



Mémoire MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par

- ❖ CHEKHAB Chaker
- ❖ GOUALA Nesrine
- ❖ TAAYAT Wissame

Thème :

Approches Métagénomiques en Microbiologie Du Sol

Devant le jury :

Présidente :	Dr. SEBIHI Fatima	M.C.A	Université de Khenchela
Encadrante :	Dr. LEULMI Nassima	M.C.A	Université de Khenchela
Examinatrice :	Dr. MELLAL Hanene	M.C.B	Université de Khenchela

Année : 2021/2022

Remerciement

À l'issue de ce modeste travail, nous remercions le Dieu le tout puissant de nous avoir accordé la volonté, courage, la force et la patience pour accomplir ce mémoire.

*En premier lieu, nous tenons à exprimer ma profonde gratitude à l'égard de ma directrice de recherche et mon enseignante, **Mme LEULMI Nassima**, pour l'attention qu'elle a portée à la réalisation de ce modeste travail, pour ses nombreux conseils précieux, remarques et corrections ainsi que pour ses encouragements répétés.*

*Nos remerciements vont également à tous les membres du jury, **Mme SEBIFI FATIMA**, **Mme MELAL HANEN**, qui ont accepté d'évaluer notre travail. Je leur exprime ma sincère gratitude et tout mon respect.*

Que tous ceux qui ont contribué à mener à bien ce travail trouvent ici l'expression d'une parfaite considération...

Dédicace

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

Je t'aime MAMA

A ma chère sœur Selma

A mes chers frères, Firas, Akrem , pour leur appui et leur encouragement

A Tous Mes amis, Nasro, Walid , Mourad, Hamza, Hadil, Imen

A Asma pour leur soutien pendant ce parcours

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

A Nesrine et Wissem pour ses efforts à terminer ce travail

Merci d'être toujours là pour moi.

Chekhab Chaker

Dédicace

NOUS dédions ce mémoire à :

MA mère , qui a ouvert pour ma réussite , de par son amour , son soutien , tous les sacrifices consentis et ses

Précieux conseils , pour toute son assistance et sa présences dans ma vie , reçoit a travers

Ce travail aussi modeste soit -il ,l'expression sentiments et de mon éternelle gratitude je vous souhaite un prompt rétablissement.

Je t'aime MAMA .

Mon père , qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privation pour m' aider a avancer

Dans la vie . puisse dieu faire en sort que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles , l'éducation et le soutient

Permanent venus de toi je t'aime papa.

A mes chères sœurs : Rania , Nourhane , Abir , Aya , merci pour votre encouragement et vos soutiens merci pour d'etre

Toujours accoté de moi .

Ma chère fille ,Aroua je suis si heureuse que tu sois sans ma vie . je prie de dieu de te voir dans les plus hauts rangs , que dieu te protège pour

Moi.

AU MARI de ma sœur : abd rahim boudaif , merci pour ton soutien et ta présence a mes cotés.

A ma chère amie : Assia , soulaf ,wissam ; imen ;merci pout votre amour et votre amitié et aussi ma chère binôme

Chaker et wissam qui a partager le travaille avec moi.

Gouala Nesrine

Dédicace

Je dédie ce modeste travail:

À la lumière de mes jours la source de mes efforts la flamme de mon cœur
ma vie et mon bonheur mon cher papa «*Ahcen Taayet.*».

À ma très chère *maman* que dieu lui garde dans son vaste paradis.

À ma *grand-mère* c'est la personne la plus idéale dans ce monde. C'est
vrai qu'elle n'est pas avec nous récolter le fruit de ses sacrifices, mais elle
reste toujours le plus présent, «que dieu aie son ame».

À mes tantes et mes oncles: *Amel, Hmama, Abd-Elkarim, Derredji,*
Nacer, Achour.

À mes cousins et cousines: *Asma, Rania, Jouri, Assala, Douaa. Rouia*

À mon binôme *Chaker et Nesrine* de notre patience et d'avoir pris la peine
de compléter ce mémoire.

À *Djalal Bourabha* pour son encouragement son effort son soutien.

À mon soutien moral et source de joie et de bonheur ma sœur
«*Chahrazed Agdi*» pour l'encouragement et l'aide qui il m'a toujours
accordé.

À mes chères amies qui m'accompagnent dans mon parcours universitaires:

Amira, Ibtissem, Hanane, Asma, Amel,
Souhila, Latifa, Samiha, Imane, Wahiba.

Wissame taayat

Approches Métagénomiques en Microbiologie Du Sol

Résumé

Au cours de la dernière décennie, la métagénomique a fait de grands progrès dans la mesure de l'écologie microbienne, en particulier la diversité et l'évolution des microorganismes dans le sol. C'est pour cela, Cette étude a été réalisée pour énumérer les différentes techniques utilisées pour l'analyse de biodiversité microbienne dans le sol. En effet, il existe de nombreux micro-organismes cultivables et non cultivables au niveau du sol, ce qui rend leur classification un peu compliquée. Les chercheurs ont fait l'appel à la métagénomique pour étudier les microbes qui ne peuvent être cultivés.

Plusieurs méthodes de culture indépendante (Métagénomique) ont bien été étudié par la littérature et chacune a ses propres applications à savoir la DGGE, ARISA, RIZA, SSCP, T.RFLP, DHPLC et le pyroséquencage 454.

Les données théoriques obtenus et les outils mis au point dans cette étude pourront servir à appliquer directement l'approche métagénomique au laboratoire par une étude expérimentale sur un écosystème tellurique peu exploité-semi aride de la région de khenchela.

Mots clés : Sol, Biodiversité, Culture dépendante, Culture indépendante, Métagénomique.

Approches Métagénomiques en Microbiologie Du Sol

Abstract

Over the past decade, metagenomics has made great strides in measuring microbial ecology, in particular the diversity and evolution of microorganisms in the soil. That is why This study was carried out to list the different techniques used for the analysis of microbial biodiversity in the soil. Indeed, there are many cultivable and non-cultivable microorganisms at the soil level, which makes their classification a little complicated. The researchers used metagenomics to study microbes that cannot be cultured.

Several methods of independent culture (Metagenomics) have been well studied by the literature and each has its own applications, namely DGGE, ARISA, RIZA, SSCP, T.RFLP, DHPLC and pyrosequance454.

The theoretical data obtained and the tools developed in this study can be used to directly apply the methagenomic approach in the laboratory by an experimental study on a terrestrial ecosystem - the semi-arid soil of the kenchela region.

Key words: Soil , Biodiversity , Dependent culture , Independent culture ,Met genomics

Approches Métagénomiques en Microbiologie Du Sol

ملخص:

على مدى العقد الماضي ، خطت الميتاجينوميات خطوات كبيرة في قياس البيئة الميكروبية ، ولا سيما تنوع وتطور الكائنات الحية الدقيقة في التربة. هذا هو السبب في إجراء هذه الدراسة لسرد التقنيات المختلفة المستخدمة لتحليل التنوع البيولوجي الميكروبي في التربة. في الواقع ، هناك العديد من الكائنات الحية الدقيقة القابلة للزراعة وغير القابلة للزراعة على مستوى التربة ، مما يجعل تصنيفها معقدا بعض الشيء. استخدم الباحثون الميتاجينوميات لدراسة الميكروبات التي لا يمكن تربيتها.

وقد تم دراسة العديد من أساليب الثقافة المستقلة (ميتاجينوميكس) جيدا من قبل الأدب ولكل منها تطبيقاتها الخاصة ، وهي شبه القاحلة تغيير طبيعة التدرج الكهربائي للهلام ، تحليل فاصل الريبوسوم البيني الآلي ، تعدد أشكال الحمض النووي الواحد المتشكلة ، تعدد شكل طول جزء الحصر ، الفصل الكروماتوغرافي السائل بالضغط العالي في حالة الفصل ، التسلسل الحراري 454.

يمكن استخدام البيانات النظرية التي تم الحصول عليها والأدوات التي تم تطويرها في هذه الدراسة لتطبيق نهج الميتاجينوميك بشكل مباشر في المختبر من خلال دراسة تجريبية على نظام بيئي أرضي - التربة شبه القاحلة في منطقة خنشة.

الكلمات المفتاحية: التربة، التنوع البيولوجي، الزراعة التابعة، الزراعة المستقلة، الميتاجينوميات.

TABLE DES MATIERES :

Titre	Page
Remerciement	/
Dédicaces	/
Tables des Matières	/
Liste des Figures	/
Liste des Tableaux	/
Liste des Abréviations	/
Résumé	/
Introduction Générale	01
Chapitre I : La flore du Sol	
I.Le sol	02
I.1.Caractéristiques générales des phases du sol	02
I.1.1 La phase solide du sol	02
I.1.2. La phase liquide du sol	03
I.1.3. La phase gazeuse du sol	04
I.2. Texture du sol	04
I.3. La flore du Sol	05
I.3.1.Levures	06
I.3.2.Bactéries	07
I.3.3.champignons	07
I.3.4.Les Virus	08
I.3.5.Les Protozoaires	08
I.3.6.Les Algues	08
I.4.Facteurs de variation de l'activité des microflores du sol	09
4.1Facteurs physiques	09
4.2 Facteurs biologiques	09
4.3. Facteurs énergétiques	10
4.4 Facteurs climatiques	10
4.5. Facteur chimiques	11
I.5.Intérêts de la microflore du sol	12
I.5.1. Les bactéries	12

I.5.2.Les champignons	13
I.5.3Les algues	14
I.5.4.Protozoaires	14
Chapitre II : Les Méthodes de la Culture dépendante	
II.1.Définition de la méthode de culture dépendant	15
II.2. les caractéristiques classiques	15
II.2.1.les caractéristiques morphologiques	16
II.2.2.Les caractères physiologiques et métaboliques	16
II.2.3.Les caractéristiques écologiques	17
II.3.Les Méthodes immunologiques (sérologique)	17
II.3.1. Méthodes direct	18
II.3.1.1.Agglutination	18
II.3.1.2.L'immuno diffusion	19
II.3.1.3.Immuno-précipitation	20
II.3.2.Mesure indirecte ou immuno dosage	21
II.3.2.1.Technique d'ELISA	21
II.4.Les caractéristiques moléculaires	22
II.4.1.Le gène codant pour l'ARNr 16S (ADNr 16S)	22
II.4.2.Le séquençage de première génération : exemple (méthode de Sanger)	23
II.4.3.Hybridation des acides nucléiques	25
Chapitre III : Les Méthodes de la Culture Indépendante	
La culture indépendante	27
III.1.La métagénomique	28
III.2. Les méthodes de la culture indépendantes	30
III.2.1.La DGGE	30
III.2.2.Pyroséquençage 454	30
III.2.2.1.Les étapes du pyroséquençage 454	31
III.2.3.SSCP	33
III.2.4.ARISA/RISA	34
III.2.5.T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism)	34
III.3.Métagénomique : des analyses puissantes des communautés microbiennes	35

Table des Matières

III.4.Applications	35
III.5.La métagénomique et la santé humaine	36
III.6.La métagénomique et l'environnement	36
III.7. Limite des méthodes actuelles	36
III.8. Comparaison de différentes méthodes de cultures indépendantes	36
III.9. Application des méthodes de culture indépendantes en matrices environnementales	38
III.10. Les avantages et inconvénients des méthodes de cultures dépendantes et cultures indépendantes	39
Conclusion Générale	41
Références Bibliographiques	42

LISTE DES FIGURES :

Figure	Titre	Page
Figure 01	Les différents horizons d'un profil de sol	02
Figure 02	Arbre phylogénique universel montrant l'existence des trois domaines: bacteria, archaea et eucarya. L'ordre de branchement, de la gauche vers la droite	06
Figure 03	Aperçu simplifié et général de la culture dépendante	15
Figure 04	technique d'agglutination (directe et indirecte)	29
Figure 05	les étapes de la technique d'immuno précipitation	20
Figure 06	Technique immuno-enzymatique.	21
Figure 07	Principe de la PCR. Un seul brin d'ADN est représenté pour l'étape d'élongation.	23
Figure 08	le principe de technique de singer	25
Figure 09	Formation d'hétéroduplex son de/cible lors d'un test par hybridation d'acides :	26
Figure 10	Les différentes étapes et applications de la métagénomique	39
Figure 11	L'étude du métagénome d'un milieu	39
Figure 12	Résumé des principales étapes de séquençage par la technologie 454	33
Figure 13	Procédures expérimentale de différentes méthodes de culture indépendante.	37

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau	Titre	Page
Tableau 01	Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 15cm	06
Tableau 02	Les activités bénéfiques des rhizobacteries aux plantes	13
Tableau 03	La méthode morphologique de l'identification des microorganismes et leur avantage.	16
Tableau 04	Méthodes et amorces utilisées pour les diversités microbiennes des échantillons du sol	39

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide riboNucléique.

ARN_R : Acide riboNucléique ribosomale

ADN_R : Acide DésoxyriboNucléique ribosomale

PCR : amplification en chaîne par polymérase

UTOs : Unités Taxonomiques Opérationnelles

AC : Anti corp

AG : Anti gène

DHPLC: denaturing high pressure liquid chromatography

T°: Température

PH: Potentiel Hydrogène

ME :microscope électronique .

MEB :microscope électronique à balayage .

DNTP :désoxyribonucléotide trip phosphate.

DGGE :électrophorèse sur gel à gradient dénaturant .

HPS :séquençage à haut débit .

NGF : séquençage de nouvelle génération .

PPI :pyrophosphate inorganique .

ATP :Adénosine triphosphate.

SSCP :polymorphisme de conformation simple brin.

ITS :Espaceur Transcrit Inter génique .

TRFLP :Terminal – R restriction Fragment Lenght Polymorphisme .

CIM : méthode de la culture indépendante.

INTRODUCTION GENERALE

Le sol est l'un des plus importants réservoirs de diversité microbienne d'un point de vue écologique, et aussi c'est un milieu adéquat pour le développement des microorganismes et l'étude des interactions entre les communautés microbiennes et les autres composants de l'écosystème sol-végétarien.

Depuis une vingtaine d'années, les populations microbiennes sont fréquemment étudiées par des techniques de biologie moléculaire. En effet, l'étude des populations par isolement de bactéries sur milieux de culture ne permet la mise en évidence que d'une très faible proportion des espèces bactériennes présentes. Par exemple, seulement 0,01 à 0,1 % des cellules bactériennes océaniques permettent d'obtenir une colonie sur des milieux de laboratoire. (Quénéa K, 2004)

De plus, l'isolement et le suivi d'une souche spécifique nécessitent que celle-ci possède un marqueur particulier ou qu'elle croisse sur un milieu sélectif, ce qui n'est pas toujours le cas. Il est aujourd'hui possible de séquencer l'ADN de toutes les microorganismes présentes dans un milieu donné (sol, eau, tube digestif de l'homme et des animaux, échantillons cliniques, matrice alimentaire...). Cette approche, nommée «**métagénomique**», nous renseigne sur la diversité et l'abondance relative des microorganismes présents. (Kurokawa *et al*, 2007)

Ce travail a pour objectif de mettre le point sur les différentes méthodes de culture indépendantes pour analyser une population microbienne du sol. Il s'articule autour de deux axes principaux : méthode de culture dépendante et méthode de culture indépendantes.

