

II. TECHNIQUES D'ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ BACTÉRIENNE

Il est rare qu'un environnement naturel contienne un seul type de micro-organismes. En effet, les micro-organismes forment des communautés microbiennes (Madigan et Martinko, 2007). L'un des plus grands enjeux en écologie microbienne est de déterminer la diversité des populations bactériennes d'un habitat donné. Le concept de diversité bactérienne comporte deux notions, la richesse spécifique d'un écosystème donné et la structure des espèces de cet écosystème. Pouvoir estimer la diversité des communautés microbiennes (en termes de richesse et de structure) est un moyen pour suivre leur évolution dans leur environnement. De manière beaucoup plus générale, cela permet de répondre à la question de la modulation des communautés microbiennes par les facteurs environnementaux (Azandegbe, 2010).

II.1. Détermination de la biodiversité bactérienne par les méthodes culturales

Une des approches permettant d'étudier un écosystème microbien consiste à en isoler les micro-organismes, et à étudier leurs propriétés par des cultures au laboratoire. Cette approche nécessite d'« extraire » l'organisme intéressant de sa communauté, par une méthode dite d'enrichissement, puis à l'isoler en culture pure. L'isolement permet ensuite des études détaillées en laboratoire ainsi que des applications en biotechnologie, ou en microbiologie industrielle et environnementale (Madigan et Martinko, 2007).

La diversité bactérienne de l'environnement a été appréciée par ces mêmes méthodes phénotypiques jusque dans les années 1980. Cependant, appliquées à des habitats naturels complexes tels que le sol, les sédiments, l'eau douce et l'eau de mer, ces méthodes ont montré leurs limites. Dans leur habitat naturel, la plupart des micro-organismes existent sous forme non cultivable. Il s'agit soit de micro-organismes méconnus qui ne peuvent croître sur les milieux de culture disponibles dans les laboratoires, soit de micro-organismes connus (habituellement cultivables) dans un état de dormance difficilement réversible (Dauga et *al.*, 2005).

II.2. Détermination de la biodiversité bactérienne par les méthodes moléculaires (approche méta- génomique)

Dans les années 1980, on estimait en gros avoir fait le tour de la question de la diversité microbienne. En effet, les méthodes alors disponibles, basées sur la culture et l'isolement des microorganismes, semblaient avoir permis d'identifier toutes les espèces

existantes. Mais l'arrivée des méthodes de biologie moléculaire (Figure 7) révéla bientôt que l'on avait largement sous-estimé la diversité microbienne. On découvrit alors de nombreuses nouvelles espèces et même des dizaines de groupes de procaryotes qui n'avaient jamais pu être cultivés jusque-là (Logue et *al.*, 2008).

Depuis le début des années 90, la microbiologie environnementale s'est dotée d'un nouveau concept en restreignant l'étude des bactéries à leur ADN directement extrait de l'environnement (McHardy et Rigoutsos, 2007).

Le métagénome est défini comme étant l'ensemble des génomes des microorganismes présents dans une communauté microbienne donnée. L'exploration du métagénome représente une nouvelle stratégie conduisant à faire l'inventaire complet des gènes présents dans un environnement naturel. La métagénomique décrit l'analyse fonctionnelle et les séquences de bases des génomes microbiens collectives contenus dans un échantillon environnemental (Riesenfeld et *al.*, 2004). Par définition la métagénomique exclut les études qui utilisent la PCR (avec des amorces spécifiques, dégénérées ou aléatoires) pour amplifier des gènes ou des cassettes de gènes, car ces méthodes ne fournissent pas l'information génomique au-delà des gènes qui sont amplifiés (Pinaki et Ekramul, 2012).

Aujourd'hui, de nouvelles technologies facilitent l'étude de l'ADN méta génomique en proposant de séquencer directement l'ADN extrait s'affranchissant ainsi des étapes de clonage ou d'amplifications (Shendure et Ji, 2008).

Le tableau 3 résume les méthodes dites d'empreintes génétiques et qui sont largement utilisées en écologie microbienne. Elles permettent l'analyse simultanée de plusieurs échantillons. Néanmoins, certaines possèdent plus d'inconvénients que d'autres.

