

Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes

HUYBENS N.¹, MAINIL J. ² ET MARLIER D. ¹

¹ Clinique Aviaire, des Rongeurs et des Lagomorphes, Département clinique des Animaux de compagnies et des Équidés, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, bâtiment B42, 4000 Liège, Belgique

² Secteur de bactériologie, Département des Maladies infectieuses, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, bâtiment B42, 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Dr N. Huybens Email : nathalie.huybens@ulg.ac.be

RÉSUMÉ : Aujourd'hui, il est certain que les techniques de culture bactérienne traditionnelles ne suffisent pas pour étudier les populations bactériennes complexes. Depuis une vingtaine d'années, une quantité importante d'études ont démontré que la plupart des espèces ne sont pas cultivables sur des milieux traditionnels et dans un même temps, ont approuvé l'utilisation de la biologie moléculaire pour l'étude de ces populations complexes, qu'elles soient digestives, aquatiques, des sols... Ces techniques sont nombreuses mais comprennent en général un canevas semblable. Tout d'abord, l'ADN doit être extrait, puis amplifié, parfois traité et enfin visualisé ou séquencé. Cette revue donne un aperçu des techniques les plus communément employées dans l'étude des populations ainsi que les points importants à considérer avant de choisir la ou les techniques les plus appropriées.

1. INTRODUCTION

Depuis une vingtaine d'années, les populations bactériennes 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 (Nocker *et al.*, 2007). Par exemple, seulement 0,01 à 0,1 % des cellules bactériennes océaniques permettent d'obtenir une colonie sur des milieux de laboratoire (Connon et Giovannoni, 2002 ; Sharkey *et al.*, 2004) ; un gramme de sol contient 10^{10} bactéries dont seulement 0,1 % à 1 % peuvent être cultivées (Torsvik *et al.*, 1998 ; Kirk *et al.*, 2004) et parmi les 10^{12} bactéries contenues dans un gramme de matières fécales seulement 20 % à 40 % peuvent être cultivées (Macfarlane *et al.*, 2004 ; Suchodolski *et al.*, 2004). En outre, les bactéries isolées sur milieux de culture subis-

sent une pression de sélection forte de la part des espèces à grande vitesse de répllication et des nutriments présents en trop grande ou trop faible quantité (Nocker *et al.*, 2007).

D'après Cases et de Lorenzo (2002), seuls 0,5 à 10 % de toutes les espèces bactériennes existantes ont été identifiés, un grand nombre d'espèces n'étant connu que par une séquence génomique. Par ailleurs, certaines bactéries identifiées depuis des décennies ne sont toujours pas cultivables comme *Treponema pallidum*, bactérie responsable de la syphilis, identifiée depuis 1905 ou *Mycobacterium leprae*, responsable de la lèpre et identifiée depuis 1893 (Siqueira et Rocas, 2005).

Norman Pace et collaborateurs (Lane *et al.*, 1985 ; Stahl *et al.*, 1985 ; Olsen *et al.*, 1986) sont les premiers à avoir appliqué les techniques de biologie moléculaire à l'étude de la biodiversité. Récemment, les techniques d'amplification et d'étude de l'ADN

des populations bactériennes ont fait l'objet de nombreuses publications dans des domaines très variés, de la recherche fondamentale des populations aquatiques (Dorigo, 2005) ou du sol (Brim *et al.*, 1999) à la fabrication du vin (Gonzalez *et al.*, 2005) en passant par l'étude des bioréacteurs en écologie (Manz, 1994 ; Wang *et al.*, 2007) ou de la flore digestive humaine physiologique (Macfarlane *et al.*, 2004 ; Bezirtoglou *et al.*, 2006 ; Gueimonde *et al.*, 2007) ou pathologique (Hertogh *et al.*, 2006). Ces techniques sont également utilisées dans des domaines vétérinaires tels que l'étude des flores digestives (Abecia *et al.*, 2005 ; Michelland *et al.*, 2008) ou le contrôle sanitaire des denrées alimentaires d'origine animale (Brennan *et al.*, 2002).

Il existe un grand nombre de techniques, permettant l'étude moléculaire d'une population bactérienne. Ces outils peuvent servir pour comparer,

caractériser des populations ou mettre en évidence certains genres, espèces ou souches dans un échantillon. Cet article expose une série de techniques fréquemment employées dans l'étude des populations bactériennes.

2. EXTRACTION DU MATÉRIEL GÉNÉTIQUE

Avant toute chose, l'ADN bactérien doit être extrait de la matrice de départ. Les méthodes d'extraction les plus utilisées font appel à trois étapes : une lyse par un détergent, une incubation avec une protéase et la précipitation des acides nucléiques (Meade *et al.*, 1982). La technique d'extraction d'ADN bactérien la plus simple est un traitement thermique. Les cultures bactériennes sont plongées pendant 5 minutes dans un bain marie à 96°C. Cette technique suffit pour extraire l'ADN des cellules mais n'élimine pas les composés inhibiteurs des réactions d'amplification ; elle convient donc très bien pour des cultures pures mais pas pour des échantillons de terrains (Sweeney *et al.*, 2006). En plus des différents protocoles mis au point, il existe des kits commerciaux pour l'extraction d'ADN. Deux techniques sont communément employées ; le passage sur colonnes de silice (Boom *et al.*, 2000) ou l'utilisation de billes magnétiques (Alderton *et al.*, 1992). Dans les deux cas, le principe est le même, l'ADN est lié à la membrane de la colonne ou aux billes magnétiques et l'échantillon est débarrassé des différents contaminants. Ensuite, l'ADN est séparé de son support.