Ce mémoire théorique est scindée en trois parties : La première partie est consacrée à une étude de la flore du sol qui s'exprime tous les organismes qui occupent une place centrale dans le fonctionnement de notre écosystème. La deuxième partie concerne les tests et les méthodes sérologiques et le développement de PCR. Par la suite, une étude profonde concernant l'approche métagénomique, et suivie par une conclusion générale et des perspectives pour ce travail de recherche.

I. Le sol

Le sol fait partie de la biosphère, il est dynamique et vivant. C'est le résultat d'une évolution lente dans laquelle le climat, les ondulations et les organismes contribuent à leur formation, modifient les roches hôtes et interagissent avec les organismes (Soltner, 1992).

A ce stade, le sol présente une couche B (**figure 01**) correspondant à l'accumulation d'exsudat (résistance mécanique de la surface) (Dagadi, 2011).

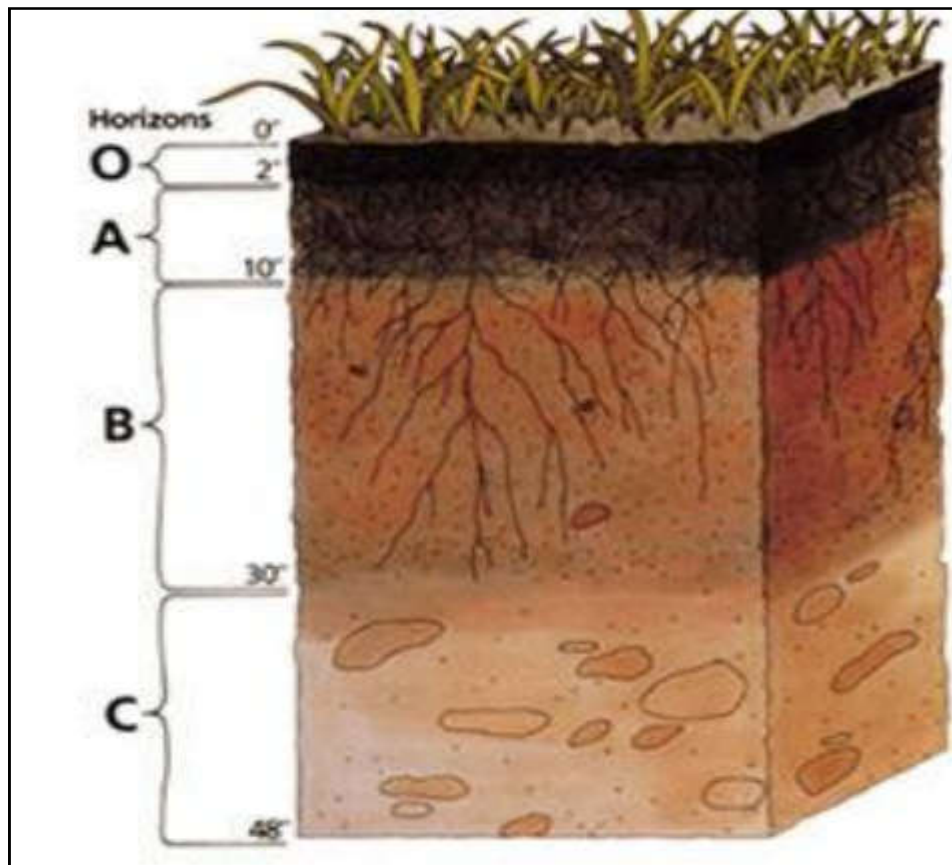


Figure 01 : Les différents horizons d'un profil de sol (Boukarabila Mustapha, 2017).

I.1. Caractéristiques générales des phases du sol

I.1.1. La phase solide du sol

Elle est constituée par des minéraux et des matières organiques en proportions variables. On pourrait considérer les organismes vivants du sol comme une partie de la phase solide, puisqu'ils ne sont ni gazeux ni liquides (Calvet R, 2000). On distingue deux fractions dans le sol:

- Fraction minérale

Les minéraux constituent, en général, de 95 à 99% du sol. La composition minérale dépend de la nature de la roche-mère. La nature des minéraux peut être extrêmement diverse avec des tailles granulométriques différentes (Quénéa K, 2004):

- Sable ($\varnothing = 2000$ à $50 \mu\text{m}$)
- Limon ($\varnothing = 50$ à $2 \mu\text{m}$)
- Argile granulométrique ($\varnothing < 2\mu\text{m}$)

La texture d'un sol correspond à la répartition des minéraux par catégorie de grosseur, indépendamment de la nature et de la composition de ces minéraux. Les sols sont classés suivant leurs proportions relatives en particules argileuses, limoneuses et sableuses (Atlas R et Bartha R, 1992).

- Fraction organique

La fraction organique d'un sol est constituée à plus de 80% de matière organique morte (résidus de plantes et d'animaux en état de décomposition naturelle) (Paul E et Clark F, 1996). On trouve aussi des organismes vivants: des bactéries dont beaucoup d'actinobactéries, des champignons et une microfaune formée de protozoaires, nématodes, insectes et vers de terre (Quénéa K, 2004). Le sol est un habitat généralement favorable à la prolifération des microorganismes, leur nombre est supérieur à celui trouvé dans les eaux douces ou marines: la population microbienne s'élève à des valeurs comprises entre 10^6 et 10^9 bactéries par gramme du sol (Artiola-Fortuny J et Fuller W, 1982).

I.1.2. La phase liquide du sol

La phase liquide du sol n'est pas de l'eau pure mais une solution dont la composition est complexe et très variable. On la désigne par l'expression « solution du sol ». Elle contient de très nombreuses substances dissoutes organiques et inorganiques, ionisées et non. D'une façon générale, la solution du sol est difficile à décrire et à étudier en raison de sa très grande variabilité spatiale et temporelle, de sorte qu'il n'existe pas de composition type. On peut cependant donner quelques indications générales en distinguant deux catégories de solutés:

- Les micro-éléments dont la concentration est inférieure à 1 mmol/m³, beaucoup d'éléments traces métalliques entrent dans cette catégorie.

- Les macroéléments dont la concentration est supérieure à cette limite; les éléments les plus fréquents et les composés chimiques correspondants sont: C(HCO₃⁻), N(NO₃⁻), Na (Na⁺), Mg (Mg⁺²), Si (Si(OH)₄), S (SO₄²⁻), Cl (Cl⁻), K (K⁺), Ca (Ca⁺²) et O₂.

La solution du sol est principalement une solution d'électrolytes, généralement peu concentrée et dont la molarité totale est souvent de l'ordre de 10⁻³ à 10⁻⁵ mol/L. Elle contient également des ions H⁺ et OH⁻ dont les concentrations déterminent la réaction du sol caractérisée par le Ph (Calvet R, 2000).

I.1.3. La phase gazeuse du sol

La phase gazeuse du sol est souvent appelée l'atmosphère du sol. Sa composition est souvent voisine de celle de l'air mais elle peut être très variable dans l'espace et dans le temps. Elle dépend principalement de deux facteurs, la proximité de l'atmosphère, c'est-à-dire la profondeur dans le sol et l'activité biologique.

L'air du sol contient en général les mêmes substances que l'air atmosphérique mais sa composition peut être très différente en raison, en particulier, de l'activité biologique (Soulas G *et al*, 1983). Les sols bien aérés contiennent environ 180 à 205 ml d'O₂ par litre d'air mais cette teneur peut être abaissée à 100 ml ou moins dans les sols inondés et dans des microenvironnements alentours des racines des plantes.

La teneur en CO₂ est généralement comprise entre 3 et 30 ml par litre de sol et peut atteindre 100 ml par litre d'air en profondeur ou au voisinage des racines et en milieux saturés en eau. L'air du sol contient également d'autres substances, telles que NO, H₂O, NH₃, CH₄, H₂S et, parfois, des composés organiques volatils (Calvet R, 2000).

I.2. Texture du sol

La texture est une propriété du sol, globalement variable dans la composition granulométrique des sols fins (Gobat *et al*, 2010). Il reflète les proportions respectives des composants triés selon leur échelle.

Les composants du sol interagissent pour produire ses propriétés (Gobat *et al*, 2005).

L'agencement des trois parties décrites ci-dessus contrôle les fonctions de transfert (eau, solutés et gaz) et les propriétés mécaniques du sol (stabilité structurale, résistance à la compression). La texture du sol est déterminée par les proportions relatives des composants classés par taille (Gobat *et al*,1998).

I.3. La flore du sol

Dans le sol, les microorganismes sont représentés par quelques métazoaires, des protozoaires, des algues microscopiques, des champignons, des bactéries, des actinobactéries, des cyanobactéries et des virus. Les bactéries, les cyanobactéries et les actinobactéries n'ont pas de noyau individualisé; leur information génétique est portée par une molécule cyclique d'acide désoxyribonucléique et des plasmides. Ces organismes sont appelés procaryotes, par opposition aux autres organismes possédant un noyau individualisé, les eucaryotes (Roger et Garcia, 2001).

Différentes classifications ou différents groupements peuvent être utilisées pour présenter les microorganismes du sol. Toutefois une présentation fondée sur la taxonomie phylogénique n'est pas toujours adaptée à une discipline qui met l'accent sur les activités des organismes. En effet, la taxonomie phylogénique sépare de façon parfois très marquée des microorganismes ayant un comportement très voisin dans les sols. Les bactéries et les champignons étaient les organismes prédominants (**tableau 1**) (Hoorman et Islam, 2010).Un exemple caractéristique est celui des algues et des cyanobactéries qui se comportent tous deux en producteurs primaires photosynthétiques dans le sols et les eaux douces, mais qui sont classés dans deux domaines différents (**Figure02**) (Roger et Garcia, 2001).

Tableau 01 : Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 15cm
(Hoorman et Islam, 2010) .

Microorganismes	Nombre (g/sol)	Biomasse (g/m ²)
Bactéries	10 ⁸ -10 ⁹	40-500
Champignons	10 ⁵ -10 ⁶	100-1500
Algues	10 ⁴ -10 ⁵	1-50
Protozoaires	10 ³ -10 ⁴	Variée

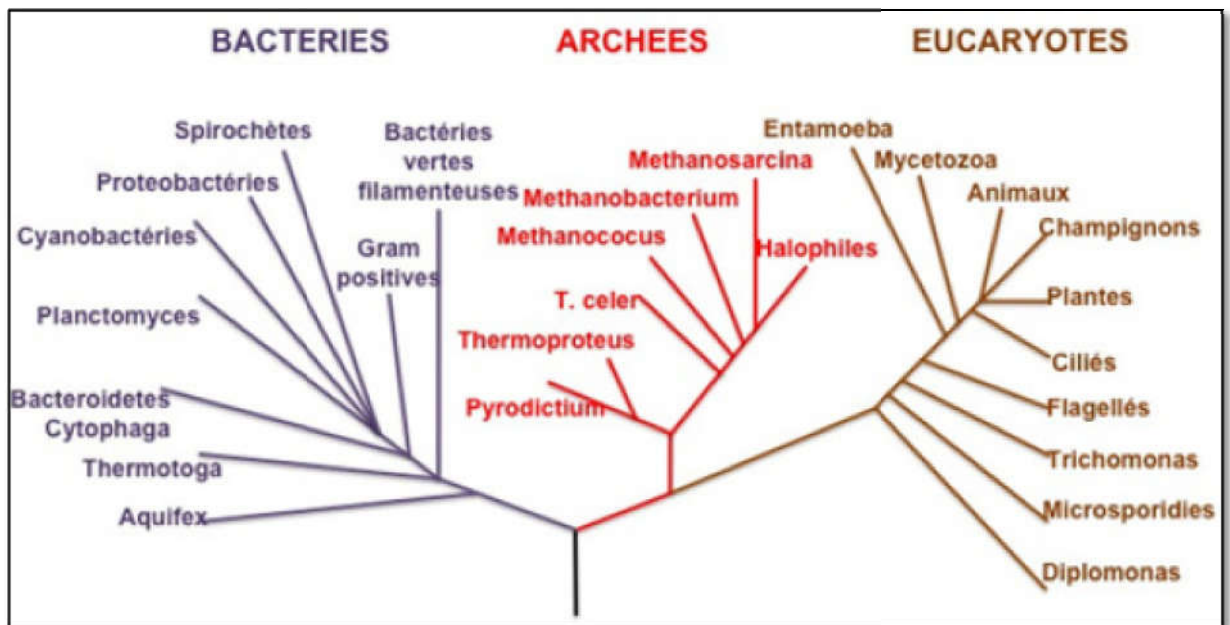


Figure 02 :Arbre phylogénique universel montrant l'existence des trois domaines: bacteria, archaea et eucarya. L'ordre de branchement, de la gauche vers la droite (Jonathan Berthon, 2008).

I.3.1.Les levures

Il y a très peu de levure dans le sol. Il contient différentes populations de levures selon le type, les caractéristiques et la végétation qu'il porte (*Lipomycesp* ; *Cryptococcusflavus* ; *Filobasidium capsuligenump* *Solicoccozyma terricola* ; *Apiotrichum xylopinii porosum*; *Tausoniapullulans*; *Cutaneotrichosporon moniliforme*; *Saitozyma podzolica*) (Simone M. et al ,2022). Cependant, leurs schémas de répartition ou leurs éventuelles variations saisonnières ne sont pas parfaitement connus. Les levures sont abondantes dans les sols riches en matière organique fraîche ou mal

décomposée et peut-être encore plus dans la litière forestière. (Dommergues et Mangenot, 1970).

I.3.2. Les bactéries

Les bactéries sont les micro-organismes les plus abondants et métaboliquement actifs dans le sol. De plus, tous les groupes bactériens connus ont été isolés à partir d'échantillons de sol, à l'exception de ceux issus des milieux appropriés utilisés (Dommergues et Mangenot, 1970).

Dans les sols organiques, les populations bactériennes diminuent avec la profondeur et dépassent parfois 160 cm au-dessus de la surface du sol. Dans les sols forestiers ombragés, les plus grandes populations se trouvent généralement dans la couche supérieure du sol d'un ou deux centimètres; En revanche, dans les sols de champ, il se trouve à quelques centimètres sous la surface de la croûte supérieure du sol.

La plupart des bactéries du sol sont des chimiotrophes, c'est-à-dire des organismes qui tirent leur énergie de la décomposition de la matière organique. Les autotrophes utilisent le dioxyde de carbone CO₂ comme unique ou principale source de carbone.

Les bactéries du sol étaient principalement GRAM positives, les principaux groupes étant les *corynébactéries*, les actinobactéries, les mycobactéries et les nocardiformes. Les genres les plus couramment isolés sont. *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Bacillus*, ce sont aérobie tandis que les bactéries du genre *Clostridium* prédominent dans des conditions anaérobies. Les modifications du potentiel nutritif du sol donnent naissance à des bactéries autotrophes du cycle de l'azote : *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* et soufrées : *Thiobacillus*, *Ralstoniasolanacarum*, *Verticillium dahlia*, *Fusariumoxysporum*, *Meloidogyne*, et *Cyperusrotundus* L (China, 2022 ; Jun li et al, 2022).