Tableau 3. Caractéristiques des techniques de biologie moléculaire couramment utilisées en écologie microbienne pour l'étude de la diversité bactérienne d'un environnement (Azandegbe, 2010).

Méthodes	Principe	Avantages	Inconvénients	Références
DGGE/TGGE	Des fragments d'ADN ayant presque la même longueur mais qui diffèrent ne serait-ce que par un nucléotide peuvent être séparés par électrophorèse sur un gradient dénaturant chimique (DGGE) ou thermique (TGGE) et la séparation est fonction de la température de fusion de chaque fragment.	<ul style="list-style-type: none"> - Etude de la structure de la communauté bactérienne d'un environnement donné. - Elle peut être semi-quantitative. - Selon le besoin, des bandes peuvent être séquencées pour identification taxonomique. - Plusieurs échantillons peuvent être comparés 	<ul style="list-style-type: none"> - Cette méthode nécessite une mise au point préalable (pour tout nouveau gène) qui se situe aux trois niveaux, c'est-à-dire, mise au point de l'extraction d'ADN ou ARN, de la PCR mais aussi du gradient de dénaturation. - Co-migration de plusieurs bandes qui entraîne une sous-estimation de la diversité. - Formation de bandes chimériques qui induisent une surestimation de la diversité. - La taille de fragment à amplifier est limitée. 	Muyzer et <i>al.</i> , 1993 (Muyzer et Smalla, 1998)
ARISA/RISA (Ribosomal intergenic spacer analysis)	Cette méthode est basée sur l'analyse du polymorphisme de l'espace intergénique en sous-unités 16S et 23S de l'ARNr. Les fragments amplifiés sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose.	C'est une méthode automatique qui ne nécessite pas une mise au point préalable.	Cette méthode ne renseigne pas sur la richesse spécifique et ne permet pas l'identification des espèces présentes.	Fisher et Triplett, 1999.
(T)-RFLP (Terminal-Restriction fragment length polymorphism)	Digestion de fragments d'ADN double-brin par des enzymes de restriction et séparation par électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide	<ul style="list-style-type: none"> -Détection d'espèces rares d'une communauté. - Méthode semi-quantitative (T-RFLP). -Méthode reproductible. 	<ul style="list-style-type: none"> - Formation de pseudo-fragments de restriction (T-RFLP) -Ne convient pas pour des communautés complexes comme le sédiment par exemple. 	Dollhopf et <i>al.</i> , 2001.
SSCP (Single strand conformation polymorphism)	Séparation de fragments d'ADN simple-brin sur gel d'acrylamide ou par électrophorèse sur capillaire. Cette méthode est basée sur le principe que les ADN simple-brin possèdent une conformation tridimensionnelle déterminée par les interactions intramoléculaires qui affectent la mobilité électrophorétique à faible température.	<ul style="list-style-type: none"> - Bonne résolution - La séparation par capillaire permet l'identification par comparaison des pics obtenus à des pics d'espèces connues. -Méthode reproductible 	<ul style="list-style-type: none"> - La taille du fragment à amplifier et à séparer est limitée. Elle doit être courte pour une bonne résolution. -Co-migration de plusieurs bandes 	

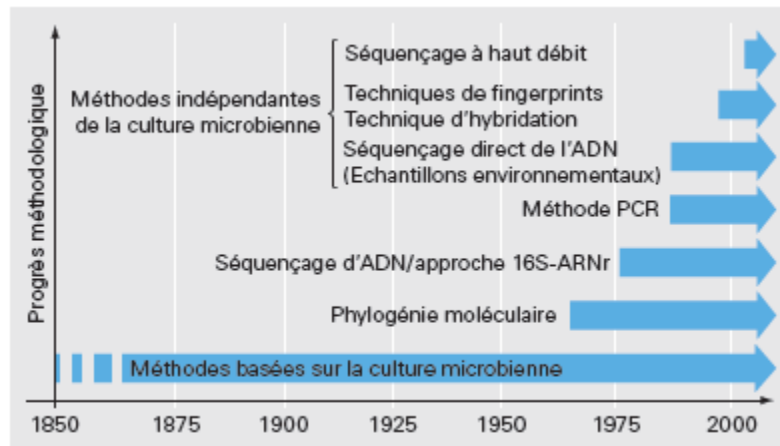


Figure 7. Evolution des méthodes de microbiologie depuis 1850. Les techniques de biologie moléculaire n'ont été développées qu'au cours des dernières décennies (d'après Logue, 2008).