Ces différentes méthodes permettent l'extraction d'une quantité et d'une qualité variable d'ADN (Maarit Niemi *et al.*, 2001). Il est évident que l'ADN de toutes les espèces bactériennes, gram+ et gram-, présentes dans un échantillon ne peut être extrait avec la même efficacité (Carroll *et al.*, 2000 ; Sharma *et al.*, 2007). Un premier biais existe donc dès cette étape. De nombreux articles de comparaison de méthodes d'extractions (Maarit Niemi *et al.*, 2001 ; Schuurman *et al.*, 2007 ; Whitehouse et Hottel, 2007) ont été publiés. Le premier critère est toujours de choisir la méthode d'extraction en fonction de l'origine des prélèvements. Par exemple, les matières fécales contiennent énormément d'inhibiteurs des réactions d'amplification (Duenngai *et al.*, 2008). Des

résultats très variables sont remarqués lors de tests comparatifs entre les kits commerciaux et les techniques internes aux différents laboratoires (Schuurman *et al.*, 2007 ; Duenngai *et al.*, 2008). De même, les échantillons provenant de sols contiennent également des inhibiteurs de PCR (Kirk *et al.*, 2004), en particulier l'acide humique (Dong *et al.*, 2006) et les métaux lourds (Wilson, 1997). Différents kits et techniques sont décrits et comparés dans la littérature (Maarit Niemi *et al.*, 2001 ; Kirk *et al.*, 2004 ; Dong *et al.*, 2006 ; Rosa *et al.*, 2006 ; Whitehouse et Hottel, 2007). Enfin des techniques très complexes peuvent être créées pour s'adapter au mieux à la source d'ADN. Par exemple, les prélèvements d'origine volcanique demandent un traitement particulier d'ultrasons, de broyage, congélation et décongélation. Ils ont récemment fait l'objet d'un article de synthèse (Herrera et Cockell, 2007).

D'autres éléments à prendre en compte lors du choix de la technique d'extraction est le temps nécessaire à la manipulation et le coût de revient de chaque extraction. Les techniques commerciales reviennent toujours plus cher (Zhang *et al.*, 2006) mais, à l'exception du traitement thermique, demandent moins de temps (Schuurman *et al.*, 2007).

3. AMPLIFICATION DU MATÉRIEL GÉNÉTIQUE PAR POLYMÉRISATION EN CHAÎNE

a. Principes généraux de la polymérisation en chaîne

La quantité d'ADN récupéré lors de l'extraction est trop faible pour être considérée comme un échantillonnage représentatif. Afin de comparer ou d'étudier l'ADN extrait, celui-ci doit donc être amplifié par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cette technique a été mise au point en 1986 par Mullis et collaborateurs (1986) ce qui lui valut le prix Nobel de chimie en 1993. La PCR a révolutionné la biologie moléculaire comme peuvent le montrer les 247 920 articles publiés depuis sa découverte (PubMed, février 2009). Une vingtaine de cycles permettent de multiplier le nombre de molécules d'ADN présentes par un million (Lalam, 2006).

La PCR quantitative (*real-time* PCR ou Q-PCR) ainsi que la PCR semi-

quantitative peuvent être employées pour quantifier la présence d'une espèce ou d'une population bactérienne spécifique. Un gène cible est amplifié par Q-PCR. En connaissant le nombre de copies rencontrées dans le génome bactérien, le nombre de bactéries porteuses de ce gène présentes dans l'échantillon de départ peu alors être estimé. Le choix du gène permet de quantifier l'ensemble de la population, une famille ou une espèce bactérienne présente dans l'échantillon (Sharma *et al.*, 2007).

L'ADN est très stable dans le milieu contrairement à l'ARN. L'étude de ce dernier est donc plus intéressante si la viabilité d'une population bactérienne est l'objet des recherches (van der Vliet *et al.*, 1994). Les recherches peuvent cibler aussi bien l'ARN messager (ARNm) que ribosomal (ARNr) (Lahtinen *et al.*, 2008). La quantité et le type d'ARN présents sont relatifs à l'activité et à la croissance bactérienne (McClelland et Welsh, 1994 ; Sorensen et Teske, 2006 ; Hoshino et Matsumoto, 2007).

La *reverse transcriptase* (RT) permet la création à partir de l'ARN d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) (Freeman *et al.*, 1999) qui peut ensuite être amplifié par une PCR classique. Ces deux réactions peuvent être réalisées en une ou deux étapes (Sharkey *et al.*, 2004). La RT-PCR permet donc la comparaison de la composition, de la viabilité ou de l'activité de populations bactériennes. Récemment, Halet et collaborateurs (2006) ont étudié l'évolution de l'activité méthanotrophique d'une flore bactérienne de compost grâce à l'ARNr.