I.3.3. Les champignons

En général, les champignons du sol forment une biomasse aussi importante que celle des bactéries. Leurs activités métaboliques sont diverses et fondamentales pour l'équilibre écologique du sol, à travers : leurs interactions avec les systèmes racinaires des plantes, leur capacité à vivre et à décomposer les débris organiques, les gros

muscles et les composés aux structures complexes. De nombreuses études montrent la prédominance de: *Mucor*, *Trichoderma* et *Aspergillus*, tandis que *Mucor liliana*, *Mucor lucitanicus*, *Mucorhiemalis* (China, 2022, Guodong Zhu et al, 2022), *Cladosporium* et *Verticillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Zygorhynchus*, *Cephalosporium*, sont souvent isolés.

La biomasse fongique est très diversifiée selon les cas de sol. Elle peut être estimée de 120 kg/ha à plus d'une tonne en sol normal (Dommergues et Mangenot, 1970). Leurs activités métaboliques sont diverses et fondamentales pour l'équilibre écologique du sol. De nombreuses études montrent la prédominance des espèces: *Mucor*, *Trichoderma* et *Aspergillus*, tandis que *Rhizopus*, *Fusarium*, *Zygorhynchus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium* et *Verticillium* (Noumeur, 2008).

I.3.4. Les virus

En plus des micro-organismes visibles au microscope optique, le sol contient d'autres micro-organismes dont l'existence ne peut être démontrée que par microscope électronique. A la base, ce sont des virus qui, lorsqu'ils sont à l'état libre et placés à l'extérieur d'une cellule vivante et sous lumière, sont rapidement inactivés. Une fois absorbés, ils peuvent rester infectieux pendant longtemps (Davet, 2003).

I.3.5. Les protozoaires

Les protozoaires font partie des micro-organismes qu'on retrouve dans le sol. Ces organismes unicellulaires, qui se nourrissent de bactéries, font partie du régime alimentaire des populations de vers de terre bénéfiques en agriculture.

Certaines espèces de protozoaires de sol sont très courantes et se trouvent dans des conditions climatiques très différentes (Davet, 2003), *Holophrya paradiscolor*, *Pelagothrix plancticola* (Liminjiang, 2022).

I.3.6. Les Algues

Sont des organismes phototrophes, présentent des différences significatives par rapport aux bactéries ou aux champignons (Dommergues et Mangenot, 1970). Les algues peuvent se contenter de faibles intensités lumineuses, ce qui leur permet d'avoir un comportement autotrophe actif à plusieurs millimètres au-dessous de la surface, notamment dans les sols riches en particules de quartz translucides. Ainsi, le nombre diffère selon les profondeurs.

Les algues sont considérées comme relativement peu abondantes dans le sol. Mais leur présence est cependant commune. Les algues du sol incluent des espèces coccoïdes ou filamenteuses. Les groupes les plus courants sont des *Chlorophyceae*. Parmi les microorganismes photosynthétiques du sol, les Cyanobactéries sont dominantes dans les sols neutres et alcalins, alors que les algues sont les plus communes dans les sols acides.

I.4. Facteurs de variation de l'activité des microflores du sol

I.4.1 Facteurs physiques

A. La structure du sol

Les micro-organismes d'origine sont activement impliqués dans la formation, la stabilisation et la dégradation de la structure du sol. En revanche, la structure a eu un effet significatif sur l'activité microbienne, elle joue le rôle d'un véritable régulateur vis-à-vis des processus biologiques et biochimiques qui se déroule dans le sol (Dommergues et Mangenot, 1970).

La structure du sol la plus favorable à la croissance des micro-organismes est la structure émiettée (particulaire), qui se traduit par la présence dans le sol des particules élémentaires. Cela est dû à son effet direct sur les autres facteurs tels que : l'aération, la circulation et la teneur en eau (Mulder *et al*, 1969).

B. La texture du sol

La texture du sol a un rôle réglementaire dans les processus biologiques du sol et donc affecte la structure de la communauté microbienne du sol (Sessitsch *et al*, 2001). La texture du sol est une propriété essentielle qui affecte la facilité d'utilisation de la matière organique par les microorganismes. Elle détermine de façon significative l'humidité du sol et la disponibilité des nutriments (Veen et Kuikman, 1990).

I.4.2 Facteurs biologiques

Les microorganismes interviennent de manière plus ciblée dans les interactions directes ou indirectes entre eux et avec les autres organismes du sol (Gobat *et al*, 2003).

- **Végétation** : Le sol sous végétation est beaucoup plus riche en microorganismes qu'un sol nul (Alihaimoud *et al*, 1980).

- **Rhizosphère** : Divers chercheurs ont signalé que les populations microbiennes ont une densité dix fois plus grande et même d'avantage dans la rhizosphère que dans sol non rhizosphériques. Dans les rhizosphères, les microorganismes sont stimulés par les rapports de carbone et d'énergie d'origine végétale et par les composés secrétés par les racines (Clarck, 1969).

I.4.3. Facteurs énergétiques

Le nombre et l'activité des microorganismes dépendent essentiellement de l'énergie qui peut être libérée à la suite de la décomposition de la matière organique (Boullard et Moreau, 1962).

Les microbes du sol sont dans leur immense majorité des organismes saprophytes : ils se développent au dépend de matières organiques mortes (Chaussod et Nicolardo, 1986).

Le facteur le plus limitant de la masse microbienne dans le sol est l'insuffisance des substrats énergétiques pour la microflore que ce soit le carbone pour les hétérotrophes ou des substances minérales réduites pour les chimio-lithotrophes (Sasson, 1967).

I.4.4 Facteurs climatiques

A. Humidité du sol

Les sols secs ne présentent qu'une activité microbienne faible mais lorsque l'humidité augmente l'activité des microorganismes augmentent progressivement jusqu'à un maximum puis décroît (Morel, 1989).

L'humidité est nécessaire à la vie des microorganismes et aussi à leurs déplacements ; la vie sans air est possible puisqu'il existe des êtres anaérobies. Le développement optimum varie avec l'espèce du microbe considéré et avec la nature des sols (Gaussheret Erikson ,1986).

D'après Boullardet Moreau, 1962, l'excès d'eau entraîne une aération déficiente et détermine une sélection des germes. Un manque chronique d'eau entraîne également une sélection mais la microflore inhibée est évidemment différente de la précédente.

B. Température

La température du sol représente dans les zones arides un facteur écologique très important qui influence énormément la multiplication des microorganismes dans ces régions (Sasson, 1967).

Pour chaque espèce existe un seuil au-dessous du lequel, l'activité est nulle. Un optimum correspondant à une activité maximale et une limite supérieure au-delà de laquelle la cellule vivante est détruite (température létale) (Morel, 1989).

C. Influence des saisons

L'humidité et la température sont deux facteurs essentiels dont la combinaison oriente l'intensité saisonnière de l'activité microbienne. (Morel, 1989). Ainsi, il devient évident que la succession des saisons exerce un effet très important sur la microflore des sols.

Les conditions climatiques influencent la composition et les proportions des différents groupes microbiens. Le groupe microbien le plus touché par l'effet des variations saisonnières est celui des champignons, suivi par les algues et enfin les bactéries et les actinobactéries. Ces dernières s'adaptent bien aux variations climatiques (Karabi *et al.*, 2015).

I.4.5. Facteur chimiques

B. Pouvoir d'oxydoréduction

La nature et l'intensité de l'activité microbienne du sol relèvent largement de la valeur de son pouvoir oxydoréducteur à une conséquence directe sur les processus de dégradation des substances organiques : De bonnes conditions d'aérobiose induisent une oxydation aisée des substances organiques (Morel, 1989).

C. Salinité du sol

Les micro-organismes du sol jouent un rôle central dans la régulation des fonctions éco-systémique (Qi et Yang, 2017).

Le taux de salinité a une grande influence sur l'évolution de la microflore du sol. En effet, la faible salinité des sols favorise la prolifération des microorganismes, ce qui n'est pas le cas dans les sols arides (Dari, 2013).

L'inhibition de l'activité biologique par les sels se traduit par une forte teneur en composés hydrosolubles (Dari, 2013).

I.5.Intérêts de la microflore du sol

I.5.1. Les bactéries

Les bactéries ont plusieurs rôles décrire comme suite :

- La fixation du carbone et de l'azote atmosphérique et l'accumulation de nutriments dans les sols. *Frankia* est un actinobactérie symbiotique qui forme des nodules fixateurs d'azote (nodules actinorhiziens) avec un certain nombre d'arbres qui ont un intérêt économique en particulier pour le reboisement de sols peu fertiles (Casuarinacées) (Dirk van et al, 1979).
- La décomposition de la matière organique, formant l'humus et libérant des nutriments disponibles pour les plantes. Actinobactéries sont capables de décomposer les membranes des champignons phyto pathogènes et peuvent ainsi poursuivre la dégradation de la matière organique entreprise par la microflore fongique (Roger et Garcia, 2001).
- La formation des associations symbiotiques avec les plantes comme les Rhizobiums qui forment des nodules fixateurs d'azote au niveau des racines des légumineuses favorisant ainsi la croissance des plantes dans les sols pauvres en azote (Ritchie et Raina , 2016).
- La production d'antibiotiques de structures et mécanismes d'action variés. Près des 2/3 des antibiotiques actuellement sur le marché sont issus des bactéries filamenteuses du sol (les actinobactéries). Cinquante à soixante-quinze pour cent des souches d'Actinobactéries sont productrices d'antibiotiques (Streptomycine, Chlortétracycline, Oxytétracycline, Cycloheximide ...) qui affectent les interrelations entre microorganismes.
- Le développement de techniques de bioremédiation par l'exploitation des bactéries du sol dans des procédés de dépollution naturelle des sols contaminés par les hydrocarbures et pesticides (Muthukamalam *et al.* 2017).

Les substances probiotiques produites par les actinobactéries comprennent entre autres les vitamines B1, B2, B6, B12, la biotine et l'acide folique. D'après Kloepper et al, 1989 ; les rhizobactéries stimulatrices de la croissance des plantes ; elles doivent être compétitives aux autres communautés microbiennes rhizosphériques (Antoun et Prévost, 2005).

Les rhizobactéries ont plusieurs activités bénéfiques pour les végétaux (**tableau 02**) comme activités bio-fertilisants (améliorent la disponibilité des nutriments aux plantes), phyto-stimulateurs, et en bio-pesticides (bio-contrôles des agents phytopathogènes) (Somers *et al*, 2004).

Tableau 02 : les activités bénéfiques des rhizobactéries aux plantes (Martinez-Viveros *et al*, 2010).

Terme	Définition	Mécanismes	Référence
Biofertilisateur	Une suspension contenant des microorganismes vivants qui, une fois appliquée sur des graines, sur une plante ou dans le sol, colonisent la rhizosphère ou l'intérieur de la plante et promeuvent la croissance par l'augmentation de la disponibilité des nutriments principaux pour la plante hôte.	- La fixation biologique de l'azote. - L'utilisation des formes insolubles de phosphore.	Vessey, 2003; Somers <i>et al.</i> , 2004; Fuentes-Ramírez et Caballero-Mellado, 2006.
Phytestimulateur	Des microorganismes qui ont la capacité de produire ou de changer la concentration des régulateurs de la croissance.	- Production des phytohormones. - Réduction de la concentration de l'éthylène à l'intérieur de la plante.	Lugtenberger <i>et al.</i> , 2002; Somers <i>et al.</i> , 2004.
Biopesticide ou agent de	Des microorganismes qui stimulent la croissance d'une plante par la production des antibiotiques et des	- Production des antibiotiques - Production des enzymes qui dégradent les membranes des	Vessey, 2003; Somers <i>et al.</i> , 2004; Chandler <i>et al.</i> , 2008.

1.5.2. Les champignons

Les champignons constituent les agents principaux de la décomposition de la matière organique dans le sol. Leur rôle dans le cycle de l'azote est peu spectaculaire. Leur rôle essentiel est la minéralisation du carbone organique.

Sur le plan écologique, on peut distinguer deux groupes: les champignons du sol et les champignons des racines. Les premiers sont caractérisés par leur aptitude à se développer aux dépens de débris organiques sans passer par une phase symbiotique ou parasite. Cette phase est nécessaire pour les champignons des racines dont la faible

compétitivité leur permet d'attaquer uniquement des hôtes vivants ou sénescents dans des conditions de compétition réduite (Roger et Garcia, 2001).

I.5.3. Les algues

Les algues, en raison de leur caractère photosynthétique, ont une signification différente des autres microorganismes du sol. Les algues sont des producteurs primaires (Hattori T, 1973).

Les algues unicellulaires et filamenteuses ont un rôle important comme producteur primaire dans les sols désertiques (en valeur relative) et les sols submergés (en valeur absolue). Par les mucilages qu'elles produisent et par l'action mécanique des filaments, elles ont un rôle important dans l'amélioration de la structure des sols exondés dont elles augmentent l'agrégation. Elles protègent les environnements arides ou désertiques contre l'érosion en formant des croûtes à la surface du sol.

Les algues macrophytiques sortent du domaine de la microbiologie, mais certaines (*Chara*, *Nitella*, *Hydrodictyon* ...) jouent un rôle important dans la biologie des sols inondés et en particulier des rizières (Roger et Garcia, 2001).

I.5.4. Protozoaires

Le rôle des protozoaires dans le sol est encore mal compris. Les prédateurs jouent un rôle certain dans l'équilibre biologique des sols puisqu'ils consomment de très grandes quantités de bactéries (Alexander, 1961). Mais on ignore encore actuellement les conséquences de cette consommation importante de bactéries. La comparaison d'un sol stérileensemencé soit avec une bactérie, soit avec une bactérie et un protozoaire, montre qu'en présence du protozoaire, la densité bactérienne diminue au bout de quelques jours. Ce type d'expérience amènerait à conclure à une diminution de l'activité bactérienne par les protozoaires et éventuellement à une diminution possible de la fertilité des sols (Alexander, 1961).

Les protozoaires peuvent se développer dans la rhizosphère de nombreuses plantes où ils pourraient jouer un rôle indirect en ralentissant la prolifération des bactéries ou en stimulant leur activité, un rôle direct en synthétisant des substances exerçant une action sur le développement des plantes supérieures. Leur contribution à la dégradation ou la synthèse de la matière organique dans le sol est très mal connue (Roger et Garcia, 2001).

II.L'approche culturelle, le fondement de l'écologie microbienne

II.1.Définition de la méthode de culture dépendante

est une isolement des microorganismes à partir d'environnements complexe par des méthodes traditionnelles et moléculaires de détection, de caractérisation et d'identification, taxonomie des microorganismes.

La diversité bactérienne, quant à elle, est déterminée par séquençage de l'ADNr 16S des colonies isolées (figure03). La composition des milieux de culture, le temps de croissance ou encore la température d'incubation sont des paramètres déterminants qui vont influencer le type et le nombre de bactéries qui vont être capables de se développer (Hugenholtz, 2002, Rappé et Giovannoni, 2003).

