydrofolate reductase gene containing 137 bp [23]: $5'$ -CAAACCTGCCCTGCAACGGGA- $3'$ and $5'$ -GTTGTGCTGGTGCTTTCTAG- $3'$. The amplified DNA was analysed on an 1:100 agarose gel (FMC, Cat. No. 50092).

In addition, hybridization on colonies [24] was conducted with a probe consisting of the *Hind*III-*Sal*I fragment of *tk-vacc* specific for pCE328. This fragment was obtained by digestion of plasmid DNA [24]. After migration in a 7:1000 agarose gel (FMC, Cat. No. 50002), it was purified by GeneClean (BIO101, Cat. No. 1001-400) and then labeled by using a Non-radioactive DIG DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer-Mannheim, Cat. No. 1093 657) using the protocol of the manufacturer.

3. Results

3.1. *E. coli* to *E. coli* transfers

E. coli to *E. coli* transfers were studied in a fixed-bed reactor containing recipient bacteria grown on glass beads and in which suspended donor cells were added. The behavior of the different populations in the reactor is described in Fig. 1. It shows that 3 days after donor introduction, concentrations

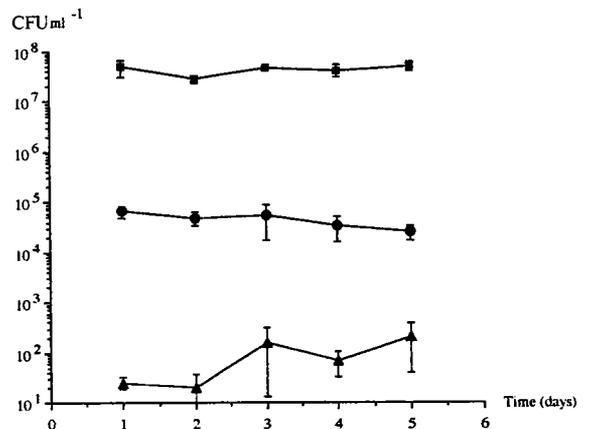


Fig. 1. Kinetics of the different bacterial population cfu (■, recipients; ●, donors; ▲, transconjugants R388) analysed on samples taken in the effluent of fixed-bed reactors after donor introduction. Mean values of 4 different experiments.

of donors, recipients and transconjugants are constant in the fixed-bed reactors. It means that an apparent steady state is reached in the reactor for these populations. Table 2 shows that regardless of the plasmid content of donor cells, the quantitative variation of fixed recipient bacteria was low: 1.4×10^8 to 3.3×10^8 cfu cm^{-2} , 5 days after introduction of donor cells into reactors (apparent steady state of reactors). Fixed donor bacteria, on the contrary, varied significantly: 3.6×10^3 cfu cm^{-2} in the presence of plasmids with *tra* and *oriT* genes to 5.2×10^7 cfu cm^{-2} in the presence of *tra* encoding plasmid. As expected, transfer of the pCE325 plasmid was observed only in the most favorable situation: simultaneous presence of *tra*, *mob* and *oriT* elements with an apparent frequency of 10^{-5} transconjugants per donor (TC/D). When present in the donor bacteria, plasmid pUB2380 was transferred at the mean apparent frequency of 4.5×10^{-6} TC/D, 5 days after donor introduction. Conjugative plasmid R388 was transferred in all the genetic contexts with a mean apparent frequency between 10^{-3} and 10^{-4} TC/D, which varied according to the implantation of donors in the biofilm and thus depended upon the experimental conditions. Fig. 2 shows that there was a positive and significant correlation ($r = 0.61$) between the number of transconjugants of plasmid R388 formed and number of donors colonizing the

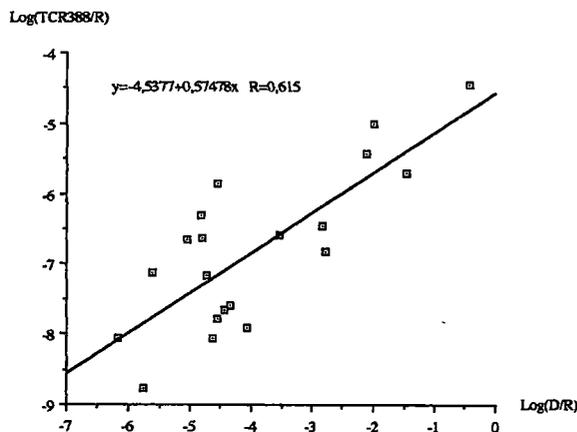


Fig. 2. Relationship between the number of R388 transconjugants and the number of donors during *E. coli* to *E. coli* transfer. TC, transconjugants; R, recipients; D, donors. In order to establish this relationship, results obtained with plasmid R388 in *E. coli* to *E. coli* transfers were pooled.

Table 3

Bacterial populations obtained in biofilm at a five day steady state after donor inoculation into a mixture of recipient strains originated from activated sludge

	Plasmid carried by donor strain <i>E. coli</i> K12 UB1832	
	pCE328	R388
D	$(3.2 \pm 1.0) \times 10^5$	$(1.8 \pm 0.5) \times 10^6$
R	$(3.1 \pm 1.7) \times 10^8$	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^8$
TC	N.D.	17 ± 9

The values are expressed in cfu cm^{-2} ; D, donors; R, recipients; TC, transconjugants; N.D., not detected; detection limit is 1 cfu ml^{-1} or 4.5×10^{-2} cfu cm^{-2} ; data are means of three experiments with corresponding standard variation.

biofilm. This relationship was established with 1:100 error probability.

3.2. *E. coli* to sludge strains transfers

The mobilization of pCE328 from *E. coli* by a mixture of ten sludge strains which seemed to mobilize in filter mating experiments was studied and evaluated in comparison to the transfer of a natural conjugative plasmid R388 used as reference. Two donor strains were used: *E. coli* UB1832 (pCE328) and *E. coli* UB1832 (R388).

The study in the fixed-bed reactor showed that donors established in a biofilm at an apparent steady state (5 days after donor introduction). Nevertheless, establishment of the strain bearing plasmid R388 was ten times greater than that of the strain containing plasmid pCE328. We verified that this result was not related to instability of plasmid pCE328 or to a difference in the growth rate of the host strain of either plasmid. Donors containing R388 or pCE328 were both maintained at between 10^4 and 10^5 cfu ml^{-1} in the biofilm effluent.