Ces amplifications ne sont pas sans conséquence sur la représentativité des espèces présentes dans l'échantillon. En effet, les effets stochastiques des premiers cycles de la PCR peuvent entraîner de grandes différences entre les séquences présentes en faible quantité dans l'échantillon (Peccoud et Jacob, 1996), tandis que l'effet plateau diminue la représentation finale des séquences présentes en grandes quantités dans l'échantillon. Ce dernier effet est expliqué notamment par le ré-appariement des deux brins entre eux lors des derniers cycles (Mathieu-Daude *et al.*, 1996). Ces biais sont présents dans toutes les études par PCR. Afin de les contourner, un nombre variable de cycles peut être comparé ou les PCR peuvent être réalisées en triple puis regroupées pour les analyses.

Enfin, les amorces utilisées lors des PCR sont aussi une source de biais. Comme l'ont démontré Yu et collaborateurs (2004), le choix des séquences étudiées et des amorces différentes utilisées pour des séquences identiques donnent des profils parfois très différents pour une même population.

b. Les polymérisation en chaîne ciblant les ARN ribosomiaux

Les PCR présentées plus haut, qu'elles soient aléatoires ou ciblant les REP, ne permettent pas toujours d'identifier l'espèce dont l'ADN a été amplifié, à l'inverse des gènes présentés dans ce chapitre, les gènes des ARN ribosomiaux. Ces derniers ont été et sont toujours fortement étudiés aussi bien en systématique que dans l'étude de populations. C'est la présence de zones très conservées et de zones hypervariables qui rend ces gènes très intéressants dans l'étude de populations.

Le ribosome bactérien est constitué de 2 sous unités : 50S et 30S (figure 1). La sous-unité 30S est constituée d'un ARN ribosomal, le 16S et d'une vingtaine protéines, tandis que la sous unité 50S est composée de deux ARN

ribosomiaux le 23S et le 5S et d'une trentaine de protéines (Noller, 1984 ; Moore et Steitz, 2003). Les gènes codant pour ces trois ARN ribosomiaux sont appelés respectivement 16SrDNA, 23SrDNA et 5SrDNA. Ces trois gènes, très conservés au sein de toutes les eubactéries sont situés sur le même opéron au sein du génome bactérien. En fonction des espèces bactériennes, ils sont séparés par des zones plus ou moins longues, codantes ou non, que l'on appelle les *Internally Transcribed Spacer* (ITS) (Jensen *et al.*, 1993).

i. 16SrDNA

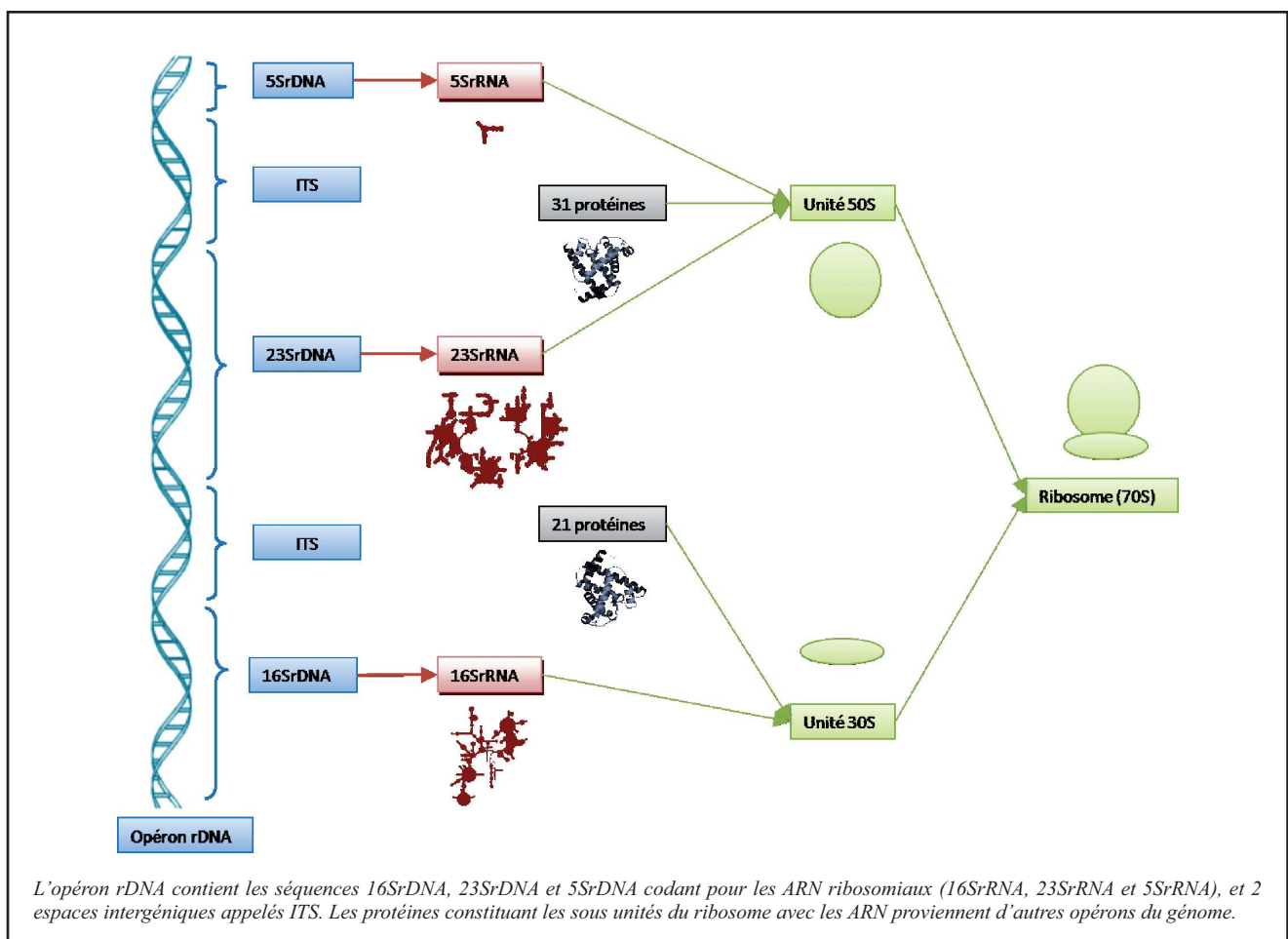
Le gène 16SrDNA est composé de régions conservées permettant l'appariement d'amorces « universelles » et de 9 zones hypervariables (de V1 à V9) (Baker *et al.*, 2003) permettant la distinction de l'espèce (Van de Peer *et al.*, 1996). La séquence du 16SrDNA est utilisée pour clarifier la taxonomie de certains taxons (McInerney *et al.*, 1995). Une banque de données, le *Ribosomal Database Project* lui est presque entièrement dédiée (Cole *et al.*, 2007). Le gène 16SrDNA est de loin le gène le plus employé dans l'étude