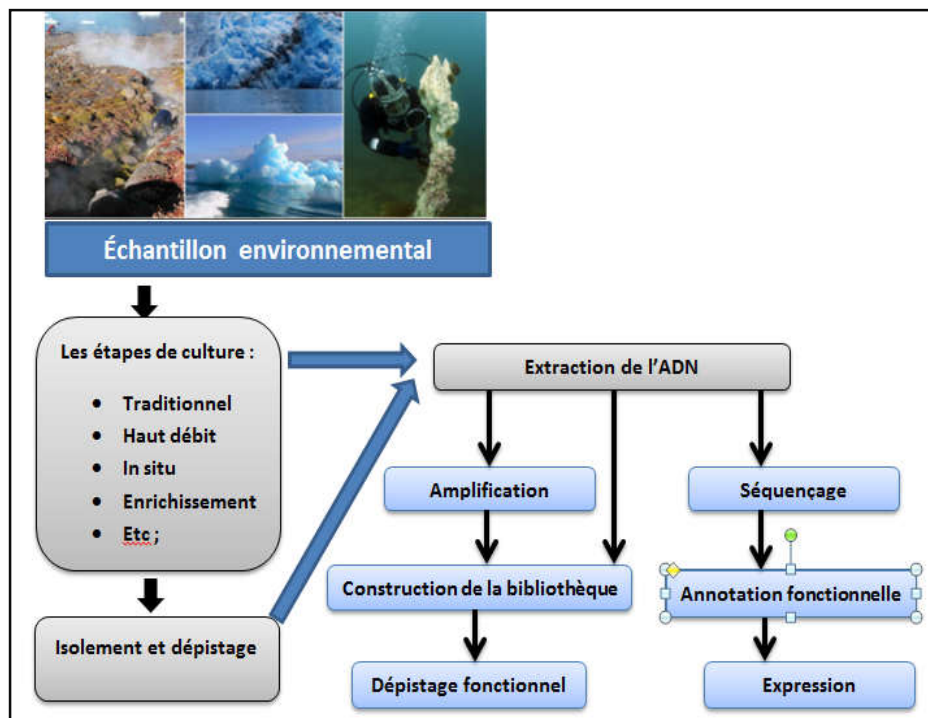


Figure 03 : Aperçu simplifié et général de la culture dépendante (Jan Kjølhede Vester Mikkel Andreas Glaring ,2014).

II.2. les caractéristiques classiques

Les approches classiques de la taxonomie font usage de caractéristiques morphologiques, physiologiques, biochimiques et écologiques. Ces informations ont été employées en taxonomie microbienne pendant de nombreuses années. Elles sont utiles pour l'identification de routine et peuvent aussi fournir des informations phylogénétiques.

II.2.1.les caractéristiques morphologiques

Cette méthode est utile pour l'identification préliminaire d'un micro-organisme ou pour la confirmation de l'identité. Chez certains organismes, comme les champignons, la morphologie des colonies et des cellules peut s'avérer un facteur de discrimination important (tableau 03). Cette méthode est simple, rapide et abordable car les bactéries et les champignons sont directement observables à l'œil nu ou avec un microscope optique. Pour observer des virus ou pour grossir ou avoir une meilleure résolution des structures bactériennes et fongiques, il faut un microscope électronique (à transmission) [ME] ou un microscope électronique à balayage (MEB) (Tshikhudo *et al*,2013).

Tableau 03 : La méthode morphologique de l'identification des microorganismes et leur avantage.

Méthodes	<p>La morphologie de la colonie comprend les éléments suivants :</p> <ul style="list-style-type: none">- forme : circulaire, filamenteuse (fibreuse), rhizoïde (fibres épaisses), irrégulière;- élévation : élevée, plate, convexe (arrondie), ombonée (saillie), cratériforme;- pourtour de la colonie (bordure) : régulier (entier), ondulé (ondoyant), lobulaire (projections digitiformes), filiforme (projections fibreuses), recourbée (tourbillonnée);- surface : lisse, terne, luisante (muqueuse), mate (verre dépoli), rugueuse (plissée);- opacité et couleur : transparente, translucide, opaque, fluorescente, irisée, pigmentée. <p>La morphologie des cellules comprend les éléments suivants :</p> <p>Bactéries –taille, forme (bacilles, coques, spirales, etc.), coloration de Gram (négatif ou positif) et sporulation incluant des endospores. Caractéristiques de la surface : coloration des flagelles (monotriche, amphitriche, lophotriche ou péritriche – la présence de flagelles indique également la mobilité) et capsule ou film biologique.</p> <p>Champignons et microalgues –forme et taille des cellules végétatives (par exemple, mycélium, hyphes) et organes de fructification (conidiospores, téliosspores, sporanges, etc.).</p> <p>Virus – enveloppe (présence = virus enveloppé; absence = virus nu) et forme de la capsid (polyédrique, sphérique, filamenteuse, etc.).</p>
----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

II.2.2.Les caractères physiologiques et métaboliques

Les caractères physiologiques et métaboliques sont très utiles, car elles sont directement en relation avec la nature et l'activité des enzymes microbiennes et des protéines de transport.

Ces tests comprennent: l'utilisation de sources de carbone et d'azote, différentes conditions de croissance (anaérobie ou aérobie; température optimale et gamme de température, pH optimal et gamme de pH), des conditions osmotiques préférentielles, la

production de produits de fermentation, la production d'enzymes, la production de composés antimicrobiens, de même que la sensibilité aux inhibiteurs métaboliques et aux antibiotiques. Parmi les tests reconnus, on retrouve les tests au rouge de phénol et carbo hydrate , les tests de catalase et d'oxydase, les tests d'oxydation/fermentation, les tests au rouge de méthyle, les tests de Voges-Proskauer, la réduction des nitrates, l'hydrolyse de l'amidon, ...etc.

II.2.3. Les caractéristiques écologiques

La capacité d'un microorganisme à coloniser un environnement spécifique à une valeur taxonomique. Certains microorganismes peuvent être très similaires sous beaucoup d'autre aspect, mais habiter des niches écologiques différentes, ce qui suggère qu'ils peuvent n'être pas aussi proches parents que supposé à première vue. Comme exemples les propriétés écologiques taxonomiquement importantes : la nature des relations symbiotiques, la capacité à causer une maladie chez un hôte particulier.

II.3. Les Méthodes immunologiques (sérologique)

Ces méthodes permettent de détecter les marqueurs phénotypiques (antigènes de surface) avec des anticorps ou des antisérums spécifiques aux éléments cellulaires, tels que les parois cellulaires, les capsules, les flagelles, les récepteurs, etc. Permettent de déterminer l'homologie antigénique des micro-organismes apparentés (Andreotti *et al*, 2003).

On peut dire aussi qu'elles sont basées sur la réaction d'un anticorps spécifique vis à vis d'un antigène du corps bactérien, d'un antigène soluble ou d'une toxine. Elles ont l'avantage d'être rapides et spécifiques. Elles peuvent manquer de sensibilité, on peut alors les associer à une autre méthode pour augmenter la sensibilité. Ce sont globalement des techniques coûteuses. Deux types : Méthodes direct et méthodes indirecte (Gasanov *et al*, 2005).

L'identification des sérotypes ou des sérovars est possible pour certains genres et certaines espèces. La détection de protéines spécifiques et l'activité immunologique des protéines homologues peuvent également aider à identifier un micro-organisme au niveau de la souche (Stanier *et al*, 1970).

II.3.1. Méthodes direct

II.3.1.1. Agglutination

L'agglutination permet une mesure directe de la présence bactérienne dans un échantillon. Des billes de latex colorées et recouvertes d'anticorps agglutinent l'antigène spécifique (bactéries). On observe alors la formation d'un précipité. La méthode est peu sensible mais est simple à mettre en œuvre.

Le principe des réactions d'agglutination est de co-incuber des dilutions de sérum avec des suspensions contenant le micro-organisme. C'est un phénomène complexe au cours duquel les anticorps s'unissent aux antigènes portés par la particule formant ainsi des ponts spécifiques entre les particules et permettent leur réunion en amas. On pratique cette technique sur lame, en tube ou en microplaques.

La réaction d'agglutination permet de visualiser la fixation AG-AC. Si l'antigène est placé à la surface de grosses particules (bactéries ou parasite), les AC peuvent provoquer leur agglutination. Après incubation, l'agglutination est lue à l'œil nu, on constate d'agglutination active ou passive, directe ou indirecte (figure 04) :

- Une réaction positive se caractérise par un voile formé au fond de la cupule ; -
Une réaction négative se caractérise par un point noir formé au fond de la cupule. (Sédimentation de l'antigène). (Gasanov *et al*, 2005)

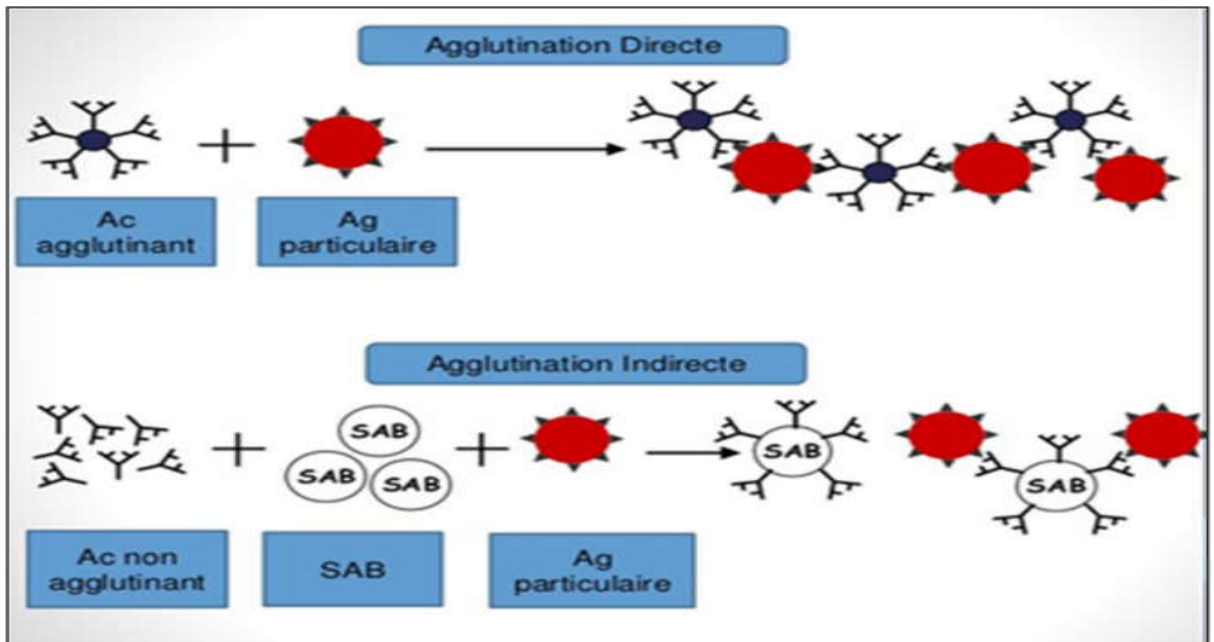


Figure 04 : technique d'agglutination (directe et indirecte) (Gruber et Durhs, 1896).

II.3.1.2.L'immuno diffusion

Utilise un appareil en forme de « L » comportant deux chambres. La chambre verticale est dite « de mobilité ». Elle contient de l'agar semi-solide inoculé avec un anticorps spécifique de la bactérie que l'on doit détecter. La chambre horizontale est dite « d'inoculation ». Elle contient un milieu sélectif enrichi et est inoculée avec l'échantillon pré enrichi par culture. Les bactéries peuvent alors migrer vers la chambre « de mobilité » et réagir avec l'anticorps pour former une ligne de précipitation. Cette méthode est utilisée, en particulier, pour la détection des salmonelles mobiles dans l'industrie alimentaire.

Les immunoglobulines ou les substances antigéniques en particulier, possèdent la propriété de diffuser dans la gélose. Il suffit donc de percer des puits disposés de façon équidistante dans la gélose contenue dans une boîte de Pétri, d'y déposer les substances à tester pour que 24 à 48 h plus tard, les substances se soient rencontrées. S'il s'avère qu'un sérum contient des anticorps (immunoglobulines) spécifiques d'une des substances antigéniques présentes, il y aura alors formation, à égale distance des deux puits concernés, d'un précipité en forme d'arc correspondant au complexe immun. (Stanier *et al*, 1970)

II.3.1.3 Immuno-précipitation

Les réactions d'immuno-précipitation utilisent des antigènes (AG) solubles qui vont réagir *in vitro* avec un anticorps (AC) possédant plusieurs sites antigéniques (au moins bivalent), pour former un réseau macromoléculaire de grande taille (figure 02).

Une macromolécule (ou molécule polymère) est une très grande molécule, qui possède une masse moléculaire relativement élevée plus le réseau macromoléculaire sera de grande taille, plus il aura tendance à précipiter. Pour cela, il existe un rapport optimal AG/AC pour lequel la taille du réseau sera maximale (zone d'équivalence). Lorsqu'un des réactifs est en large excès par rapport à l'autre, il y a un risque de redissolution de l'immuno complexe (phénomène de zone). (Gasanov *et al*, 2005)

1 - au départ, il ne se passe rien (effet zone) : pas de ponts entre les Ag par excès d'anticorps

2 - puis apparaît un trouble, un précipité : zone d'équilibre entre AG et anticorps formant réseau moléculaire responsable de l'agglutination.

3 - enfin ce trouble disparaît : dissociation du réseau par excès d'AG.

Ces interactions peuvent se traduire par une courbe de précipitation.

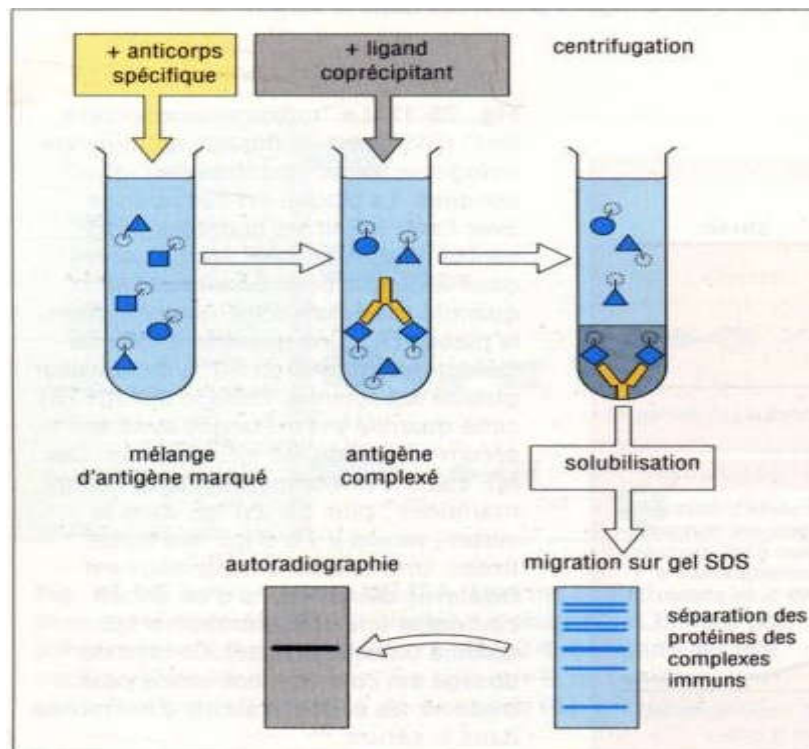


Figure 05 : les étapes de la technique d'immuno précipitation(Gasanov *et al*, 2005)

II.3.2.Mesure indirecte ou immuno dosage

II.3.2.1.Technique d'ELISA

La technique ELISA est une technique immuno enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps (figure 06).