II.2.1. Analyse des microorganismes de l'environnement par la technique d'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE)

Il n'est pas nécessaire pour toutes les études d'écologie microbienne d'isoler les organismes. En fait, il est possible d'étudier la biodiversité d'un habitat sans cultiver ou même observer les cellules. Dans ce but, des gènes spécifiques sont caractérisés pour apprécier la biodiversité d'une communauté microbienne. La DGGE est une méthode d'empreinte moléculaire qui permet une estimation qualitative et semi-quantitative de la biodiversité (Doriguo *et al.*, 2005)

Le gène codant l'ARN ribosomique 16S est fréquemment amplifié. Ce gène est composé de zones plus ou moins conservées. L'amplification des zones conservées cible toutes les bactéries, tandis que l'amplification de zones variables permet de cibler un niveau taxonomique précis. Dans ces techniques l'ADN est extrait des échantillons de sols ou bien l'eau, et amplifié avec des amorces universelles ciblant la partie conservée de la séquence du gène 16S rDNA (Faugier, 2010).

L'analyse des séquences des gènes codant l'ARN 16S amplifiés à partir d'une communauté microbienne peut donner une image phylogénétique de cette communauté. L'amplification par PCR à partir de communautés microbiennes de l'environnement à l'aide d'un jeu d'amorces pour l'ARN 16S produit typiquement une bande unique sur le gel d'électrophorèse qui contient des fragments amplifiés d'ADN, d'une seule taille. Cependant, malgré une pureté apparente, cette bande contient de nombreux gènes très voisins, mais non identiques. La DGGE est une technique d'électrophorèse sur gel qui sépare les gènes qui ont

une taille identique, mais qui diffèrent selon leur profil de dénaturation, qui dépend de leur séquence en nucléotides (Madigan et Martinko, 2007).

➤ **Principe de la technique**

Les électrophorèses en gradient de gel dénaturant (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ou DGGE) et les électrophorèses en gradient de température (Temperature Gradient Gel Electrophoresis ou TGGE) sont des techniques d'électrophorèse dénaturantes mises au point par Fischer et Lerman (1983) pour la première et Rosenbaum et ses collaborateurs (1987) pour la seconde. Les molécules d'ADN de petites tailles (entre 80 et 500 pb) se déplacent au sein du gel et subissent une dénaturation progressive (par un agent chimique dénaturant comme l'urée ou le formamide) durant l'électrophorèse en fonction de leur température de fusion (T_m). Une fois les brins dénaturés, leur encombrement stérique est trop important pour continuer la migration dans le gel. Ces techniques permettent donc de séparer des fragments de même taille en fonction de leur T_m , c'est-à-dire de leur composition nucléotidique : une augmentation du pourcentage en GC (3 ponts hydrogènes) par rapport au pourcentage en AT (2 ponts hydrogènes) augmente le T_m de la molécule pour une taille donnée. Afin d'éviter la séparation complète des deux brins d'ADN, une séquence riche en GC est ajoutée à l'une des amorces lors de la PCR environ (40pb). Cette pince GC permet de garder les deux brins d'ADN attachés par cette extrémité grâce à la série de triples liaisons hydrogènes entre les guanines et les cytosines (Huybens et *al.*, 2009), figure 8.