The transfer of R388 by conjugation was first detected on the third day after addition of donors in the reactor effluent at a concentration of 14 transconjugants cfu ml^{-1} . The proportion of transconjugants was evaluated in the biofilm after it reached steady state. The results (Table 3) indicate an apparent R388 transfer frequency of 10^{-5} TC/D, 1 to 2 log units lower than that obtained in the same reactor between strains of *E. coli*. Mobilization of plasmid

Table 4

Transfer of plasmids pCE328 and R388 between a donor strain *E. coli* K12 UB1832 and a mixture of strains originated from activated sludge in a sequenced batch reactor

Time	Plasmid carried by donor strain <i>E. coli</i> K12 UB1832					
	pCE328			R388		
	1	10	20	1	10	20
D	$(1.7 \pm 0.4) \times 10^7$	$(4.1 \pm 0.4) \times 10^5$	$(6.6 \pm 6.4) \times 10^4$	$(2.7 \pm 0.4) \times 10^7$	$(3.9 \pm 1.8) \times 10^6$	$(1.1 \pm 0.8) \times 10^6$
R	$(6.8 \pm 0.2) \times 10^8$	$(1.9 \pm 1.1) \times 10^8$	$(1.2 \pm 0.5) \times 10^8$	$(3.6 \pm 0.4) \times 10^8$	$(3.7 \pm 0.3) \times 10^8$	$(2.2 \pm 1.0) \times 10^8$
TC	N.D.	N.D.	N.D.	4000 ± 3000	7 ± 5	N.D.

The values are expressed in cfu ml⁻¹; D, donors; R, recipients; TC, transconjugants; time, time in days after adding donors to the reactor; N.D., not detected; detection limit is 1 cfu ml⁻¹; data are means of three experiments with corresponding standard deviation.

pCE328, on the other hand, could not be demonstrated by measurements performed on the biofilm itself or on the reactor effluent.

The sequenced batch reactors operated with theoretical transit times for the liquid phase and for the biomass of 3 days and 10 days, respectively. The frequency of nutrient supply and biomass recycling were 24 h. The pure cultures of donor strains in this reactor fed with a synthetic effluent stabilized at 10⁷ to 10⁸ cfu ml⁻¹. When the donors were added to reactors at steady state containing recipient strains

originated from activated sludge, competition between donors and recipients resulted in a decrease in the concentration of donor bacteria (pCE328) from 1.7×10^7 to 6.6×10^4 cfu ml⁻¹ in 20 days. The concentration of donor bacteria containing R388, on the other hand, decreased from 2.7×10^7 to 10⁶ in 20 days (Table 4).

The transfer of conjugative plasmid R388 could be detected starting from the first day after donor addition with a transconjugant concentration of 4×10^3 ml⁻¹. The proportion of these transconjugants

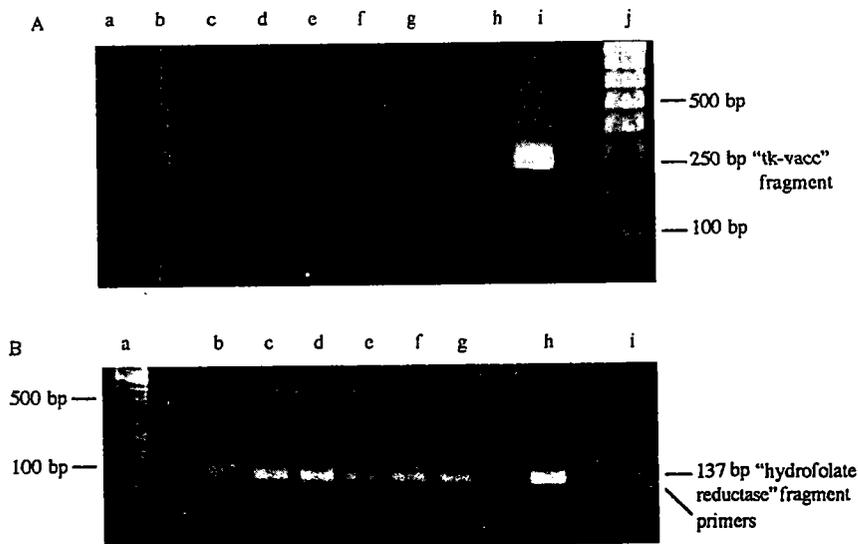


Fig. 3. PCR amplified DNA from clones isolated on pCE328 (A) and R388 (B) transconjugant selective media. Primers specific for both plasmids are described in Section 2, Materials and methods. A, lines a–g, clones presumptively containing pCE328; line h, negative control, *E. coli* K12 UB1832(R388) strain (absence of hybridization signal with pCE328 probe); line i, positive control, *E. coli* K12 UB1832(pCE328) strain; line j, molecular size marker, 100 bp ladder. B, line a, molecular size marker, 100 bp ladder; lines b–g, clones presumptively containing R388; line h, positive control, *E. coli* K12 UB1832(R388) strain; line i, negative control, *E. coli* K12 UB1832(pCE328) strain (absence of hybridization signal with R388 probe).

then decreased until they could no longer be detected after 20 days.

In all experiments, some 96 to 102 R388 transconjugants isolated on selective plates were verified by PCR amplification performed with specific primers (Fig. 3B). Mobilization of plasmid pCE328 was not detected. In fact, colonies were obtained on pCE328 transconjugant selective agar plates but verification of these by PCR amplification with pCE328 specific primers produced negative results (Fig. 3A).

4. Discussion

The mobilization of rDNA plasmids by environmental strains has previously been studied and demonstrated with strains isolated from a river [9], from epilithon [25,26], waste water [27] and soil [28,29]. Nevertheless, the importance of this mode of DNA propagation in the environment remains a point of discussion, since most often experimental data were obtained from transfer experiments done in batch type conditions, whereas microorganisms in natural media are generally subjected to fluxes. In addition, aquatic microcosms used to study the propagation of rDNA are not systematically analyzed at the level of the biofilms present [30].

Our study of the mobilization of rDNA consisted of two experimental set-ups involving the biomass of activated sludge obtained after waste water treatment. The biomass was either attached to a support and continuously grown or in suspension and grown under semi-continuous culture conditions. In both set-ups, the biomass and the aqueous phase reached an apparent steady state with stable donor and recipient populations during 5 days.