Ag bactérien fixé au fond des puits d'une microplaque. • On dépose chaque dilution du sérum de malade dans un puits. • Après incubation et lavages, on dépose dans chaque puits une anti-Ig (Anti-IgG , ou anti-IgM) couplée à une Enzyme • Après une 2ème période d'incubation et des lavages , on rajoute un substrat dans chaque puits. • Si la présence d'AC sériques spécifiques, l'enzyme agit sur le substrat qui est hydrolysé et change de couleur (Densité optique). Ces techniques très sensibles, automatisées et permettent de différencier les classes d'Ig (IgG ,IgM , IgA)(Lise Vézina, Michel Lacroix).

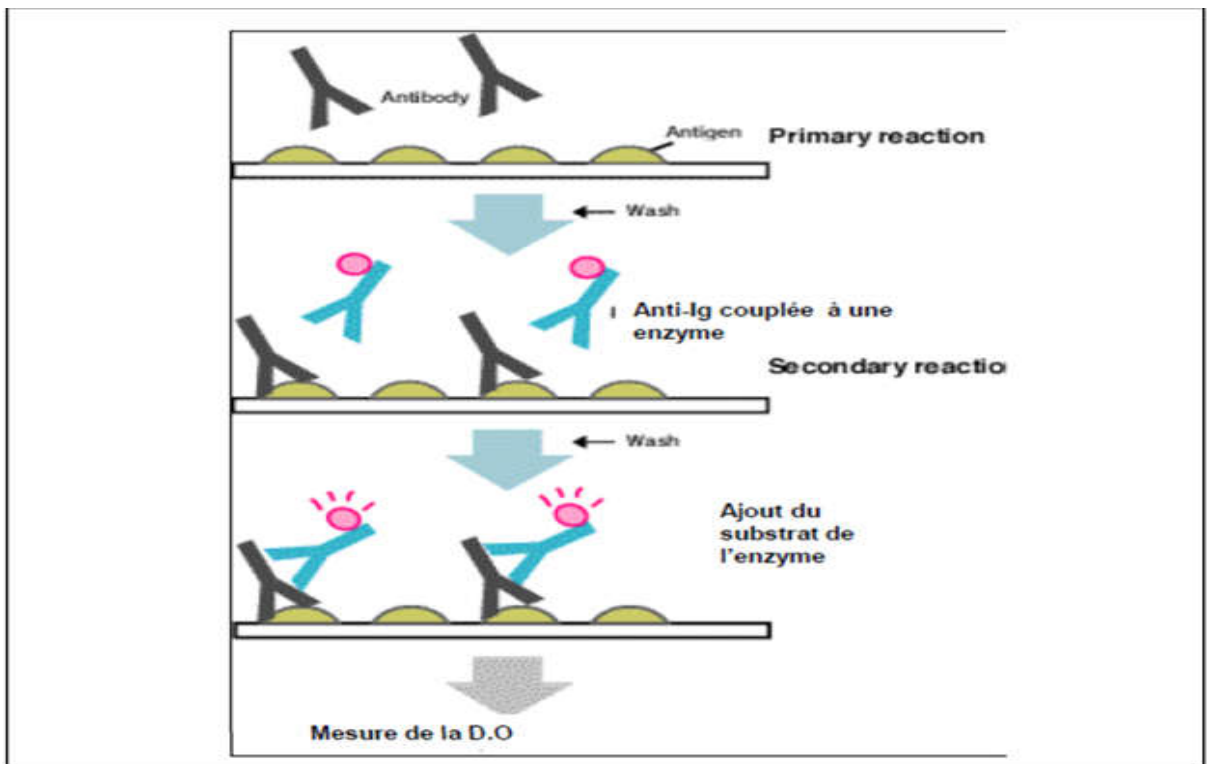


Figure 06 : Technique immuno-enzymatique. (Stanier *et al*, 1970)

II.4. Les caractéristiques moléculaires :

II.4.1. Le gène codant pour l'ARNr 16S (ADNr 16S) :

Ce gène code la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr) est essentiellement utilisé en raison de sa structure, très conservée dans toutes les bactéries. En effet, il est constitué d'une succession de domaines conservés, sites de complémentarité pour les amorces universelles utilisées pour les séquençages de ce gène, et d'autres portions de séquences propres à un groupe de bactéries, nommées séquences signatures (espèce, genre, famille).

Le choix de l'ARN 16S plutôt que 23S ou 5S est d'ordre technique (taille du gène, nombre d'informations) et, surtout, les banques de données de séquences du gène 16S sont aujourd'hui très développées. Enfin, l'identification est fiable : le résultat obtenu par séquençage du gène 16S sont similaires à ceux obtenus avec le génome entier.

il n'est pas possible de faire une quantification bactérienne, car les gènes codant l'ARNr peuvent être en plusieurs copies, le nombre de copies variant en fonction de la taille du génome et de la vitesse de croissance de la bactérie. Pour quantifier, d'autres gènes sont utilisés, présents en même nombre de copies chez toutes les bactéries (une copie généralement). D'autres gènes sont utilisés pour différencier des espèces bactériennes proches, pour lesquelles l'ARN16S n'est pas discriminant.

Ces régions hautement conservées servent de cibles pour des amorces dites "universelles" servant à l'amplification in vitro par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (figure 07) ,Puis au séquençage par la méthode de Sanger. Le choix des amorces utilisées pour la PCR est essentiel. Les amorces universelles ciblant des parties conservées de la séquence de l'ADNr 16S vont permettre d'amplifier la plupart des séquences d'ADNr 16S bactérien.

Les Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTOs) basées sur l'identification des ARNr 16S permettent de définir une catégorie proche du rang taxonomique de l'espèce si le degré d'identité est au moins de 97%. On considère ainsi que les bactéries qui présentent plus de 97% de similarité dans leurs séquences d'ADNr 16S appartiennent à la même espèce.

L'utilisation de ce gène comme biomarqueur en taxonomie a permis de révéler la biodiversité d'eucaryotes et de procaryotes dans de nombreux environnements et de pallier les limites de l'approche culturale.

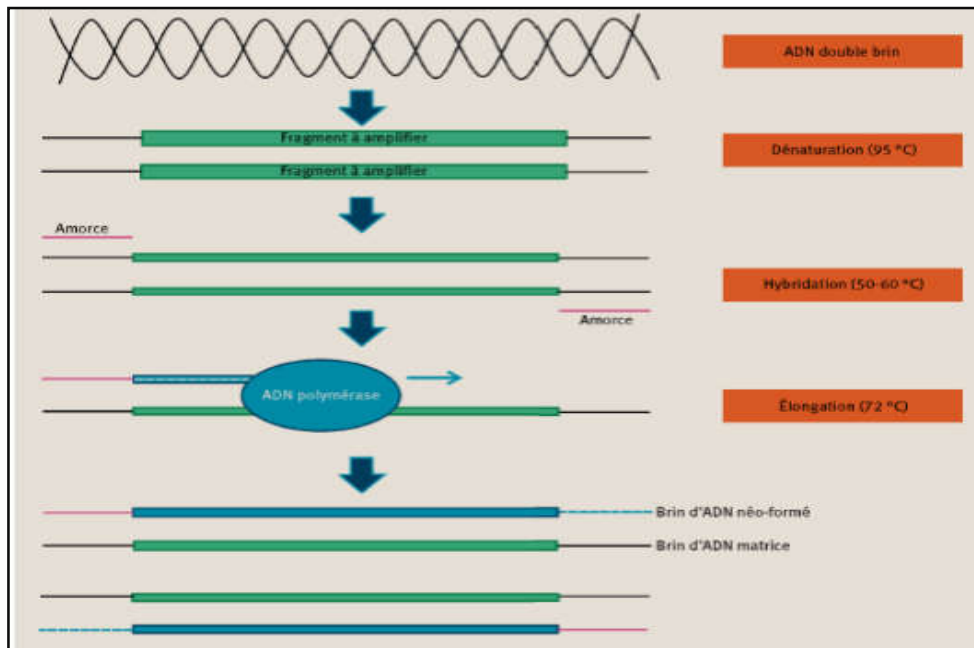


Figure 07 : Principe de la PCR. Un seul brin d'ADN est représenté pour l'étape d'élongation. (Lamoril J *et al* ,2008).

II.4.2. Le séquençage de première génération : exemple (méthode de Sanger) :

Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle-ci. Étant donné l'unicité et la spécificité de la structure de l'ADN chez chaque individu, la séquence de l'ADN permet de nombreuses applications dans le domaine de la médecine, comme, par exemple, le diagnostic, les études génétiques, l'étude de paternité, la criminologie, la compréhension de mécanismes physiopathologiques, la synthèse de médicaments, les enquêtes épidémiologique (Lamoril J *et al* ,2008).

La diffusion de la méthode de Sanger, la commercialisation d'automates utilisant des fluorophores quatre couleurs ainsi que le déploiement de la PCR dans les laboratoires ont considérablement amélioré les procédures de séquençage. La méthode de Sanger a en effet rapidement dépassé la méthode de Maxam-Gilbert pour la remplacer et reste à ce jour la principale méthode de séquençage utilisée dans les laboratoires. Son principe est le suivant. Dans un premier temps, il est nécessaire

d'amplifier l'ADN cible par PCR, puis de le dénaturer afin d'obtenir un ADN simple brin. À l'aide d'une amorce spécifique et complémentaire du brin étudié (sens ou antisens), identique ou différente de celle utilisée pour la PCR, une ADN polymérase effectue alors la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de cette amorce (Lamoril J *et al*, 2008).

De l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', cette enzyme ajoute les désoxyribonucléotides-triphosphates (dNTP) complémentaires et de manière aléatoire et inconstante des didéoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP), par exemple un ddGTP sera parfois ajouté à la place d'un dGTP. La réaction se faisant dans un seul tube, les ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP) sont marqués à l'aide de fluorophores différents pour chaque ddNTP (fluorophores « quatre couleurs »). Lorsqu'un ddNTP est incorporé à la place d'un dNTP, l'ADN polymérase ne peut plus continuer sa polymérisation. La réaction d'extension s'arrête (en effet, le didéoxynucléotide ne possède pas de groupe 3'-hydroxyle indispensable à la réaction de polymérisation de l'enzyme). Statistiquement, au cours de la réaction, pour chaque « base » de l'ADN cible, au moins une fois, un ddNTP complémentaire sera incorporé à la place d'un dNTP. Par conséquent, à la fin de la réaction, nous obtiendrons des fragments de taille différente. L'analyse de la réaction est ensuite effectuée. Différentes méthodes d'analyse sont possibles. Aujourd'hui, l'électrophorèse capillaire réalisée sur un automate de séquençage est la méthode de choix. Lors de la migration, chaque fragment (contenant un ddNTP marqué par un fluorophore) sera excité par un laser et le signal obtenu analysé par un logiciel spécifique. L'analyse informatique des signaux permet d'obtenir la séquence étudiée (Figure08) (Lamoril J *et al*, 2008).

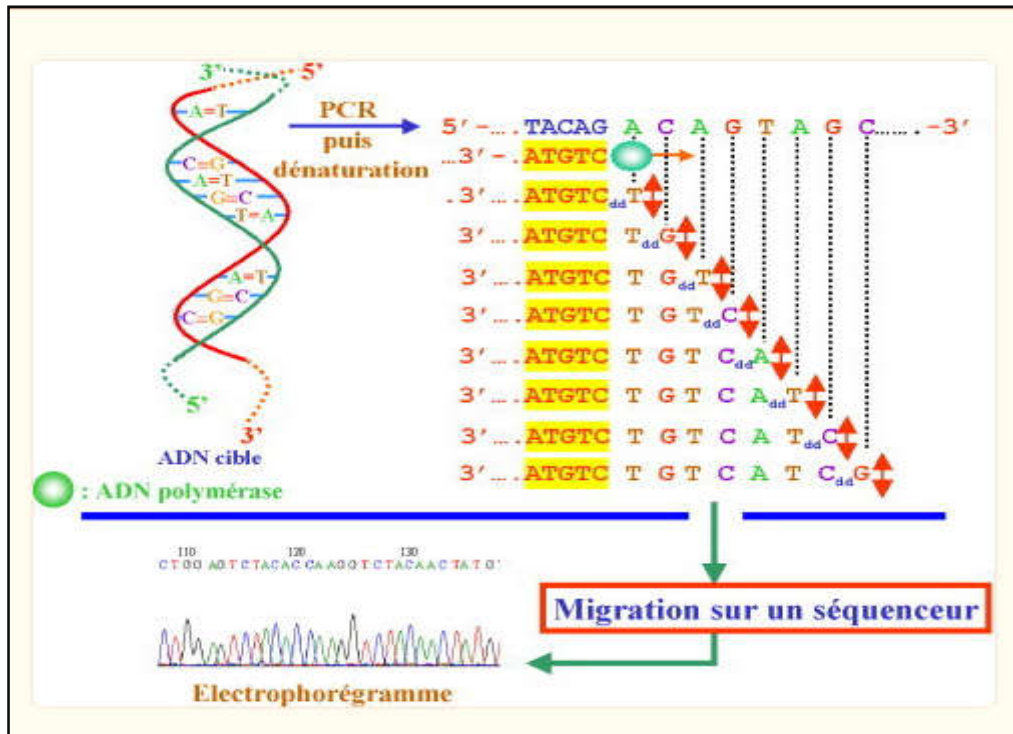


Figure 08 : le principe de technique de sanger (Lamoril J *et al*, 2008)

II.4.3. Hybridation des acides nucléiques

L'hybridation des acides nucléiques est un outil de base en génétique moléculaire. Elle repose sur la capacité des acides nucléiques simples brins, dont les séquences sont partiellement ou totalement complémentaires, à former une molécule bicaténaire (double brin) par appariements des bases les unes avec les autres (hybridation).

Un échantillon test est composé d'un mélange complexe d'acides nucléiques et d'une population de sondes bien définies de composition connue, soit en acides nucléiques soit en séquences oligo nucléotidiques. Ces deux populations sont transformées en simples brins, puis mélangées pour, à nouveau, en permettre l'hybridation (Tom Astracan et Andrew Read, 2004).