de population bactérienne (Wang *et al.*, 2007). Certaines bactéries ne sont connues que par la séquence de leur gène 16S. Rösch et collaborateurs (2006) utilisent alors le terme ribotype au lieu d'espèce ou souche.

Un inconvénient à l'utilisation du gène 16S est son nombre variable de copies. En effet, certaines espèces peuvent posséder entre 1 et 15 opérons ribosomiques dans leur génome (Fogel *et al.*, 1999), ce qui ne permet pas une étude quantitative des espèces présentes dans la flore.

Un grand nombre de séquences différentes d'amorces ciblant le gène 16S a été publié. Elles peuvent être universelles (Baker *et al.*, 2003) ou spécifiques comme par exemple les amorces pour *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes* (Blackwood *et al.*, 2005), ou encore pour les cyanobactéries (Boutte *et al.*, 2006). Les connaissances dans ce domaine étant en évolution exponentielle, de moins en moins d'amorces sont encore qualifiées d'universelles (Baker *et al.*, 2003).

Figure 1 : composition du ribosome procaryote et opéron rDNA



ii. 23SrDNA

Le gène 23SrDNA est l'homologue du 16S pour la grande sous unité du ribosome. Il contient également des régions conservées et variables mais sa séquence générale est plus variable que celle du 16S (Van de Peer *et al.*, 1996). Les résultats obtenus avec le gène 23S sont similaires à ceux obtenus avec le 16S (Hopfl *et al.*, 1989).

iii. Les espaces intergéniques de l'ADN ribosomal (ITS)

Beaucoup plus utilisés que le 23SrDNA, les espaces intergéniques de l'ADN ribosomal (*Internally Transcribed Spacer* ou ITS) sont des séquences très variables en taille et en composition dans l'opéron des trois ARNr (16S, 23S, 5S). Le premier et le plus utilisé est présent entre l'extrémité 3' du 16SrDNA et l'extrémité 5' du 23SrDNA (Gonzalez *et al.*, 2003). Sa taille varie de 400 à 1600 pb (Fisher et Triplett, 1999). Il peut contenir des séquences codantes pour des ARN de transfert ou aucune séquence codante (Boyer *et al.*, 2001). Les régions conservées du gène 16S et 23S l'entourant permettent l'appariement des amorces universelles ou plus spécifiques et donc l'amplification de l'ITS.

Tout comme le 16SrDNA, l'ITS peut être présent en multiples copies dans un même génome (Sadeghifard *et al.*, 2006) mais également variable d'une copie à l'autre sur le chromosome (Nagpal *et al.*, 1998). L'analyse de l'espace intergénique de l'ADN ribosomal (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* ou RISA) est le nom donné à l'étude par PCR puis électrophorèse de l'ITS (Nocker *et al.*, 2007).

c. Les autres gènes d'intérêt dans l'étude de populations

D'autres gènes peuvent être la cible de PCR dans le cadre d'étude de population. La plupart sont composés de zones conservées et de zones variables. Le gène *rpoC1* (RNA polymérase C1) par exemple, n'existe qu'en une seule copie dans le génome bactérien (Bergsland et Haselkorn, 1991). Ceci permet une quantification des espèces présentes plus fidèle que celle obtenue en utilisant le gène 16SrDNA (Jameison *et al.*, 2007). *RpoC1* est également employé dans la génétique eucaryote car il est présent dans l'ADN des chloroplastes (Fritsch, 2001).