Our experiments involved the study of the mobilization of two recombinant DNA plasmids (pCE325 and pCE328) between two strains of *E. coli*, verifying the mobilizing capabilities of elements present in the donor (Table 2) in the fixed-bed reactor. It was found that our experimental conditions led to genetic transfers by conjugation, and mobilization (transfer of plasmid pCE325, in the presence of *mob* and *tra* elements). This mobilization had also been demonstrated in the digestive tract of axenic mice at the frequency of 10^{-4} to 10^{-3} TC/R [31]. The non-detection of plasmid pCE328 transfer by conduction

indicates the absence of specific IS sequences that enable the formation of a cointegrate with the conjugative plasmid R388, or else a low transfer frequency precluding the detection of this event in our conditions.

Furthermore, these experiments showed the importance of plasmid content in donor bacteria for their establishment in biofilms composed of a recipient strain of *E. coli*. Donor colonization of previously grown recipient biofilm varied maximally by a factor of 10^4 depending on the plasmid content of donor cells. This variation could be due to different rates of adhesion and/or growth for the donor strains, depending on their plasmid content. The evaluation of R388 transconjugants obtained at different D/R ratios showed that the log value of transconjugant number per recipient increased linearly as a function of the log value of D/R ratio, confirming previous data [32].

We studied the mobilization of plasmid pCE328 by strains isolated from sludge in biofilms continuously grown on a support and in sequenced-batch reactors, using the conjugative plasmid R388 as a reference. Regardless of the reactor used, we could not demonstrate the mobilization of plasmid pCE328 by strains isolated from sludge. This is in contrast to Roux et al. [9], who isolated strains from river water that could mobilize this plasmid at the apparent frequency of 2×10^{-9} TC/R for a triparental mobilization. The strain was identified as *Klebsiella pneumoniae*, containing a transposon of the Tn3 family that was studied and sequenced [33]. In our study, we chose the co-culture of strains obtained from activated sludge used as a recipient population, since it enables mobilization in a Petri dish test. The fact that we did not observe transfer of pCE328 by mobilization could be related to an insufficient survival time of mobilizing strain(s) of the recipient population in the biofilm. Transfer of plasmid R388 to sludge strains by conjugation was observed in both reactor types. The transfer of this plasmid was detected starting on the first day after the addition of donors to the sequenced-batch reactors, at an apparent frequency equal to that determined at steady state in the fixed-bed reactor between two strains of *E. coli*. One cannot totally exclude the occurrence of transfers in pellets during biomass recycling in sequenced-batch reactors; however, it must have oc-

curred at low rate since time (5 min) and temperature (4°C) are not favorable to conjugation [32]. Moreover shear stress centrifugation may give rise to loss or alterations of R388 pili [34]. After the sequenced-batch reactor reached steady state (20 days after adding donors), the presence of transconjugants was no longer detected.

Donors added to activated sludge were maintained at a constant level in the effluent of the fixed-bed reactor as well as in the biofilm itself, whereas they decreased in the case of R388- and pCE328-bearing donors by a factor of 10 to 100 respectively, in the sequenced-batch reactors.

In conclusion, our study shows that survival of donor bacteria is an event required for the transfer of recombinant DNA plasmids by conjugation. The presence of solid surfaces in the environment that can be used as a support for the attachment of microorganisms is a factor involved in the stabilization of donor bacteria and potential transconjugants formed. Finally, recombinant plasmids lacking *mob* and *tra* genes and a transfer origin have a low probability of dissemination since mobilization of pCE328 was never observed. Nevertheless, these data remain to be confirmed using total biomass of activated sludge as recipient and mobilizing populations.

Acknowledgements

This work was supported by the 'Chimie et Ecologie' research program convention No. 91/1.

References

- [1] Salyers, A.A. and Shoemaker, N.B. (1994) Broad host range gene transfer, plasmids and conjugative transposons. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15, 15–22.
- [2] Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Martin, P. and Courvalin, P. (1987) Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 48, 289–294.
- [3] Smit, E., Venne, D. and van Elsas, J.D. (1993) Mobilization of a recombinant Inc Q plasmid between bacteria on agar and in soil via cotransfer or retrotransfer. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2257–2263.
- [4] Heinemann, J.A. and Ankenbauer, R.G. (1993) Retrotransfer in *Escherichia coli* conjugation: bidirectional exchange or de novo mating? *J. Bacteriol.* 175, 583–588.
- [5] Kleckner, N. (1981) Transposable elements in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 15, 341–404.
- [6] Wilkins, B.M. (1990) Factor influencing the dissemination of DNA by bacterial conjugation. In: *Bacterial Genetics in Natural Environment* (Fry, J.C. and Day, M.J., Eds.), pp. 22–30. Chapman and Hall, London.
- [7] Willets, N. and Skurray, R. (1987) Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* (Neidhardt, F.C., et al., Eds.), pp. 1110–1133. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- [8] Bolivar, F. (1978) Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique *EcoRI* site for selection of *EcoRI* generated recombinant DNA molecules. *Gene* 4, 121–136.
- [9] Roux, B., Lebaron, P., Hubert, J.C. and Lett, M.C. (1993) Occurrence of transposable elements in aquatic bacteria strains: involvement in the mobilization of pBR-type plasmids. *Microb. Releases* 1, 223–228.
- [10] Soberon, X., Covarubias, L. and Bolivar, F. (1980) Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene* 9, 287–305.
- [11] Covarubias, L., Cervantes, L., Covarubias, A., Soberon, X., Vichido, I., Blanco, A., Kupersztoch-Portnoy, Y.M. and Bolivar, F. (1981) Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. *Gene* 13, 25–35.
- [12] Bennett, P.M., Grinstead, J., Choi, C.L. and Richmond, M.H. (1978) Characterization of *Tn501* a transposon determining resistance to mercuric ions. *Mol. G. Genet.* 159, 101–106.
- [13] Bennett, P.M. and Richmond, M.H. (1976) Translocation of a discrete piece of deoxyribonucleic acid and *amp* gene between replicons in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 126, 1–6.
- [14] Datta, N. and Hedges, R.W. (1972) Trimethoprim resistance conferred by W plasmids in *Enterobacteriaceae*. *J. Gen. Microbiol.* 72, 349–355.
- [15] Bennett, P.M., Heritage, J., Comanducci, A. and Dodd, H.M. (1986) Evolution of R plasmids by replicon fusion. *J. Antimicrob. Chemother.* 18, 103–111.
- [16] Weir, J.P. and Moss, B. (1983) Nucleotide sequence of the Vaccinia virus thymidine kinase gene and the nature of spontaneous frameshift mutation. *J. Virol.* 46, 530–537.
- [17] Zurita, M., Bolivar, F. and Soberon, X. (1984) Construction and characterization of new cloning vehicles. VII. Construction of plasmid pBR327 *par*, a completely sequenced, stable derivatives of pBR327 containing the *par* locus of pSC101. *Gene* 28, 119–122.
- [18] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Vol. 3, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [19] King, L.K. and Parker, B.C. (1988) A simple, rapid method for enumerating total viable and metabolically active bacteria in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1630–1631.
- [20] Porter, K.G. and Feig, Y.S. (1980) The use of DAPI for

- identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943–947.
- [21] Bauda, P., Dollard, M.A. and Block, J.C. (1993) Analysis of biofilm growth rate in a packed bed bioreactor. *Biofouling* 6, 305–316.
- [22] Bouillot, P., Canaacs, A., Pareilleux, A., Huyart, A. and Goma, G. (1990) Membrane bioreactor for the evaluation of maintenance phenomena in wastewater treatment. *J. Ferment. Bioeng.* 69, 178–183.
- [23] Zolg, J.W. and Hangi, U.J. (1981) Characterization of R-plasmid-associated trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase and determination of the nucleotide sequence of the reductase gene. *Nucleic Acids Res.* 9, 697–710.
- [24] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Vol. 1, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [25] Hill, K.E., Weightman, A.J. and Fry, J.C. (1992) Isolation and screening of plasmids from the epilithon which mobilize recombinant plasmid pD10. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1292–1300.
- [26] Hill, K.E., Fry, J.C. and Weightman, A.J. (1994) Gene transfer in the aquatic environment: persistence and mobilization of the catabolic recombinant plasmid pD10 in the epilithon. *Microbiology* 140, 1555–1563.
- [27] MacPherson, P. and Gealt, M.A. (1986) Isolation of indigenous wastewater bacterial strains capable of mobilizing plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 904–909.
- [28] Glew, J.G., Angle, J.S. and Sadowsky, M.J. (1993) In vivo transfer of pR68.45 from *Pseudomonas aeruginosa* into indigenous soil bacteria. *Microb. Releases* 1, 237–241.
- [29] Henschke, R.B. and Schmidt, F.R.J. (1990) Plasmid mobilization from genetically engineered bacteria to members of the indigenous soil microflora in situ. *Curr. Microbiol.* 20, 105–110.
- [30] Leser, T.D. (1995) Validation of microbial community structure and ecological functional parameters in an aquatic microcosm designed for testing genetically engineered microorganisms. *Microb. Ecol.* 29, 183–201.
- [31] Duval-Iflah, Y., Gainch, I., Ouriet, M.F., Lett, M.C. and Hubert, J.C. (1994) Recombinant DNA transfer to *Escherichia coli* from human faecal origin in vitro and in digestive tract of gnotobiotic mice. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15, 79–88.
- [32] Fry, J.C. and Day, M.J. (1990) Plasmid transfer in the epilithon. In: *Bacterial Genetics in Natural Environment* (Fry, J.C. and Day, M.J., Eds.), pp. 55–80, Chapman and Hall, London.
- [33] Rinkel, M., Hubert, J.C., Roux, B. and Lett, M.C. (1994) Transposon Tn 5403, a mobilization helper element: complete nucleotide sequence and distribution in aquatic strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15, 89–96.
- [34] Lebaron, P., Roux, V., Lett, M.C. and Baleux, B. (1993) Effects of pili rigidity and energy availability on conjugative plasmid transfer in aquatic environments. *Microb. Releases* 2, 127–133.

SOMMAIRE

1-INTRODUCTION.....	2
2-ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
2.1-Les différents modes de transferts horizontaux de l'ADN bactérien dans l'environnement.....	7
2.1.1-Introduction.....	7
2.1.1.a-La mobilisation.....	12
1) La donation.....	12
2) La conduction.....	13
3) La rétromobilisation.....	13
2.1.2-Importance de la conjugaison bactérienne dans l'environnement.....	13
a- Transfert génétique par conjugaison dans le sol.....	16
b- Transfert génétique par conjugaison en milieu aquatique.....	21
2.2-Transfert au sein de biofilms bactériens.....	24
2.2.1-Croissance et évolution des biofilms.....	25
2.2.2-Interactions entre les populations bactériennes au sein de biofilms.....	27
2.2.3-Stabilités des plasmides au sein des biofilms.....	28
2.2.4-Transfert de plasmides au sein de biofilms bactériens.....	30
2.3-La biomasse des boues activées.....	33
2.3.1-Transfert de plasmides au sein de boues activées.....	35
3-MATERIEL ET METHODES.....	39
3.1-Souches bactériennes, boues activées et plasmides.....	40
3.1.1-Souches bactériennes.....	40
3.1.2-Boues activées.....	41
3.1.3-Plasmides.....	42
3.2-Milieus de culture.....	46

3.3-Vérification des souches par antibiogrammes.....	49
3.4-Numérations bactériennes.....	49
3.4.1-Numération des bactéries totales par épifluorescence.....	50
3.4.2-Numération des Unités Formant Colonie.....	51
3.4.3-Mesure de l'absorbance.....	51
3.5-Transferts génétiques au sein de biofilms bactériens.....	52
3.5.1-Le réacteur à lit fixe.....	52
3.5.2-Décrochage des bactéries fixées.....	54
3.5.3-Etude des transferts génétiques au sein de biofilms.....	55
3.6-Transferts génétiques au sein de réacteurs batch-séquencés.....	56
3.6.1-Le réacteur batch-séquencé avec recyclage de biomasse.....	56
3.6.2-Transferts génétiques dans le réacteur batch-séquencé.....	58
3.7-Transferts génétiques sur boîtes de Pétri.....	59
3.8-Extraction d'ADN plasmidique et dosage.....	61
3.9-Electrophorèse de l'ADN.....	61
3.10-Marquage de la sonde "tk-vacc".....	62
3.11-Hybridation.....	62
3.12-Amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction).....	64
3.13-Vérification des transconjugants et de la stabilité des donatrices.....	66
3.14-Mesure du taux de croissance maximum.....	67
3.15-Le test de 'Bacterial Adherence To Hydrocarbons' : BATH.....	67
3.16-Amplification d'ADN plasmidique.....	68
3.17-Inhibition métabolique.....	69
3.18-Transformation des souches	69
3.19-Curage des souches.....	70