Les séquences qui avaient au préalable été appariées dans l'échantillon testait la sonde s'apparient à nouveau pour former des homo duplex (en bas à gauche et à droite). De plus, de nouveaux hétéro duplex se forment aussi entre la sonde et certaines séquences cibles ayant des séquences complémentaires ou partiellement complémentaires (en bas, au centre). Les conditions d'hybridation peuvent être ajustées pour favoriser la formation d'hétéro duplex. De cette façon, les sondes se lient de façon sélective et permettent d'identifier les acides nucléiques apparentés dans une population complexe d'acides nucléiques (Tom Astracan et Andrew Read, 2004) (Figure 09).

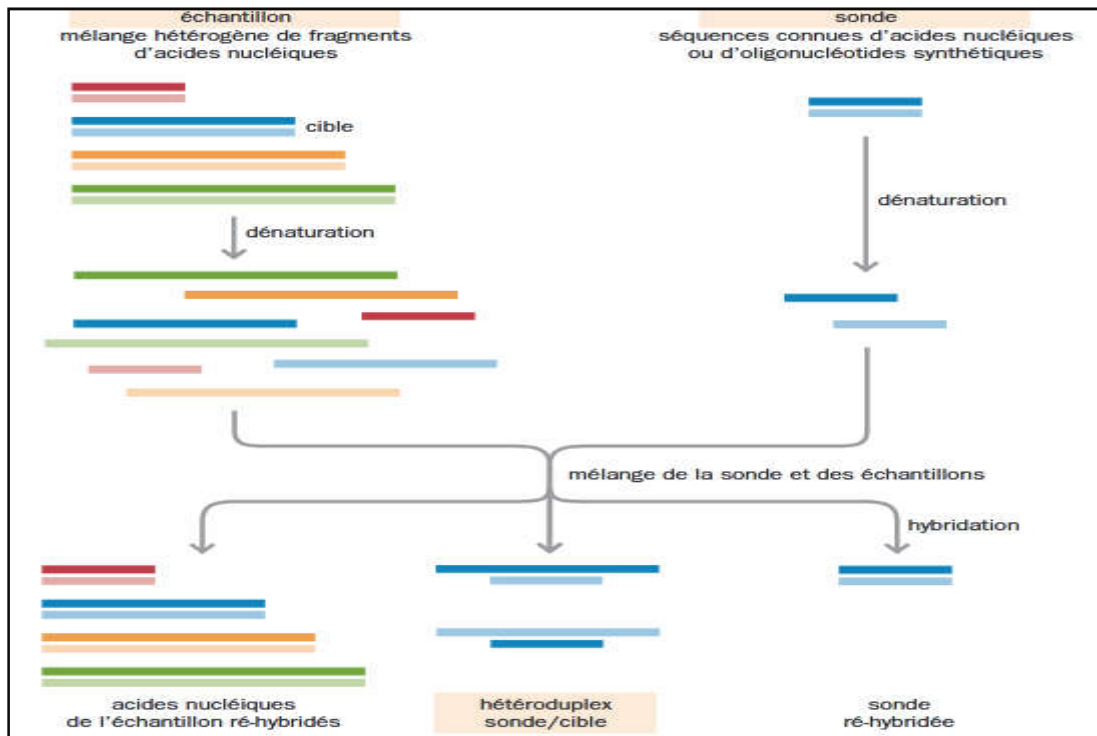


Figure 09 : Formation d'hétéroduplex son de/cible lors d'un test par hybridation d'acides nucléiques.(Tom Astracan et Andrew Read, 2004).

La culture indépendante

Les méthodes de microbiologie traditionnelles, dites pasteuriennes, ne répondent que très imparfaitement à plusieurs questions. L'identification et le dénombrement des microorganismes se font par microscopie sur des critères morphologiques ou de coloration, ou encore par des tests biochimiques après isolement et culture sur boîtes de Pétri ou en milieux liquides. Ces critères de classification ont rapidement trouvé leurs limites du fait de la diversité phénotypique et physiologique des bactéries.

Or, la très grande majorité des micro-organismes est incultivable sur ces milieux car les facteurs nécessaires à leur croissance restent inconnus. De plus, ces méthodes requièrent l'isolement du micro-organisme de son milieu naturel et de sa communauté, ce qui biaise forcément l'évaluation de ses activités. Les méthodes moléculaires, en s'affranchissant de la mise en culture, réduisent énormément les biais des méthodes pasteuriennes.

Depuis l'application des méthodes moléculaires, des méthodes de cultures indépendantes ont été développées pour étudier les communautés microbiennes de divers écosystèmes sans isolement. Au cours des 20 dernières années, plusieurs méthodes basées sur l'amplification directe, et l'analyse du gène de la petite sous-unité de l'ARN ribosomal pour étudier directement les micro-organismes de l'environnement. Cette approche, nommée métagénomique, comprend plusieurs méthodes à savoir l'électrophorèse sur gel à gradient de température/ dénaturation l'électrophorèse en gel à gradient de température, le polymorphisme de conformation à un seul brin, polymorphisme de longueur de fragment de restriction. De même, d'autres techniques, telles que les micro réseaux et l'hybridation in situ en fluorescence, ont également été adoptées.

La métagénomique consiste à analyser l'ADN génomique d'une communauté microbienne dans son ensemble. En d'autres mots, c'est une approche basée sur l'isolation directe de l'intégralité des acides nucléiques présents dans un échantillon prélevé dans un environnement donné, et ceci sans aucun isolement ou culture de microorganismes au préalable (Handelsman, 2004, Simon & Daniel, 2011). Le préfixe « méta » qui en grec veut dire littéralement « au-delà », induit une distinction majeure entre les termes « métagénomique » et « génomique », ce dernier représentant l'étude de

l'ADN génomique issu d'un seul microorganisme ou d'une cellule unique (Gilbert & Dupont, 2011).

III.1.La métagénomique

Le mot "métagénomique" a été inventé par (Handelsman *et al*, 1998) pour décrire l'étude des génomes de tous les organismes présents dans une niche environnementale donnée. Le séquençage de tous les acides nucléiques inclus dans un échantillon est à la base de cette approche. Les méthodes métagénomiques ont été utilisées pour un large éventail d'écosystèmes, permettant aux chercheurs non seulement d'identifier un grand nombre de nouveaux génotypes (Venter *et al*, 2004; Gill *et coll*, 2006; DeLong *et coll*, 2006), mais aussi pour fournir des informations sur l'abondance, la répartition des espèces et la structure des communautés (Kurokawa *et al*, 2007).

Les nouvelles techniques de séquençage ont apporté une contribution significative au développement des approches métagénomiques ces dernières années.

La métagénomique correspond à l'étude du contenu génétique d'une communauté microbienne échantillonnée dans son habitat naturel, le tout sans avoir recours à la culture.

Ces dernières années, l'utilisation de méthodes de culture indépendantes pour caractériser les communautés microbiennes a augmenté en raison de leurs avantages pratiques. Le principal avantage des méthodes de culture indépendantes est leur capacité à identifier facilement une grande proportion de la diversité bactérienne qu'il peut être difficile à observer avec des études basées sur une étude de culture dépendante.

Deux approches sont principalement utilisées (figure 10). La première approche, plus ciblée et plus utilisée, est basée sur l'amplification par PCR de la séquence complète ou partielle de l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16 S) d'un échantillon. La deuxième approche est basée sur l'extraction de l'ADN total d'un échantillon directement suivi de son séquençage.

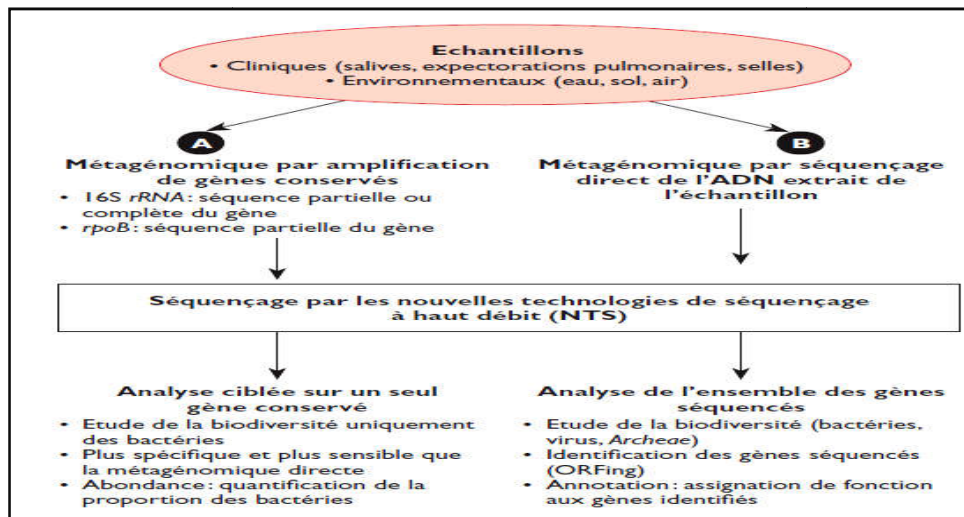


Figure 10 : Les différentes étapes et applications de la métagénomique (Gilbert & Dupont, 2011).

Suite à la prolifération du séquençage dans les années 1970 et depuis 2005, la technique a permis aux entreprises d'obtenir un débit de séquençage très rentable, dit de nouvelle génération, à des prix abordables.

La métagénomique utilise ainsi des méthodes de séquençage à haut débit ainsi que des techniques bioinformatiques afin de caractériser les structures, les fonctions et la dynamique des communautés microbiennes.

Les échantillons métagénomiques peuvent être analysés par séquençage des gènes de l'ARN ribosomal 16S, permettant de caractériser les espèces présentes dans l'échantillon (Figure 11).

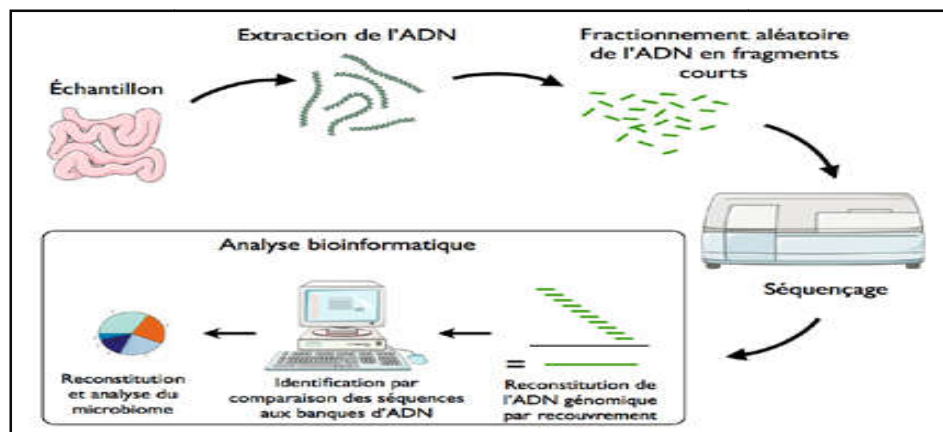


Figure 11 : L'étude du métagénome d'un milieu (Handelsman, 2004; Simon & Daniel, 2011).

III.2. Les méthodes de la culture indépendantes

III.2.1. La DGGE

La DGGE (électrophorèse sur gel à gradient dénaturant) est une technique d'empreinte moléculaire qui donne une image de la diversité des communautés microbiennes. Il permet l'évaluation et la comparaison de la diversité microbienne basée sur l'analyse moléculaire du génotype, comme TGGE, SSCP, TRFLP, qui nécessite l'amplification de gènes spécifiques par réaction en chaîne par polymérase (PCR).

La technique trouve son origine dans le domaine médical pour la élégant Diamond State mutations génétiques (Borresen *et al*, 1988) mais a rapidement été étendue à d'autres domaines scientifiques.

La méthode consiste à séparer des parts d'ADN de taille identique selon leurs propriétés de combinaison sur un gel de polyacrylamide contenant un opérateur dénaturant. Au cours d'une étape préalable de PCR, les parts d'ADN sont flanqués d'une amorce riche en GC qui permettra au part de ne pas se dénaturer totalement. Les parts ainsi obtenus sont soumis à une électrophorèse contenant un angle d'agent dénaturant (urée) qui va entraîner leur dénaturation.

III.2.2. Pyroséquençage 454

Depuis quelques années, de nouvelles techniques de séquençage sont apparues dans le monde de l'écologie microbienne, ces techniques, appelées séquençage à haut débit (HTS), également appelée séquençage de nouvelle génération NGS, forment un ensemble de méthodes utilisées depuis 2005 sont apparues qui permettent de séquencer des centaines de milliers de fragments simultanément à faible coût et en quelques heures, ce qui permet de s'affranchir du clonage et de la constitution de banques de génomes. En général, des approches systématiques, y compris la métagénomique, la méta transcriptomique, la métaprotéomique et la métabolomique, ont été développées ces dernières années pour analyser le contenu en ADN, ARN, protéines et métabolites des micro-organismes dans un écosystème. Le pyroséquençage454 est l'une de ces approches « omiques ». Des techniques qui trouvent leur application en écologie microbienne du fait de l'exhaustivité des informations obtenues. (Margulies *et al*, 2005)

La technique de pyroséquençage 454 permet d'identifier plusieurs milliers d'espèces au sein d'une population microbienne complexe (Margulies *et al*, 2005), à l'avenir la taille de ces fragments et/ou leur nombre augmentera (Hirsch *et al*, 2010).

III.2.2.1. Les étapes du pyroséquençage 454

- Le processus commence par un échantillon d'ADN double brin.
- L'ADN est décomposé en fragments d'environ 400 à 600 paires de bases à l'aide d'enzymes de restriction qui "coupent" l'ADN à des points spécifiques.
- De courtes séquences d'ADN appelées adaptateurs, sont attachés aux fragments d'ADN.
- De minuscules perles de résine sont ajoutées au mélange.
- Les séquences d'ADN sur les billes sont complémentaires aux séquences sur les adaptateurs, permettant aux fragments d'ADN de se lier directement aux billes, idéalement un fragment à chaque perle.
- Lorsque les fragments d'ADN se fixent à l'ADN sur les perles, les liaisons reliant le double brin se brisent et les brins se séparent, devenant de l'ADN simple brin.
- Les fragments d'ADN sont ensuite copiés de nombreuses fois sur chaque perle par une réaction connue sous le nom de réaction en chaîne par polymérase (PCR). Cela crée des millions de copies identiques de la séquence d'ADN.
- Les billes sont ensuite filtrées pour éliminer celles qui n'ont pas réussi à se fixer à l'ADN ou qui contiennent plus d'un type de fragment d'ADN.
- Ensuite, les perles restantes sont placées dans des puits sur une plaque de séquençage (une perle par puits) avec des perles enzymatiques qui contiennent l'ADN polymérase et l'amorce nécessaire pour la réaction de séquençage
- L'enzyme polymérase et l'amorce se fixent aux fragments d'ADN sur les billes.
- Les bases nucléotidiques sont ajoutées aux puits par vagues d'un type de base à la fois: une vague de As, suivie d'une vague de Cs, suivie de Gs, suivie de Ts.