D'autres gènes potentiellement intéressants pour l'étude des populations

bactériennes sont par exemple le gène *NifH* (nitrogénase réductase), très conservé chez beaucoup d'organismes mais pas présent dans toutes les espèces (Rösch *et al.*, 2006), le gène de la citrate synthétase (*gltA*) (Birtles et Raoult, 1996), ou celui de la riboflavine synthétase (Bereswill *et al.*, 1999).

d. Les polymérisations en chaîne aléatoires

Comme dit plus haut, l'amplification est nécessaire pour travailler sur l'ADN ou l'ARN. Il ne faut pas perdre de vue que les cibles des PCR doivent permettre de représenter toutes les espèces présentes dans un échantillon dans le cadre d'une étude de population. Une série de techniques utilisant des amorces s'hybridant très facilement dans tous les génomes permet donc d'amplifier des zones inconnues. Ces amorces sont souvent de faible taille.

i. L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou RAPD) est une technique qui a été développée par Williams (1990) afin de construire des cartes génétiques. Le principe consiste à utiliser des amorces d'environ 10 paires de bases avec des températures d'appariement basses, 36°C (Williams, 1990) à 45°C (Pravin *et al.*, 2007). Des appariements plus ou moins spécifiques ou des mésappariements permettent l'amplification d'une série de fragments de tailles différentes. Les fragments obtenus dépendent de l'appariement des amorces et de la distance entre ces appariements (De Wolf *et al.*, 2004).

Le peu de matériel nécessaire à la RAPD en fait une technique de base particulièrement intéressante pour observer des variations de population (Atienzar et Jha, 2006) même si la faible reproductibilité entre laboratoires est un sujet fréquent de critiques (Savelkoul *et al.*, 1999). La présence d'artefacts a souvent été décrite, présence d'amplification dans le témoin négatif (Mullis, 1991) et variation entre analyses d'un même échantillon (Ellsworth *et al.*, 1993). Afin de contrôler les résultats obtenus, il convient de multiplier les essais en variant la quantité d'ADN de départ (Atienzar et Jha, 2006). En utilisant une concentration d'ADN suffisante sans être trop élevée (entre 10 et 100ng) et en standardisant

au maximum le matériel comme la méthode (même polymérase, même cycleur, même manipulateur...), la reproductibilité de la manipulation peut être fortement améliorée (Fraga *et al.*, 2005).

Bien que cette technique soit le plus souvent employée dans des études d'écotoxicologie (De Wolf *et al.*, 2004 ; Atienzar et Jha, 2006), elle a été employée récemment pour comparer les flores des bioréacteurs (Pravin *et al.*, 2007), les communautés bactériennes du sous-sol (Findlay et Sinsabaugh, 2006) et les flores de surface de fromages (Brennan *et al.*, 2002).

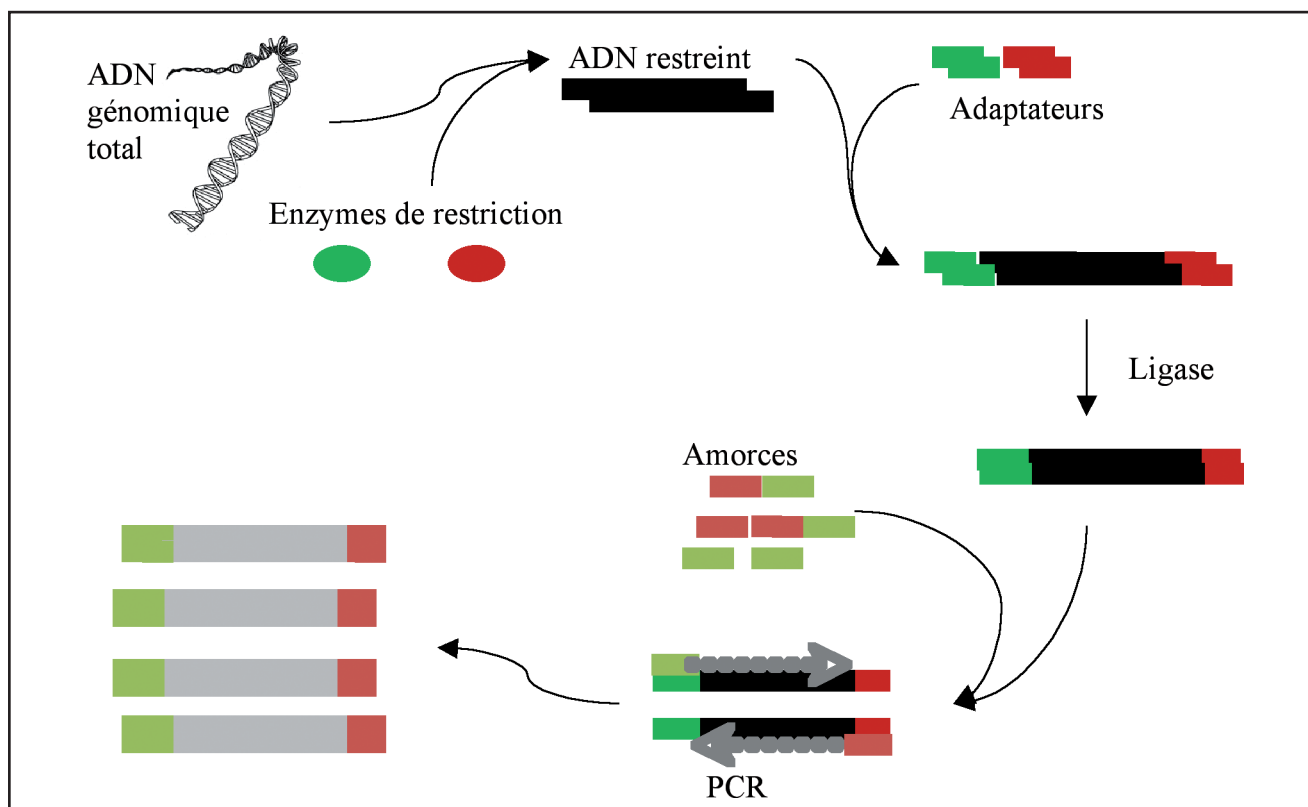
ii. La réaction de polymérisation en chaîne utilisant des amorces arbitraires (AP-PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne utilisant des amorces arbitraires (*Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction* ou AP-PCR) a été pour la première fois utilisée par Welsh et McClelland (1990) pour caractériser rapidement cinq souches de staphylocoques et onze souches de streptocoques. Des amorces d'environ 20 paires de bases sont sélectionnées au hasard. La PCR se fait en deux temps, une première série de cycles (2 à 5) avec une température d'appariement basse, de 40°C (Welsh et McClelland, 1990) à 50°C (Peinado *et al.*, 1992) et une seconde série de cycles (25 à 35) avec une température d'appariement plus élevée, de 50°C à 65°C (Sundin *et al.*, 1994). Le principe est semblable à celui de la RAPD, les amorces s'hybrident de manière plus ou moins spécifique dans le génome, favorisées par les premiers cycles à température d'appariement basse. Le nombre de fragments obtenus dépend du nombre d'amorces appariées.