3.20-Adhésion bactérienne sur pastilles de silicone.....	71
3.20.1-Le réacteur.....	71
3.20.2-Préparation des pastilles (de silicone) et des réacteurs.....	73
3.20.3-Le test d'adhésion.....	73
4-RESULTATS.....	75
4.1-Transfert de plasmides recombinants entre souches d' <i>Escherichia coli</i> K12 au sein de réacteurs à lit fixe.....	76
4.1.1-Caractéristiques des biofilms <i>monospecies</i> à l'équilibre.....	76
4.1.1.1-Cinétique de mise à l'équilibre.....	78
4.1.1.2-Caractéristiques des biofilms de souche pure à l'équilibre.....	80
4.1.1.3-Survie des bactéries donatrices au sein de biofilms mixtes donatrices - réceptrices.....	82
4.1.2-Détection des transconjugants.....	88
4.1.3-Différences d'implantation des souches donatrices porteuses de différents plasmides en biofilm mixte : recherche d'une explication.....	92
4.1.3.1-Influence des plasmides sur le taux de croissance maximum des souches donatrices en suspension.....	92
4.1.3.2-Détermination de l'hydrophobicité des souches donatrices.....	97
4.1.3.3-Adhésion de différentes souches donatrices.....	99
a- Cinétiques d'adhésion de différentes souches donatrices.....	99
c- Influence du DCCD sur l'adhésion.....	110
4.1.4-Analyse des transconjugants formés et de la stabilité des plasmides au sein des bactéries donatrices cultivées en biofilms mixtes à l'équilibre.....	112
4.1.4.1-Analyse des transconjugants formés au sein de biofilms mixtes à l'équilibre.....	112
4.1.4.2-Stabilité des plasmides au sein des bactéries donatrices cultivées en biofilms mixtes.....	114
4.2-Transfert du plasmide recombinant pCE328 entre <i>Escherichia coli</i> K12 et des souches isolées de boues activées au sein de réacteurs à lit fixe et en réacteurs batch-séquencés.....	117
4.2.1-Choix des souches issues des boues activées.....	118

4.2.2-Survie des bactéries donatrices au sein de l'effluent d'un réacteur à biofilms : <i>Escherichia coli</i> et souches des boues.....	118
4.2.3-Les différentes populations bactériennes fixées au sein des biofilms mixtes <i>Escherichia coli</i> - réceptrices des boues : analyse des transconjugants à l'équilibre.....	120
4.2.4-Transfert du plasmide recombinant pCE328 en réacteurs batch-séquencés avec recyclage de biomasse.....	123
4.3-Mobilisation de plasmides recombinants par la biomasse de boues activées sur boîtes de Pétri.....	127
4.3.1-Construction de la souche réceptrice : <i>Escherichia coli</i> K12 UB1832 :: <i>lux</i> AB.....	129
4.3.2-Transfert des plasmides recombinants dans les différents contextes étudiés.....	129
5-DISCUSSION.....	136
5.1-Le transfert de plasmides à ADN _r entre deux souches <i>Escherichia coli</i> au sein de réacteurs à lit fixe alimentés en continu.....	137
5.2-Transfert de plasmides à ADN _r entre <i>Escherichia coli</i> et 10 souches isolées de boues activées au sein de deux microcosmes : le réacteurs à lit fixe alimenté en continu et le réacteur batch séquencé.....	141
5.3-Mobilisation de plasmides à ADN _r dans différents contextes génétiques sur boîtes de Pétri.....	143
CONCLUSIONS.....	145
6-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	148
7-ANNEXES.....	158
8-RESUME.....	179
9-TRAVAUX PUBLIES.....	184

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Résultats bruts du suivi des souches réceptrice et donatrices pures au sein de l'effluent de réacteurs à biofilms déterminées par épifluorescence au DAPI et exprimées en bactéries cm^{-3} . (Les valeurs pour trois réacteurs différents par souche, les moyennes et les écarts types sur ces valeurs ont été reportés).

Annexe 2 : Résultats bruts des caractéristiques des biofilms de réceptrice ou de donatrices pures à l'équilibre. (X_{sus} correspond aux bactéries dans l'effluent du réacteur ; X_{fix} correspond aux bactéries fixées au sein du biofilm et μ correspond au taux de croissance du biofilm à l'équilibre. Les valeurs pour trois expérimentations par souche, les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Annexe 3 : Résultats bruts de la survie des donatrices en UFC cm^{-3} au sein de l'effluent des réacteurs à biofilms mixtes de réceptrices et de donatrices. (UFC = unités formant colonie. Les donatrices sont introduites dans les réacteurs à biofilms contenant des réceptrices à l'équilibre. Les valeurs pour trois expérimentations au moins par souche, les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Annexe 4 : Résultats bruts de la survie des réceptrices en UFC cm^{-3} au sein de l'effluent des réacteurs à biofilms mixtes de réceptrices et de donatrices, suivant le contexte génétique étudié. (UFC = unités formant colonie. Les valeurs pour trois expérimentations au moins par souche, les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Annexe 5 : Résultats bruts du dénombrement des bactéries par épifluorescence au DAPI (bactéries cm^{-3}) et par comptage des unités formant colonies (UFC cm^{-3}) sur un même échantillon.

Annexe 6 : Résultats bruts des caractéristiques des biofilms mixtes à l'équilibre suivant les contextes étudiés. (UFC = unités formant colonie, X_{sus} correspond aux UFC dans l'effluent du réacteur, X_{fix} correspond aux UFC fixées au sein du biofilm. Les valeurs pour au moins trois réacteurs différents par contexte, les moyennes et les écarts types sur ces valeurs ont été reportés).

Annexe 7 : Résultats bruts des transconjugants exprimées en UFC cm^{-2} obtenus après transfert au sein de biofilms mixtes à l'équilibre *Escherichia coli* K12 : réceptrices + donatrices dans différents contextes génétiques et après déduction des faux transconjugants qui peuvent se former sur les milieux sélectifs. (UFC = unités formant colonie, TC = transconjugants, N. D. = non détectées avec une limite de détection de 4.5×10^{-2} UFC cm^{-2} . Les valeurs pour trois expérimentations au moins par contexte, les moyennes et les écarts types sur ces valeurs ont été reportés).

Annexe 8: Absorbances à 620 nm en fonction du temps et à différents temps permettant de déterminer le taux de croissance maximum de trois souches bactériennes 1) *Escherichia coli* K12 - 2) *Escherichia coli* K12 (pCE325) - 3) *Escherichia coli* K12 (pCE328). (Les valeurs en triplicat ainsi que les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Annexe 9: Absorbances des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 - *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) - *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) et du témoin positif d'hydrophobicité: *Enterobacter hirae*. (Les valeurs de l'absorbance à 400 nm pour trois expérimentations par souche et par quantité d'hexadécane ajouté, ainsi que les moyennes et les écarts types correspondants ont été reportés).