- Lorsque chaque base est incorporée dans l'ADN, la lumière est émise et celle-ci est enregistrée par une caméra.
- L'intensité de la lumière correspond au nombre de nucléotides du même type qui ont été incorporés. Par exemple, s'il y a trois As consécutifs dans le fragment, la quantité de lumière générée serait trois fois supérieure à celle d'un seul A dans le fragment.
- En traçant ce motif d'intensité lumineuse sur un graphique, la séquence du morceau d'ADN original peut être décodée. (Margulies *et al*, 2005)

Chaque goutte (microréacteur) englobe une microbille et donc une molécule d'ADN, ce qui permet une amplification clonale de chaque fragment. L'étape suivante est la PCR en émulsion (emPCR), qui consiste à isoler les billes dans des bulles qui servent de microréacteurs. Ainsi, chaque bille sera couverte par une amplification clonale d'un seul fragment à séquencer. Après l'emPCR, des millions de séquences identiques recouvrent ainsi chaque bille. Après amplification, les microgouttelettes(microréacteurs) sont dissociées, et les microbilles porteuses de l'ADN simple brin largement amplifié sont transférées dans une plaque en fibre optique contenant 1,4 million de puits. Les puits possèdent un diamètre qui assure le dépôt d'une microbille par puits. Avec ce système, 400 000 réactions de séquençage peuvent être réalisées en parallèle. C'est au sein de chacun de ces puits que va se réaliser la réaction de pyroséquençage. Contrairement à un séquençage de type Sanger, les types de nucléotides (A, T, C, G) seront rajoutés de manière séquentielle et ce plusieurs fois de suite définissant ainsi le « flow cycle ». Après chaque ajout d'un nucléotide, un traitement par une apyrase permet d'éliminer le surplus, puis le nucléotide suivant est incorporé et ainsi de suite. La détermination de la séquence repose sur la détection d'une émission de lumière résultant de l'incorporation d'un ou plusieurs nucléotides lors de la polymérisation de l'ADN en utilisant le brin d'ADN fixé sur la bille comme matrice. Le second adaptateur est utilisé pour initier cette polymérisation. Si le nucléotide ajouté correspond à celui devant être intégré, il y a libération de pyrophosphate inorganique (PPi). Celui-ci est alors utilisé par l'ATP sulphurylase pour produire de l'ATP. La luciférase utilise cet ATP et la luciférine pour produire de l'oxyluciférine et de la lumière (Figure 12).

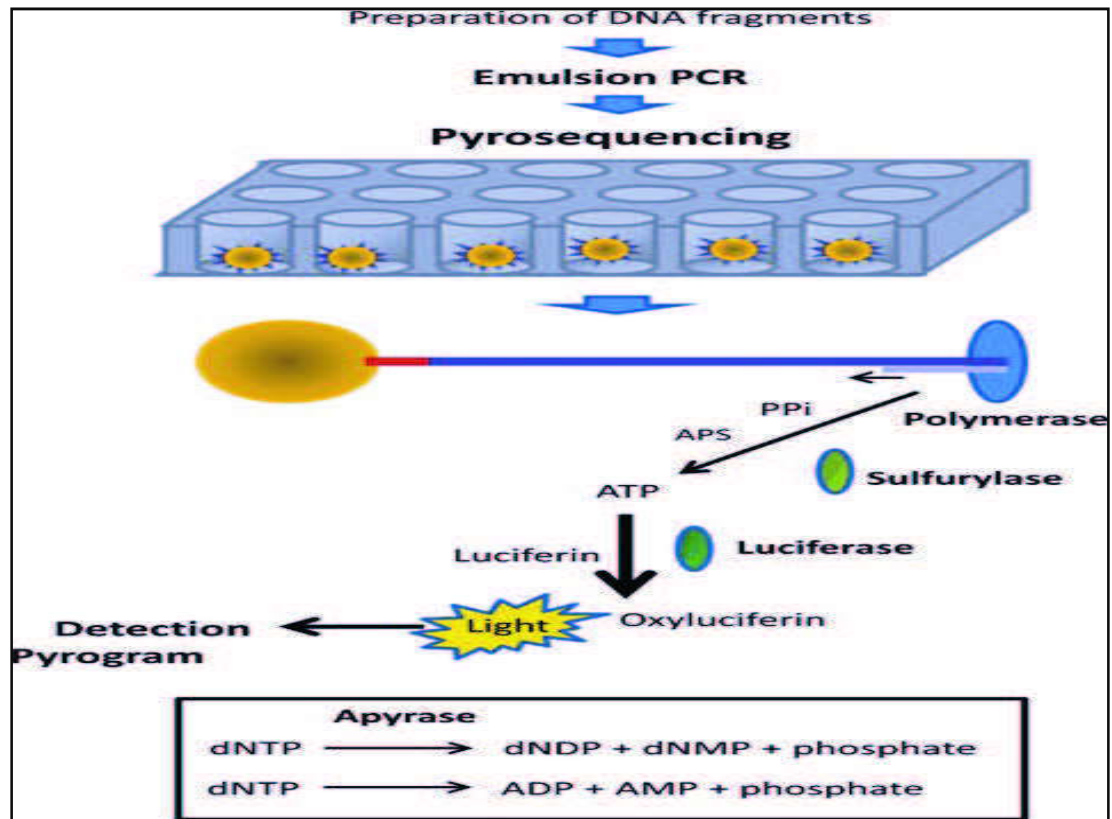


Figure 12: Résumé des principales étapes de séquençage par la technologie 454 (Siqueira *et al*, 2012).

III.2.3. SSCP

De même que DGGE / TGGE, le polymorphisme de conformation simple brin (SSCP) est une méthode d'électrophorèse adaptée à l'analyse des communautés microbiennes; cependant la séparation est basée sur l'ADN simple brin. Les structures secondaires formées avec l'ADN simple brin sont utilisées pour séparer les produits de différents phylotypes. Contrairement à la DGGE/TGGE ou à la TRFLP, dans la SSCP, ni les pinces GC ni les digestions de restriction ne sont nécessaires.

De trois bandes dues à plusieurs conformations d'un produit. Récemment, cette technique a été utilisée pour le profilage rapide des communautés microbiennes du sol et des études phylogénétiques. Une étude intéressante sur la diversité et la distribution des bactéries productrices de polyhydroxyalcanoate a adopté cette la SSCP comme approche de culture indépendante (Gasser et coll, 2009).

Cependant, au niveau de la souche, certaines incongruités entre les méthodes de la culture dépendante et de la culture indépendantes (SSCP) ont été détectées. Des approches basées sur la SSCP ont également été utilisées sur les communautés

fongiques. Par exemple Zachow et al, 2009, ont utilisé l'analyse par SSCP pour l'analyse de la biodiversité microbienne au niveau rhizosphérique.

La technique SSCP est basée sur l'analyse électrophorétique des produits PCR sous forme de fragments simple brin. On amplifie par PCR une région que l'on désire étudier et on compare la mobilité de l'ADN dénaturé portant une mutation par rapport à celle d'un fragment de référence comportant une séquence normale. Une mutation ponctuelle au sein d'une séquence modifie suffisamment la structure secondaire de l'ADN monobrin pour qu'il en résulte des changements de migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide.

Les techniques DGGE et SSCP sont concurrencées par des techniques de chromatographie liquide à haute performance avec des températures d'élution variables (DHPLC: "denaturing high pressure liquid chromatography").

III.2.4. ARISA/RISA

La méthode d'analyse automatisée des espaceurs intergéniques ribosomiaux (ARISA/RISA) vise à surveiller les changements dans la diversité microbienne, en fonction de la variation des longueurs de la région d'Espaceur Transcrit Intergénique (ITS) entre les gènes codant pour l'ARNr 16S et 23S, ainsi que 18S et 28S, pour les bactéries et les eucaryotes (en particulier les champignons), respectivement. Cette méthode a été utilisée pour comparer la structure des communautés microbiennes et estimer la richesse en espèces de plusieurs échantillons provenant de plusieurs environnements, y compris les sols. (Zanarini *et al*, 2012), ont étudié les différentes réponses des communautés microbiennes de la rhizosphère sous la disponibilité de l'azote et le génotype végétal. L'influence de ces deux variables a été déterminée par la méthode ARISA. Selon les résultats, la disponibilité de l'azote n'affectait les communautés bactériennes qu'en présence de la plante.

III.2.5.T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism)

Cette technique est basée sur le même principe que la RFLP, mis à part le fait que l'une des amorces est marquée avec un colorant fluorescent. Ceci permet seulement la détection des fragments de restriction terminaux marqués (Liu *et al*, 1997), simplifiant le profil des bandes.

Cette méthode permet l'analyse de communautés complexes en fournissant des informations sur la diversité puisqu'une bande représente une seule OTU (Tiedje, 1999).

III.3.Métagénomique : des analyses puissantes des communautés microbiennes

La métagénomique moléculaire permet d'analyser une communauté d'organismes dans son ensemble ; à ce titre, elle fournit une évaluation exhaustive d'une niche écologique complexe. Il s'agit d'une approche puissante et innovante pour caractériser les gènes et donc les fonctions biologiques d'un microbiome donné.

Contrairement aux approches ciblées (profilage) qui examinent des régions spécifiques et courtes des gènes ribosomaux, la métagénomique est basée sur le séquençage complet de l'ADN extrait d'un échantillon (séquençage shotgun).

La métagénomique nécessite une couverture de séquençage énorme par échantillon. C'est une limite pour les études de grandes cohortes, mais elle fournit des informations supplémentaires précieuses lorsqu'on établit le profil d'un sous-groupe représentatif.

La métagénomique présente de nombreux avantages :

- Suppression du biais associé aux approches PCR.
- L'analyse sans culture et le séquençage direct des micro-organismes.
- La description fonctionnelle d'un écosystème entier.

III.4.Applications

Le champ d'application de la métagénomique est vaste. Définir les caractéristiques métagénomiques des communautés microbiennes de la biosphère est une première étape essentielle pour comprendre leurs contributions à la santé de la planète, leurs rôles dans le bien-être des humains et les conséquences environnementales des activités humaines. Étant donné que l'on en sait si peu sur les communautés microbiennes, le potentiel de découverte est grand dans tout habitat choisi pour l'étude. (The New Science of Metagenomics, 2017).

La métagénomique permet une analyse exhaustive de la composition taxonomique d'une communauté d'organismes. Elle fournit des informations précises sur la diversité et les caractéristiques génétiques spécifiques de la communauté.

Outre cette analyse génétique directe des communautés microbiennes, la métagénomique peut également être utilisée pour identifier de nouvelles enzymes (biocatalyseurs) pour des applications pharmaceutiques, agricoles, industrielles et environnementales.

III.5. La métagénomique et la santé humaine

La métagénomique est une solution très bien adaptée au diagnostic, à l'évaluation de la résistance aux antibiotiques et à la détection des virus, entre autres. Elle apporte des solutions précises en oncologie, gastro-entérologie, dermatologie, urologie et pneumologie.

III.6. La métagénomique et l'environnement

Grâce à son analyse très détaillée des communautés microbiennes présentes dans l'environnement naturel, la métagénomique peut être appliquée à l'analyse de la qualité de l'eau, au développement de biocarburants et de produits agrochimiques, à l'assainissement des sols et au développement de nouvelles pratiques en agriculture et en élevage.

III.7. Limite des méthodes actuelles

La métagénomique peut être limitée par des obstacles techniques tels que la courte demi-vie de l'ARNm. Au fur et à mesure que la technologie NGS a progressé, une variété de techniques différentes ont été développées et ensuite adaptées aux approches métagénomiques. Aux premiers stades de la métagénomique microbienne, de nombreuses études ont été menées à l'aide de techniques à lecture moyenne (~800 pb) telles que le pyroséquençage (avec la plateforme Roche® 454, par exemple) (Bragg, L., Tyson, G. W, 2014). Au fil du temps, les techniques à lecture courte (par exemple, le séquençage Illumina®) ont offert une alternative plus rentable et à plus haut débit.

III.8. Comparaison de différentes méthodes de cultures indépendantes

Les procédures de la plupart des études de la diversité des communautés microbiennes utilisant des méthodes de cultures indépendantes comprenaient principalement l'échantillonnage, l'extraction de l'ADN, l'amplification du ou des fragments de gènes à partir d'échantillons environnementaux, la distinction des différents fragments, l'analyse des résultats expérimentaux, et le résumé de la communauté microbienne (figure 13).

La principale différence entre les techniques d'empreintes génomiques est l'isolement des différents fragments. Le site de séparation des produits hétérogènes est effectuée par différentes techniques de séparation électrophorétique (D/TGGE, SSCP) (Lee *et al.* 1996;Muyzer1999), avec ou sans digestion par des enzymes de restriction (RFLP, TGE, SSCP). restriction (RFLP, T-RFLP) (Laguerre *et al.*, 1994).(figure 13).

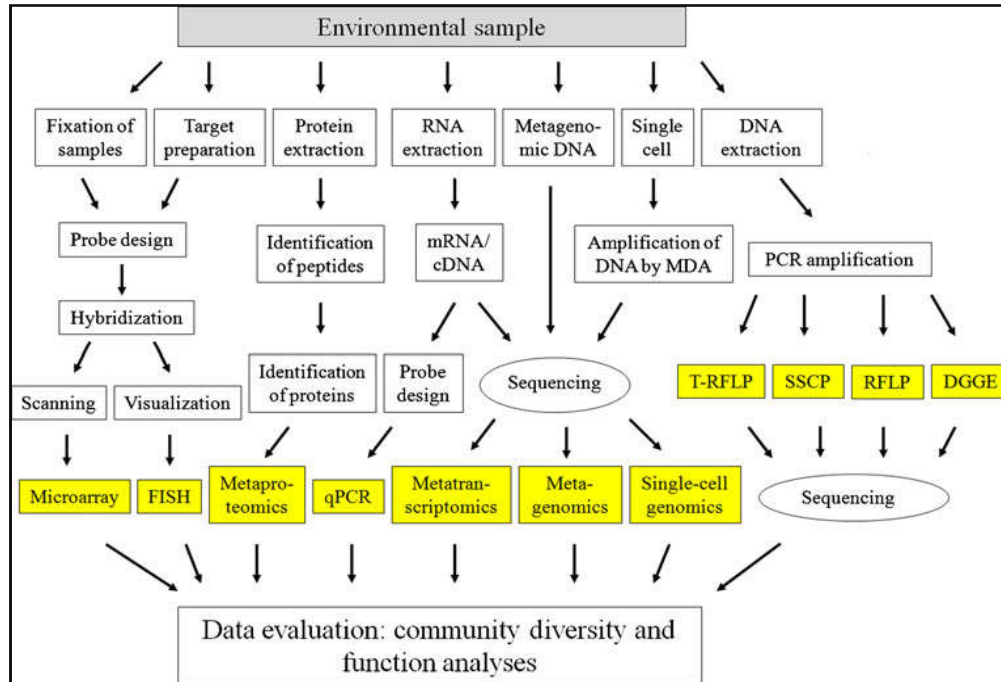


Figure 13 : Procédures expérimentale de différentes méthodes de culture indépendante. (Laguerre *et al.*, 1994).