Un manque de spécificité et de reproductibilité est fréquemment mentionné (McClelland et Welsh, 1994) mais l'expérience en trois réplica développée par Cusick et O'Sullivan (2000) permet d'obtenir des résultats fiables.

Une certaine confusion existe entre l'AP-PCR et la RAPD. Par exemple, Prieto et collaborateurs (2007) utilisent le terme AP-PCR dans leur comparaison de flore bactérienne des vignobles chiliens alors qu'au vu des amorces utilisées (10 pb) et des cycles de PCR programmés (une seule température d'appariement), la technique employée est vraisemblablement une RAPD. Plusieurs études comparatives

Figure 2 : principe général de l'Amplified Fragment-Length Polymorphism (AFLP)



entre des souches de *Pseudomonas* résistantes aux antibactériens ont été réalisées grâce à l'AP-PCR (Sundin *et al.*, 1994 ; Bultreys et Gilbert, 2003).

iii. L'empreinte génétique de produits d'amplification

L'empreinte génétique de produits d'amplification (DNA Amplification Fingerprinting ou DAF) est analogue à la RAPD et l'AP-PCR (Atienzar et Jha, 2006). Les différences sont : la longueur des amorces, généralement de 5 à 10 pb (Jayarao *et al.*, 1992) et une température d'appariement très basse de 30°C (Baird *et al.*, 2006). La longueur des amplicons peut être très courte, à partir de 50 pb (Atienzar et Jha, 2006 ; Baird *et al.*, 2006). Cette technique a été utilisée pour contrôler l'évolution de populations bactériennes de bioréacteurs (Breen *et al.*, 1995).

Une confusion existe entre les trois techniques de PCR aléatoire (DAF, AP-PCR et RAPD). En effet, excepté la longueur des amorces utilisées et une série de cycles différents pour l'AP-PCR, ces trois techniques sont très semblables. Men et collaborateurs (1999) utilisent une technique correspondant à la définition de AP-PCR ; cependant ils la nomment DAF dans leur article.

iv. Le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés

En raison des difficultés rencontrées avec les techniques d'amplification aléatoires, Vos et collaborateurs (1995) ont développé une nouvelle technique d'analyse génomique, le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (*Amplified Fragment-Length Polymorphism* ou AFLP). Le principe de cette technique est schématisé dans la figure 2. L'ADN génomique est digéré par deux enzymes. Des adaptateurs sont ajoutés aux extrémités des sites de restriction. Les amorces peuvent ensuite se fixer sur les fragments obtenus et ceux-ci sont amplifiés. La PCR peut être réalisée en plusieurs étapes : une première avec des amorces dont la séquence est identique à celle des adaptateurs et qui amplifie ainsi tous les fragments ; la seconde avec des amorces possédant de 1 à 3 nucléotides supplémentaires en 3' sélectionnant ainsi un plus petit nombre de fragments étant donné que ceux-ci peuvent être très nombreux (Vos *et al.*, 1995). L'utilisation d'amorces fluorescentes permet une comparaison standardisée de cette technique par électrophorèse capillaire (Savelkoul *et al.*, 1999). Il existe de nombreuses possibilités pour réaliser des AFLP *in silico* (Meudt et Clarke, 2007), c'est-

à-dire simuler des PCR et des gels grâce à des programmes informatiques (Bikandi *et al.*, 2004). Ces simulations permettent de cibler au mieux les enzymes et amorces à utiliser lors de la réalisation de l'expérience mais nécessitent de connaître la séquence génomique complète de certaines espèces présentes dans l'échantillon.