Annexe 10: Résultats bruts du suivi de l'adhésion sur pastilles de silicone de différentes souches bactériennes *Escherichia coli* K12 UB1832 contenant au moins le plasmide R388 exprimée en bactéries cm^{-2} au cours du temps. (Les valeurs de trois expérimentations différentes, ainsi que les moyennes et les écarts types correspondants ont été reportés).

Annexe 11: Résultats bruts du suivi de l'adhésion sur pastilles de silicone des souches bactériennes *Escherichia coli* K12 UB1832, *Escherichia coli* K12 UB1832 traitée au DCCD, *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325), *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328 amplifié) exprimée en bactéries cm^{-2} au cours du temps. (Les valeurs de trois expérimentations différentes, les moyennes et les écarts types correspondants ont été reportés, DCCD = NN' dicyclohexylcarbodiimide).

Annexe 12: Adhésion après 240 minutes (bactéries cm^{-2}) de différentes souches en fonction de l'ADN plasmidique contenu dans les différentes souches étudiées. (Les valeurs de trois expérimentations différentes, ainsi que les moyennes et les écarts types correspondants ont été reportés).

Annexe 13: Résultats bruts de la stabilité des plasmides des bactéries donatrices fixées au sein de biofilms mixtes à l'équilibre. (Rif = rifampicine: résistance chromosomique de la souche donatrice, Cm = chloramphénicol: résistance des plasmides pCE325 et pCE328, Km = kanamycine: résistance du plasmide pUB2380, Tp = triméthoprime: résistance du plasmide R388, Nal = acide nalidixique: résistance chromosomique de la souche réceptrice, TC = transconjugants. Les valeurs pour au moins trois expériences par contexte génétique, ainsi qu'entre parenthèses: les moyennes et les écarts types des rapports donatrices qui croissent sur antibiotique isolé par transconjugants vérifiés ont été reportés).

Annexe 14: Résultats bruts de la stabilité des plasmides des bactéries donatrices fixées au sein de biofilms mixtes à l'équilibre. (Rif = rifampicine: résistance chromosomique de la souche donatrice, Cm = chloramphénicol: résistance des plasmides pCE325 et pCE328, Km = kanamycine: résistance du plasmide pUB2380, Tp = triméthoprime: résistance du plasmide R388, Nal = acide nalidixique: résistance

chromosomique de la souche réceptrice, TC = transconjugants. Les valeurs pour au moins trois expériences par contexte génétique, ainsi qu'entre parenthèses : les moyennes et les écarts types des rapports donatrices qui croissent sur antibiotique isolé par transconjugants vérifiés ont été reportés).

Annexe 15 : Résultats bruts de la survie des donatrices en UFC cm⁻³ au sein de l'effluent des réacteurs à lit fixe contenant la souche donatrice et le mélange de 10 souches réceptrices isolées de boues activées. (Les donatrices sont introduites dans les réacteurs contenant le mélange de réceptrices à l'équilibre. Les valeurs pour trois expérimentations par souche, les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Annexe 16 : Résultats bruts des différentes populations exprimées en UFC cm⁻² au sein de biofilms mixtes à l'équilibre : donatrice et mélange des 10 souches réceptrices isolées des boues activées, suivant le plasmide contenu dans la souche donatrice. (UFC = unités formant colonie, N. D. = non détectées avec une limite de détection de 4.5×10^{-2} UFC cm⁻². Les transconjugants sont estimés après déduction des faux transconjugants qui peuvent se former sur les milieux sélectifs. Les valeurs pour trois expérimentations différentes, ainsi que les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Annexe 17 : Résultats bruts des caractéristiques des biofilms de réceptrices isolées des boues ou de donatrices pures à l'équilibre. (X_{sus} correspond aux bactéries dans l'effluent du réacteur ; X_{fix} correspond aux bactéries fixées au sein du biofilm et μ correspond au taux de croissance du biofilm à l'équilibre. Les valeurs pour trois expérimentations par souche, les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Annexe 18 : Résultats bruts du suivi du mélange des 10 souches réceptrices isolées de boues activées avant introduction des donatrices au sein de réacteurs batch-séquencés par mesure de l'épifluorescence au DAPI et exprimées en bactéries cm⁻³. (Les valeurs pour deux réacteurs différents par expérience, les moyennes et les écarts types sur ces valeurs ont été reportés).

Annexe 19 : Résultats bruts du suivi en UFC cm⁻³ des différentes populations bactériennes en réacteurs batch-séquencés : le mélange de 10 souches réceptrices isolées de boues activées, la donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) et les transconjugants R388, ainsi que les valeurs théoriques dues au taux de dilution de la biomasse des donatrices et des transconjugants : chaque jour 1/10 de la biomasse bactérienne est éliminée. (UFC = unités formant colonie. Les transconjugants sont estimés après déduction des faux transconjugants qui peuvent se former sur les milieux sélectifs. Les valeurs pour deux expériences, ainsi que les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Annexe 20 : Résultats bruts du suivi en UFC cm⁻³ des différentes populations bactériennes en réacteurs batch-séquencés : le mélange de 10 souches réceptrices isolées de boues activées, la donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) et les transconjugants pCE328, ainsi que les valeurs théoriques dues au taux de dilution de

la biomasse des donatrices : chaque jour 1/10 de la biomasse bactérienne est éliminée. (UFC = unités formant colonie. Les transconjugants sont estimés après déduction des faux transconjugants qui peuvent se former sur les milieux sélectifs. Les valeurs pour deux expériences, ainsi que les moyennes et les écarts types ont été reportés).

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique des mécanismes de transfert horizontaux d'ADN chez les bactéries.

(1 = transfert d'un plasmide conjugatif $tra^+ mob^+ oriT^+$

2 = mobilisation par donation d'un plasmide $tra^- mob^+ oriT^+$ par le plasmide conjugatif

3 = mobilisation par conduction d'un plasmide $tra^- mob^- oriT^-$ par formation d'un cointégrat avec le plasmide conjugatif

4 = rétromobilisation d'un plasmide mobilisable par un plasmide conjugatif avec passage en sens inverse des deux plasmides

5 = la transposition conjugative par l'intermédiaire d'un transposon conjugatif (tn c) qui est autotransférable $tra^+ mob^+ oriT^+$ et peut mobiliser les plasmides non conjugatifs).

Figure 2: Micrographie électronique d'une cellule réceptrice et d'une cellule donatrice reliées par des pili F. (La donatrice (en bas) a trois pili F, lesquels sont entourés par le phage MS2 qui s'adsorbe à la surface. On peut voir de nombreux fimbriae communs s'étendre à partir de la réceptrice (en haut) (MILLER, 1992)).