Pour les techniques d'empreintes génomiques, il est impossible d'éviter complètement les biais de la PCR. Cependant, les puces à ADN, la FISH et la qPCR sont basées sur des sondes et des amorces oligo nucléotidiques qui ciblent les séquences d'ARN ribosomique. Oligo nucléotides et des amorces qui ciblent les séquences d'ARN ribosomique ou d'autres gènes dans différentes procédures d'hybridation. L'étape de la PCR et son biais inhérent (Bodrossy et Sessitsch, 2004). Cependant, les technologies FISH, qPCR, et microarray sont basées uniquement sur des échantillons connus et ne détecteront pas ceux qui n'ont pas de sonde correspondante connus et ne détecteront pas ceux qui n'ont pas de sondes correspondantes sur la réseau. Bien que les différentes méthodes de cultures indépendantes aient leurs propres limites, les gens peuvent réduire ce biais en prenant quelques mesures nécessaires.

Ces dernières années, de plus en plus d'études ont utilisé deux ou plusieurs méthodes de cultures indépendantes et/ou complété par une méthode de culture dépendante afin de réduire les biais causés par une seule méthode. Par exemple, les communautés bactériennes de la narine et de la paroi postérieure de l'oropharynx ont été examinées à l'aide de deux méthodes de cultures indépendantes et des modèles de distribution phylogénétique similaires ont été trouvés par l'analyse de puces à ADN et les bibliothèques de clones de gènes d'ARNr 16S , suggérant un bon accord entre ces approches de profilage (Lemon *et al*, 2003).

III.9. Application des méthodes de culture indépendantes en matrices environnementales

➤ Le Sol

Les microorganismes jouent un rôle important dans la décomposition et la transformation des substances du sol et sont impliqués dans les cycles du carbone, de l'azote et du phosphore. Les méthodes de la culture indépendante (CIM) ont été amplement appliquées entre reprocher les diversités et les communautés microbiennes pendant enflé échantillons de sol (tableau 04). (Roesch *et al*. 2007).

Ils ont montré que la composition des communautés microbiennes pouvait être robuste à la fois aux changements climatiques et aux autres changements associés à la production végétale .

Tableau 04: Méthodes et amorces utilisées pour les diversités microbiennes des échantillons du sol (Roesch *et al.*, 2007)

Samples	Methods	Primers	References
Agricultural soils, forest soil, grassland soil and wetland	Pyrosequencing	492R/787F (V9 region)	Roesch <i>et al.</i> 2007
	Cloning and sequencing	27F/1492R	Bruce <i>et al.</i> 2010
	Microarray, cloning, and sequencing	27F/1492R for bacteria, 1492R/23F for archaea	Cruz-Martínez <i>et al.</i> 2009
	RFLP	27F/1492R	Baik <i>et al.</i> 2008
	DGGE	341F/534R for bacterial 16S rDNA, U1/U2 for fungal 28S rDNA	Kim <i>et al.</i> 2011
Soil from cave	FISH, RFLP	616F/630R and 27F/1492R for bacteria, A112f/A934b as archaeal primers	Engel <i>et al.</i> 2010
	RFLP	27F/1492R for bacteria, Arch21F/1492R and Arch21F/Arch958R for archaea	Chen <i>et al.</i> 2009
Soil from Antarctic	DGGE, RFLP	341 fgc/534r, E9F/U1510R for eubacteria	Smith <i>et al.</i> 2006;
	Cloning and sequencing	amoA-1F/amoA-2R for ammonia oxidizing bacteria, 16F27N/16R1525XP for eubacteria	Shrivage <i>et al.</i> 2007
Soil from marine	DGGE, RFLP	B341F/907R for bacteria, CYA359F/CYA781R for cyanobacterium, CNF/CNR for the nifH gene, 27F/1392R for bacteria	Diez <i>et al.</i> 2007
	Real-time PCR, Cloning and sequencing	B27F/U1492R for bacteria, A8F/U1492R for archaea, pmoA189-f/mb661-r for pmoA genes	Wasmund <i>et al.</i> 2009
Soil from mine sites and hydrocarbon-polluted place	Cloning and sequencing, microarray	530F/1490R for clone library construction, 8F/1492R and Arch SD21F/1492R for PhyloChip hybridization	Rastogi <i>et al.</i> 2010b
	Cloning and sequencing	530F/1490R	Löhr <i>et al.</i> 2006
	Microarrays	63f/1392r for bacteria, Arch 21F/Arch 958R for archaea,	Rastogi <i>et al.</i> 2010a
	DGGE	341F/907R	Zhang <i>et al.</i> 2010
	DGGE	S-C-Act-235-a-S-20/S-C-Act-878-a-A-19 for Actinobacteria, nu-SSU-0817/nu-SSU-1536 and nu-SSU-0817/nu-SSU-1196 for fungi	Bjorklof <i>et al.</i> 2009

➤ **L'air et l'eau**

Comme le sol, l'air et l'eau sont importants pour l'environnement et la survie de l'homme ; les microbes présents dans l'air et l'eau sont étroitement associés à la vie des gens.

III.10. Les avantages et inconvénients des méthodes de cultures dépendantes et cultures indépendantes

Les outils moléculaires basés sur des méthodes culture indépendante présentent l'avantage d'accéder à un grand nombre des espèces présentes dans une communauté, y compris les microorganismes non cultivables. Néanmoins, cette globalité d'accès représente ainsi l'ADN total des microorganismes qui sont sous différentes formes, ceux qui sont dormant ou ne contribuent pas au système fonctionnel d'un écosystème et ne prend donc pas en considération l'activité cellulaire. Les méthodes culture dépendante malgré tous les biais qui leur sont associés, restent toujours importantes pour les études en écologie. Elles permettent l'isolement d'espèces pour la mise en

collection, leurs analyses postérieures et fournissent des informations sur le potentiel fonctionnel d'un écosystème (Ellis *et al.*, 2003).

L'application de ces deux méthodes doit donc se faire en synergie, de sorte que la complémentarité des informations générées puisse contribuer à une mieux compréhension des écosystèmes microbiens (Nichols, 2007).

CONCLUSION GENERALE

Ce travail théorique devait, par ses objectifs, évaluer les différentes de techniques de la métagénomique dans l'étude de la biodiversité microbienne tellurique.

Ainsi, la première partie de ce travail une description totale sur la flore du sol et la structure et la biodiversité du sol. Par la suite, nous avons parlé des différentes méthodes de cultures dépendantes et ses caractéristiques. Nous avons poursuivi notre étude à la culture indépendante ou la métagénomique qui est le but essentiel de notre travail théorique. Nous avons poursuivi notre étude sur les différentes techniques de l'approche métagenomiques (DGGE, SSCP , Pyroséquençage 454, ARISA et T-RFLP).

La culture dépendante elle permet d'identifier et des classier les espèces après un isolement ou perméable.

La culture indépendante est permets d'identifier et d'analyser tout une flore dans un écosystème donné .

Par conséquent, cette approche fait une analyse complète de la communauté microbienne avec des informations précises sur sa diversité ainsi que ses propriétés génétiques.

Chaque approche apporte son lot d'informations différentes et complémentaires, ce qui permet d'avoir une meilleure connaissance la diversité microbienne du sol

Le sujet n'est pas épuisé et de nouvelles recherches apporteraient d'autres informations. Une des perspectives de ce travail serait d'appliquer directement l'approche méthagénomique au laboratoire par une étude expérimentale sur un écosystème tellurique –un sol semi aride de la région de kenchela.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. Alexander, M., (1961). Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons, Inc., pp. 472
2. Ali-Haimoud A., Amir H., Bounaga D, Chami M. et Djellali N., (1980). Contribution à l'étude de l'activité microbiologique de quelques sols de la sebkha de boughzoul (Hautsplateau algérois). *Physiol. Vég.* Ghautier- Villars. Montreuil, 18 (1), 19-33.
3. Antoun, H., Prévost, D., (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Siddiqui, Z.A. (ed.). Springer, The Netherlands. pp : 16-39
4. Artiola-afaortuny J., & Fuller W.H., (1982). Adsorption of some monohydroxybenzene derivatives by soils. *Soil Science*, 133: 218-227
5. Atlas R., Bartha R., 1992. *Microbial ecology. Fundamentals and applications*. 3rd edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company. San Francisco. California (USA). 563.
6. Boukarabila Mustapha., (2017). L'effet du substrat sur le développement de quelque insecte ; Diplôme de master en Agronomie : Amélioration végétale. Université de Tlemcen.
7. Boulard ou B., Moreau J., (1962). *Sol, microflore et végétation*. édition Masson., Paris, 289P.
8. Calvet R., (2003). *Le Sol, Propriété Et Fonction, Phénomènes Physiques Et Chimiques*. Tome 2. Ed. France. Agricole, 511 P
9. Clark F.E., (1969). *Association Ecologiques Entre Microorganismes Du Sol*. *Biologie Des Sols (Comptes Rendus De Recherches) UNESCO*, Paris : 125-153.
10. Dagadi., (2011). *Cours D'agriculture Durable, G2 Isdr/GI*.
11. Davet P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétale*. Quae, 384p
12. Dommergues Y et Mangenot F., (1970)- *Ecologie microbienne du sol*. Masson et Cie Editeurs, Paris, 796 p.
13. Ellis et al., (2003) , *Cultivation-dependent and-independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil* *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (2003), pp. 3223-3230
14. Gasanov, U; Hughes, D. and Hansbro, P.M (2005). *Methods for the isolation and identification of Listeria spp. and Listeria monocytogenes: A review*. *FEMS Microbiol. Rev*, 29: 851- 875.

15. Gasser et col (2009), Molecular tools—advances, opportunities and prospects. *Vet Parasitol* 36:69–89
16. GAUCHER D ., ERIKSON A., (1986).Norrbottnian type (3). Neuropaediatric andneurobiological aspects of clinical patterns and treat net ,actapaediatr. Scand. Supple,326,1
17. Gilbert & Dupont (2011) *Microbial Metagenomics: Beyond the Genome*
18. Gobat J M., Argno M Et Mathey W., (2010). *Le Sol Vivant Bases De Pédologie– Biologie Des Sols* (3eme Ed., Vol.1).Italie :Revu Et Augmentée Page 51-60.
19. Gobat J. M., M. Aragno, W. Matthey., (1998). *Le Sol Vivant. Bases De Pédologie Biologie Des Sols*. Presses Polytechniques Et Universitaires Romandes, Lausanne.
20. Gruber M., Durhs HE. Eine neue Methode zur raschen Erkennung des Choleravibrio und des Typhusbacillus. *MUnch. med. Wochschr*, 1896; 43: 285-286.
21. HATTORI T. (1973) – *Microbial life in soil: an introduction*, Dekker, New-York, 427 pp.
22. Hirsch, et al(2010). Pb2+: an endocrine disruptor in *Drosophila*
23. Hoorman, J. J. et R. Islam. 2010. Unders ting soil microbes and nutrient recycling.FACT SHEET. Agriculture and Natural Resources.The Ohio State University,pp.1-5.
24. Hugenholtz P., (2002), Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* 3(2) Jan Kjølhed Vester · Mikkel Andreas Glaring, 2014.An exceptionally cold-adapted alpha-amylase from a metagenomic library of a cold and alkaline environment.,5931-0 Philip Hugenholtz.,2002.,Exploring prokaryotic diversity in the genomic era.,reviews0003.1
25. Jan Kjølhed Vester 1 , Mikkel Andreas Glaring, Peter Stougaard.(2014). An exceptionally cold-adapted alpha-amylase from a metagenomic library of a cold and alkaline environment. *99(2):717-27*.
26. KARABI M., HAMDY AISSA B., ZENKHRI S, KEMASSI A., BOURAS N.,(2015).Seasonal variations affect microbiocenose arid soils in the ouargla basin (AlgerianSahara). *Ciênciaetécnicavitivinicola*, Vol. 30 ,n. 8, p :176-187.
27. Laguerre, G., M. Allard, F. Revoy, and N. Amarger. (1994). Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:56–63.

28. Lamoril J., Amezian N., Ameziane Jean-Charles, Deybach P., Bouizegarène (2008). Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. 23(5):260-279.
29. LIU et al (1997), Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA
30. Margulies, et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature, 437, 376-380.
31. Martínez-Viveros, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G., Mora, M.L., 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 10, 293-319.
32. Morel., (1989). Les sols cultivés. Tech et doc. La voisier, Paris, 272p.
33. Mulder E.G., Lie T.A., Wolddendrop J.W., (1969). Biologie et fertilité du sol. biologie des sols (comptes rendus de recherches). UNESCO. Paris. P165-214.
34. Noumeur, S. (2008). Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna). Mémoire de magister, Université Mentouri, Constantine, 74 p.
35. Patrick Tshikhudo, Livhuwani Ronald Nnzeru, Khayaletu Ntushelo, Fhatuwani Nixwell Mudau, (2013). Bacterial species identification getting easier. 12(41):5975-5982.
36. Paul, E.A. & Clark, F.E. (1996). Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego, USA.
37. Quénéa K., (2004). Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (CESTAS, Sud ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).
38. Roesch LF, Fulthorpe RR, Riva A, et al. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. Isme J. 1: 283-290.
39. Roget P., Garcia J.L. (2001). Introduction à La Microbiologie Du Sol. Marseille : Université de Provence. PP 193.
40. Sasson A., (1967). Recherches éco-physiologique sur la flore bactérienne de sol des régions du Maroc. Série botanique et biologie végétale. Travaux de l'institut scientifique marocain et de faculté des sciences, rabat, N°30:27-55.
41. Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K. et Puschenreiter, M. (2013) The role of plant-associated bacteria in the mobilization

- and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 60: 182-194
42. Setia, R., and Hans Raj, K. (2012). "Quantum inspired evolutionary algorithm for optimization of hot extrusion process". *International Journal of Soft Computing and Engineering*. Vol. 2(5). ISSN: 2231-2307.
43. Simon C, Daniel R. Metagenomic analyses: past and future trends. *Appl Environ Microbiol.* (2011);77(4):1153–1161. doi: 10.1128/AEM.02345-10.
44. Siqueira et al (2012) Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009; 88: 969-981
45. Soltner D., (1992). *Les Bases De La Production Végétale. Tome 1 : Le Sol.* Collection Sciences Et Techniques Agricoles, 19^e Edition, Sainte Gemmes Sur Loire.
46. Soulas, G., Codaccioni, P. et Fournier, J.C., 1983. Effect of crosstreatment on the subsequent breakdown of 2,4-D, MCPA and 2,4,5-T in the soil. Behaviour of the degrading microbial populations. *Chemosphere*, 12 (7/8): 1101-1106.
47. Stanier R.Y., Palleroni N.J et Doudoroff M. (1966). The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. *Jornal of General Microbiology*. 43: 159-271.
48. *The New Science of Metagenomics (2017), Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*
49. Veenj.A.V., Kuikman P J., (1990). Soil structural aspects of decomposition of organic-matter by micro-organism. *Biogeochemistry* 11, 213–233.