L'AFLP est une technique puissante pour différencier des espèces voire des sous-espèces (Savelkoul *et al.*, 1999). Elle a été utilisée pour comparer des populations bactériennes de sols subissant une faible augmentation en hydrates de carbone (Rosa *et al.*, 2006), caractériser des types de *Clostridium botulinum* (Keto-Timonen *et al.*, 2005) ou encore observer l'impact des dilutions sur la croissance d'une population bactérienne (Franklin *et al.*, 2001).

v. Les zones avec répétitions palindromiques extragéniques

Les zones avec répétitions palindromiques extragéniques (*Repetitive Extragenic Palindromic* ou REP) séparent les zones codantes sur le génome des eubactéries (Stern *et al.*, 1984). Ces séquences sont présentes en grande quantité dans le génome bactérien, il peut en exister jusqu'à 1000 copies dans le

chromosome d'*E. coli* (Higgins *et al.*, 1988). Les séquences présentent entre les REP peuvent être très variables au sein d'une même espèce. En effet, les séquences palindromiques permettent l'insertion ou la délétion d'opérons ou d'éléments génétiques mobiles (Tobes et Pareja, 2006).

Les amorces employées lors des REP-PCR sont des séquences consensus de différents REP contenant beaucoup d'inosine. Cette dernière est capable de s'apparier avec des liaisons faibles aux quatre nucléotides de base (Versalovic *et al.*, 1991). Cette technique a récemment été employée dans l'analyse des flores présentes sur les raisins (Gonzalez *et al.*, 2005) et dans la mise en évidence de bactéries productrices de biosurfactant (Bodour *et al.*, 2003).

4. L'AMPLIFICATION PAR DÉPLACEMENTS MULTIPLES

Les extractions d'ADN et d'ARN ainsi que leur amplification par PCR et RT-PCR sont devenues monnaie courante dans les laboratoires de bactériologie. Par contre, de nouvelles techniques, telles que l'amplification par déplacements multiples sont en développement. Cette technique, beaucoup plus récente que la PCR, permet d'amplifier de très faibles quantités d'ADN, ce qui est très utile pour des échantillons précieux comme ceux de médecine légale ou de paléontologie.

L'amplification par déplacements multiples (*Multiple Displacement Amplification* ou MDA) est une technique d'amplification génétique mise au point par Dean et collaborateurs (2001). Les propriétés de la polymérase du bactériophage $\phi 29$ sont utilisées pour réaliser une amplification non spécifique des génomes présents dans un échantillon. Cette polymérase possède le potentiel de séparer les brins hybridés ce qui rend inutiles les cycles de dénaturation. Elle possède une activité 5'exonucléase la rendant très spécifique. Elle est active à 30°C et est inactivée à 65°C (Dean *et al.*, 2001). Enfin, elle permet d'amplifier des fragments jusqu'à 12 kb (Lasken, 2007). Ce principe a été développé pour amplifier quelques femtogrammes d'ADN précieux comme par exemple en médecine légale. Malheureusement, cette technique génère souvent des biais de surreprésentation de certaines zones du génome et de sous représentation d'autres (Lasken, 2007 ; Ishoev *et al.*, 2008).

La MDA permet essentiellement de pré-amplifier des échantillons pauvres en ADN ou contenant de fortes doses d'inhibiteurs. Les premiers à avoir utilisé la MDA sur des populations bactériennes sont Gonzalez et collaborateurs (2005). Une simple extraction et une MDA a permis d'obtenir un ADN de qualité suffisante pour réaliser leur PCR alors qu'auparavant, une complexe technique d'extraction était nécessaire pour éliminer, souvent peu efficacement, les inhibiteurs de PCR. Depuis, plusieurs études ont utilisé la MDA pour pré-amplifier de l'ADN, notamment une étude métagénomique de la population bactérienne des tourbes (Chen *et al.*, 2008).

Une autre application directe du MDA est l'amplification de l'ADN d'une cellule unique (Raghunathan *et al.*, 2005). Les quelques femtogrammes d'ADN contenu dans une seule cellule peuvent être amplifiés pour obtenir une pureté finale de minimum 30 % d'ADN génomique, les 70 % restant étant des artefacts et quelques contaminations. La MDA sur cellule unique permet de séquencer sans amplification secondaire 62 à 66 % du génome (Zhang *et al.*, 2006). Il existe différentes méthodes d'isolation des cellules : les dilutions (Zhang *et al.*, 2006), les manipulations sous microscope (Lasken, 2007 ; Ishoev *et al.*, 2008), la cytométrie de flux (Dean *et al.*, 2001 ; Podar *et al.*, 2007) ou sur des micropuces (Marcy *et al.*, 2007). Dans ce dernier cas, les MDA sont réalisées dans des réacteurs de 60 nl.

La seule étude de population ayant utilisé le MDA sur cellule isolée est celle de Kvist et collaborateurs (2007) qui ont étudié après analyses traditionnelles, une des archéobactéries les plus représentées dans leur échantillon de sol. Cette technique pourrait être des plus efficaces pour faciliter les analyses des clonages shotgun (Lasken, 2007).