Figure 3: Schéma du processus contribuant à la formation de biofilms bactériens (BRYERS, 1994).

Figure 4: Cartes de restriction des plasmides à ADN recombinants pCE325 et pCE328 (Rapport Chimie et Ecologie, 1993).

Figure 5: Cartes de restriction des plasmides mobilisateurs R388 (VALENTINE & KADO, 1989) et pUB2380 (BENNETT *et al.*, 1986). (Les sites des enzymes de restriction sont pour R388 : B = *Bam* HI, Bg = *Bst* II, S = *Sst* I, Ps = *Pst* I, H = *Hind* III, E = *Eco* RI, Pv = *Pvu* II, BI = *Bal* I, Ss = *Sst* II, SI = *Sal* I et pour pUB2380 : B = *Bam* HI, Bg = *Bgl* I, Bs = *Bst* I, HII = *Hind* II, HIII = *Hind* III, Pv = *Pvu* II).

Figure 6: Schéma du réacteur à lit fixe.

Figure 7: Schéma du réacteur batch-séquentiel.

Figure 8: Schéma du réacteur utilisé pour les tests d'adhésion.

Figure 9: Suivi des bactéries déterminées par épifluorescence au DAPI dans l'effluent de réacteurs à lit fixe pour les différentes souches d'*Escherichia coli* utilisées comme donatrices et réceptrice. (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour trois expériences par souche).

Figure 10: Bactéries fixées par cm^2 (X_{fix}) sur les billes de verre et les bactéries en suspension par cm^{-3} (X_{sus}) dans l'effluent de réacteurs à lit fixe à l'équilibre pour les différentes souches d'*Escherichia coli* K12 étudiées. (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour trois expériences par souche).

Figure 11: Survie des bactéries donatrices et réceptrices au sein de biofilms bactériens mixtes : réceptrices + donatrices. (UFC = unités formant colonie. Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour trois expériences au moins par souche pour les donatrices et pour toutes les expériences pour les réceptrices).

Figure 12 : UFC de donatrices et de réceptrices fixées par cm^2 (X_{fix}) sur les billes de verre et en suspension (X_{sus}) dans l'effluent de réacteurs à lit à l'équilibre suivant les contextes génétiques étudiés. (UFC = unités formant colonie. Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour trois expériences au moins par contexte).

Figure 13: Fréquences de transfert exprimées en $\log(\text{transconjugants}/\text{donatrice})$ suivant les contextes génétiques étudiés. (D = donatrices, TC = transconjugants. Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour trois expériences au moins par contexte).

Figure 14: Transconjugants (R388) par réceptrice en fonction du rapport donatrices par réceptrice. (Chacun des points correspondant à une expérimentation différente, TC = transconjugants, R = réceptrices, D = donatrices).

Figure 15-a : Représentation graphique en double inverse du taux de croissance μ en fonction de la concentration en L. B. pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832. (Les équations de droite et les coefficients de corrélation obtenus sont les suivants : Essai 1 : $y=0.0746x+1.4192$ $R=0.84$; Essai 2 : $y=0.0605x+1.4454$ $R=0.68$; Essai 3 : $y=0.0631x+1.4420$ $R=0.69$).

Figure 15-b : Représentation graphique en double inverse du taux de croissance μ en fonction de la concentration en L. B. pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325). (Les équations de droite et les coefficients de corrélation obtenus sont les suivants : Essai 1 : $y=0.0805x+1.527$ $R=0.91$; Essai 2 : $y=0.0720x+1.5176$ $R=0.87$; Essai 3 : $y=0.0894x+1.4799$ $R=0.86$).

Figure 15-c : Représentation graphique en double inverse du taux de croissance μ en fonction de la concentration en L. B. pour la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328). (Les équations de droite et les coefficients de corrélation obtenus sont les suivants : Essai 1 : $y=0.0798x+1.4949$ $R=0.95$; Essai 2 : $y=0.0769x+1.5147$ $R=0.92$; Essai 3 : $y=0.0837x+1.4988$ $R=0.84$).

Figure 16: Cinétiques d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388), *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388,

pCE328). (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur trois expériences différentes par souche).

Figure 17 : Photographies de la cinétique d'adhésion de la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) aux différents temps de prélèvement des pastilles de silicone.

Figure 18-a : Cinétiques d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325), *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328), *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) transformée en *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) transformée en *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328). (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur trois expériences différentes par souche).

Figure 18-b : Cinétique d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388), *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE325) curée *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388, pCE328) curée en *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388). (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur trois expériences différentes par souche).

Figure 19 : Cinétique d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832, *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325), *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328) et *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328 amplifié). (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur trois expériences différentes par souche).

Figure 20 : Cinétique d'adhésion des souches *Escherichia coli* K12 UB1832 traitée et non traitée au DCCD. (DCCD = NN' dicyclohexylcarbodiimide). (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types obtenues pour trois expériences différentes par souche).

Figure 21-a : Plasmides cotransférés dans une même réceptrice dans le contexte *tra⁺ mob⁺ oriT⁺*. (TC = transconjugants. Les pourcentages reportés correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur au moins trois expériences différentes).

Figure 21-b : Plasmides cotransférés dans une même réceptrice dans le contexte *tra⁺ mob⁺ oriT⁻*. (TC = transconjugants. Les pourcentages reportés correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur au moins trois expériences différentes).

Figure 22 : Stabilité des plasmides contenus dans les donatrices au sein de biofilms mixtes à l'équilibre. (Les pourcentages reportés correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur au moins trois expériences différentes).

Figure 23 : Bactéries donatrices et réceptrices dénombrées au sein de l'effluent des réacteurs à lit fixe contenant le mélange de 10 souches réceptrices isolées de boues activées et la souche donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) ou (pCE328). (UFC = unités formant colonie. Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour trois expériences par souche pour les donatrices et pour toutes les expériences pour les réceptrices).

Figure 24 : Suivi du mélange des dix souches réceptrices isolées des boues activées dénombrées par épifluorescence au DAPI dans le réacteur batch-séquenté avant introduction des souches donatrices *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388) et (pCE328). (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour deux expériences).

Figure 25-a : Suivi des différentes populations bactériennes en réacteurs batch-séquentés : le mélange de 10 souches réceptrices isolées de boues activées et la donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388), ainsi que les transconjugants qui s'y forment. (UFC = unités formant colonie. Les courbes en pointillées correspondent aux courbes théoriques du taux de dilution de la biomasse bactérienne. Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour deux expériences).