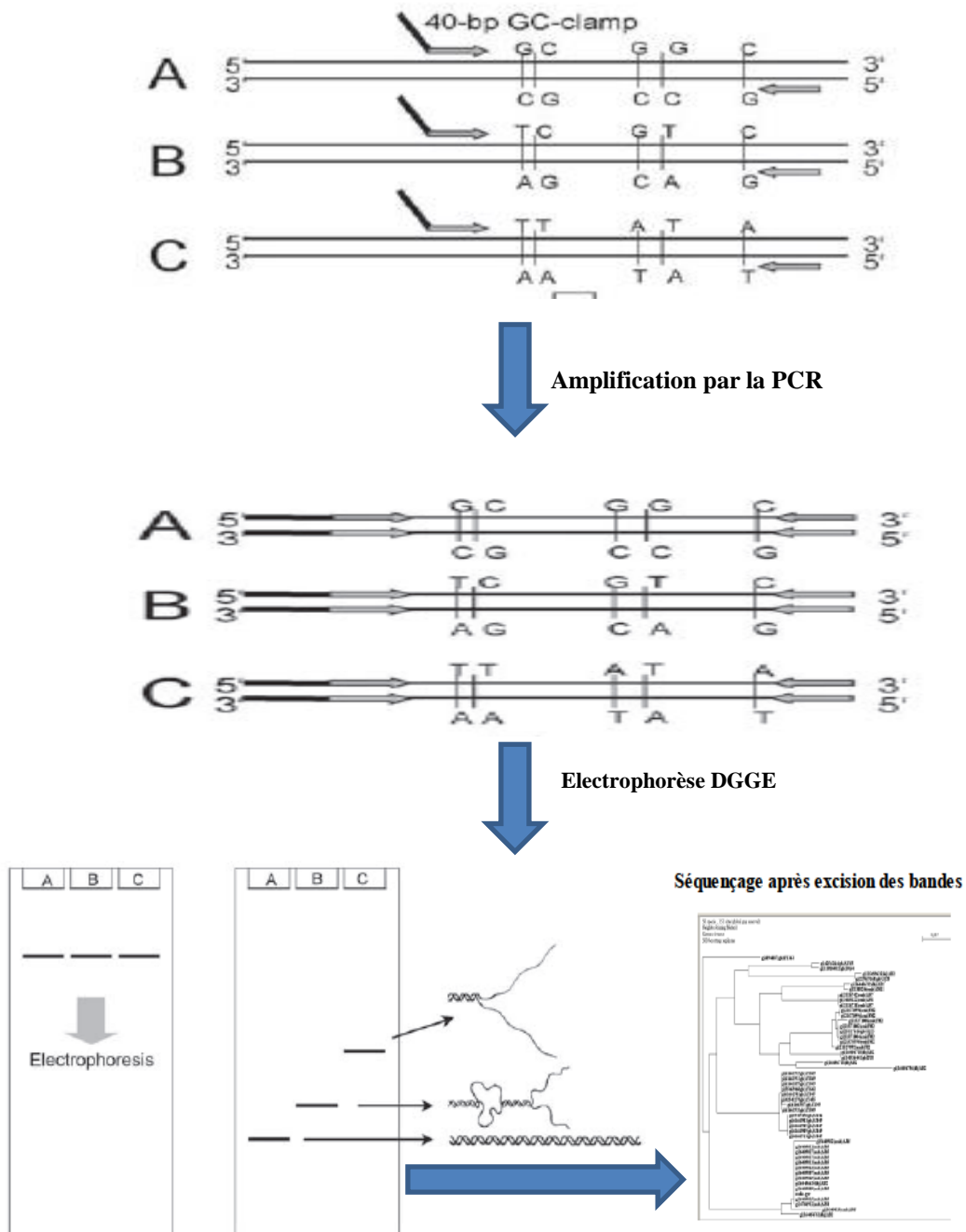


Figure 8. Représentation schématique montrant la formation de la séquence GC clamp sur les produits PCR des gènes A, B, C qui ont une seule substitution de base parce que la température de fusion des produits PCR du gène A est plus élevée que B et C il migre plus loin dans le gel DGGE. Après la fin de la fusion Complete des produits issus des différents gènes, une structure embranchée est formée qui migre lentement. Selon (Paul et *al.*, 2004).