Figure 25-b : Suivi des différentes populations bactériennes en réacteurs batch-séquentés : le mélange de 10 souches réceptrices isolées de boues activées et la donatrice *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328), ainsi que les transconjugants qui s'y forment. (UFC = unités formant colonie. Les courbes en pointillées correspondent aux courbes théoriques du taux de dilution de la biomasse bactérienne. Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types calculés pour deux expériences).

Figure 26-a : Amplification d'ADN par PCR des clones isolés sur les milieux sélectifs des transconjugants R388 (a). (PCR = "polymerase chain reaction. Les amorces spécifiques du plasmide R388 sont présentées dans Matériel et Méthodes (3.13). Ligne a : marqueur de poids moléculaire, échelle de 100 paires de bases, lignes b à g : clones supposés contenir le plasmide R388, ligne h : témoin positif = souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388), ligne i : témoin négatif = souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328)).

Figure 26-b : Amplification d'ADN par PCR des clones isolés sur les milieux sélectifs des transconjugants pCE328 (a). (PCR = "polymerase chain reaction". Les amorces spécifiques du plasmide pCE328 sont présentées dans Matériel et Méthodes (3.13). Lignes a à g : clones supposés contenir le plasmide pCE328, ligne h : témoin négatif = souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (R388), ligne i : témoin positif = souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE328), ligne j : marqueur de poids moléculaire = échelle de 100 paires de bases).

Figure 27-a : Vérification de l'expression des gènes *luxAB* pour les clones supposés transconjugants pCE325 des contextes de transfert 1 et 3. (contrôle positif = souche *Escherichia coli* K12 UB281 ::*lux AB*, contrôle négatif = souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325)).

Figure 27-b : Hybridation sur colonies avec la sonde "tk-vacc" des clones supposés transconjugants pCE325. (Le quart supérieur gauche correspond aux contrôles positifs = *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325), le quart supérieur droit correspond aux contrôles négatif = *Escherichia coli* K12 UB281 et la moitié inférieure correspond

aux clones supposés transconjugants pCE325 : les 35 premiers clones répondant positivement correspondent aux contextes de transfert 1 et 3, les 17 clones suivants répondant négativement correspondent au contexte de transfert 2).

Figure 28-a : Electrophorèse des extraits plasmidiques réalisés à partir des clones supposés transconjugants pCE325 dans les contextes de transfert 1 et 3. (lignes a à k : clones supposés transconjugants pCE325, ligne l : contrôle positif = *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325), ligne m : contrôle négatif = *Escherichia coli* K12 UB281 :: *lux* AB (R388, pUB2380), ligne n : marqueur de poids moléculaire = λ digéré par *Hind* III et *Eco* RI).

Figure 28-b : "Southern-blot" sur l'extraction plasmidique des clones supposés transconjugants pCE325 des contextes de transfert 1 et 3, hybridation avec la sonde "tk-vacc". (lignes a à k : clones supposés transconjugants pCE325, ligne l : contrôle positif = *Escherichia coli* K12 UB1832 (pCE325), ligne m : contrôle négatif = *Escherichia coli* K12 UB281 :: *lux* AB (R388, pUB2380)).

Figure 29 : Les multirésistances des clones supposés transconjugants pCE328 obtenus dans les contextes de transfert 2 et 3. (Amp = ampicilline, Cm = chloramphénicol, Km = kanamycine, Nal = acide nalidixique, Sm = streptomycine, tet = tetracycline, Tp = triméthoprime. 135 clones supposés transconjugants ont été testés).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de transfert par conjugaison dans l'environnement.

Tableau 2 : Caractéristiques des trois contextes de transfert de plasmides recombinants étudiés sur boîtes de Pétri.

Tableau 3 : Souches donatrices et réceptrice utilisées pour évaluer les transferts entre souches de *Escherichia coli* en réacteur à lit fixe. Les différents contextes génétiques imposés par le contenu plasmidique de la souche donatrice.

Tableau 4 : Taux de croissance μ (h^{-1}) des biofilms de réceptrice et de donatrices à l'équilibre (La première colonne de résultats du taux de croissance correspond aux moyennes et aux écarts types de trois expérimentations réalisées par souche, la deuxième colonne correspond aux moyennes et aux écarts types des trois expérimentations réalisées pour *E. coli* K12 UB281 et des douze expérimentations réalisées pour *E. coli* K12 UB1832 quel que soit le contenu plasmidique).

Tableau 5 : Taux de croissance μ (h^{-1}) déterminé pendant la phase exponentielle de croissance des souches étudiées en utilisant différentes concentrations de milieu nutritif L. B. (Les valeurs des taux de croissance déterminés en triplicat, ainsi que les moyennes et les écarts types ont été reportés).

Tableau 6 : Hydrophobicité de trois souches bactériennes exprimée par la différence d'absorbance à 400 nm entre une suspension bactérienne contenant de l'hexadécane en différente quantité et une suspension bactérienne sans hexadécane. (Les moyennes et les écarts types portant sur trois expériences par souche et par quantité d'hexadécane ajoutée ont été reportés).

Tableau 7 : Vitesse d'adhésion (bactéries $\text{cm}^{-2} \text{min}^{-1}$) en fonction du contenu plasmidique de la souche *Escherichia coli* K12 UB1832 (Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types réalisés sur trois expériences différentes par souche).

Tableau 8 : Les différentes populations bactériennes exprimées en UFC cm^{-2} au sein de biofilms mixtes *Escherichia coli* - souches des boues à l'équilibre. (UFC = unités formant colonie, N. D. = non détectées avec une limite de détection de 4.5×10^{-2} UFC cm^{-2} . Les valeurs reportées correspondent aux moyennes et aux écarts types effectués sur trois expériences).

Tableau 9-a : Les différentes populations bactériennes en UFC cm^{-3} présentes sur boîtes de Pétri après transfert du plasmide pCE325 dans les 3 contextes étudiés. (R = réceptrices, D = donatrices, B= boues activées, TC = transconjugants, N. D. = non

détectés avec une limite de détection = L. D. exprimée en transconjugants détectables par donatrice).

Tableau 9-b: Les différentes populations bactériennes en UFC cm⁻³ présentes sur boîtes de Pétri après transfert du plasmide pCE328 dans les 3 contextes étudiés. (R = réceptrices, D = donatrices, B= boues activées, TC = transconjugants, N. D. = non détectés avec une limite de détection = L. D. exprimée en transconjugants détectables par donatrice).