5. TRAITEMENT DE L'ADN AMPLIFIÉ AVANT VISUALISATION

Une fois l'ADN ou l'ARN extrait, la ou les séquences amplifiées, les amplicons peuvent soit être visualisés directement soit, après traitement (s'ils sont de la même taille par exemple), afin d'afficher les différences au sein de la population étudiée. Parmi les traitements possibles, il existe les enzymes de restrictions qui coupent

l'ADN à des sites bien précis ou les substances dénaturant l'ADN, c'est-à-dire séparant les deux brins de la molécule d'ADN.

a. Les restrictions

La digestion des amplicons obtenus au moyen d'une ou plusieurs enzymes de restriction permet d'obtenir des fragments de différentes tailles. Cette technique porte le nom de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou RFLP). Une fois la restriction réalisée, les fragments peuvent être visualisés sur gel d'agarose, de polyacrylamide ou par une électrophorèse en champs pulsés (Soults et Madden, 2007). Ils peuvent également être séquencés après extraction du gel et clonage (Nocker *et al.*, 2007). L'*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA) est une RFLP réalisée sur le gène 16S (Moyer *et al.*, 1994).

L'ARDRA est une technique analytique particulièrement intéressante pour détecter des changements au sein de populations connues, mais moins efficace pour étudier la biodiversité globale d'un échantillon (Kirk *et al.*, 2004). Elle a été récemment employée pour la caractérisation et la comparaison des populations bactériennes de réserves de pétrole (Sette *et al.*, 2007) ou des populations bactériennes du plancton arctique (Zeng *et al.*, 2007). D'autres gènes sont employés comme base de RFLP, notamment l'ITS (Toth *et al.*, 2001), également utilisé pour les populations fongiques (Medina *et al.*, 2005), et le gène *rpoC1* (Jameson *et al.*, Epub).

b. La dénaturation

Le Polymorphisme de conformation des simples brins (*Single Strand Conformation Polymorphism* ou SSCP) est une technique mise au point par Orita et collaborateurs (1989) dans le cadre de l'analyse du génome humain. La première équipe à l'avoir utilisée pour une étude de population bactérienne est celle de Lee et collaborateurs (1996). L'ADN double brin est dénaturé par un agent chimique, le plus fréquent étant la formamide mais l'hydroxyde de sodium, l'urée et l'hydroxyde de méthylmercure ont également été employés (Nataraj *et al.*, 1999). L'ADN simple brin adopte ensuite une structure tridimensionnelle, possédant un encombrement stérique particulier. Cette configuration peut

varier suite à la mutation d'un seul nucléotide (Orita *et al.*, 1989). La séparation des différents brins peut ensuite se réaliser sur un gel de polyacrylamide (Hayashi, 1991) ou par électrophorèse capillaire (Baba *et al.*, 2003).

Les espèces représentant moins d'1,5 % de la population étudiée peuvent être mises en évidence par la SSCP (Lee *et al.*, 1996). Un des plus gros problèmes de la SSCP est le ré-appariement des brins séparés (Selvakumar *et al.*, 1997). La conséquence de ce ré-appariement est la présence de trois (au lieu de deux) bandes pour le même amplicon (double brin, simple brin Watson et simple brin Crick) (Schwieger et Tebbe, 1998). Ce phénomène peut être diminué par l'ajout d'un groupe phosphate à l'extrémité 5' lors de la PCR et une dénaturation employant l'exonucléase lambda (Schwieger et Tebbe, 1998).

Récemment, Ye et collaborateurs (Ye *et al.*, 2007) ont utilisé cette technique pour étudier les effets du pH sur les populations bactériennes lors de la fermentation des composts.

6. VISUALISATION DE L'ADN PAR ÉLECTROPHORÈSE

Une fois les différentes étapes décrites plus haut réalisées, il faut visualiser le résultat de l'amplification ou du traitement réalisés sur les amplicons. Pour ce faire, différents types d'électrophorèses peuvent être réalisés, de la plus classique sur gel d'agarose à des processus complexes tels que des gels contenant des gradients d'agents dénaturants et alliant donc dans la même étape le traitement de l'ADN et sa visualisation.

L'électrophorèse permet de séparer des particules en fonction de leur charge électrique et de leur taille. Les molécules d'ADN, chargées négativement, sont attirées vers l'anode au travers d'un réseau solide non mobile (généralement un gel en agarose ou polyacrylamide). Ce réseau permet de retenir les molécules en fonction de leur taille, les plus petites gagnant plus rapidement l'anode que les grandes. Plus le réseau est dense, mieux les molécules de petites tailles seront séparées (Ausubel *et al.*, 1989).

a. Sur gel d'agarose

Les gels d'agarose permettent la séparation de fragments d'ADN de relativement grandes tailles. Les molécules

d'ADN, chargées négativement, sont soumises à un courant électrique qui les fait migrer dans le gel. En fonction de la concentration de celui-ci en agarose, certaines tailles de fragment seront mieux séparées que d'autre. Alors qu'un gel à 0,5 % permet la séparation de molécules de 30 kb à 1 kb, il faudra une concentration de 1,5 % pour séparer des fragments de 3 kb à 200 pb (Ausubel *et al.*, 1989). Les gels d'agarose sont utilisés pour l'analyse des ITS (Nagpal *et al.*, 1998), des RFLP (Toth *et al.*, 2001), des PCR aléatoires (Pravin *et al.*, 2007) et des REP-PCR (Versalovic *et al.*, 1991).

b. Sur gel de polyacrylamide

Les gels de polyacrylamide (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis* ou PAGE) sont utilisés pour des fragments plus petits que les gels d'agarose, en général inférieurs à 1 kb. À nouveau, les échantillons déposés sur le gel sont séparés en fonction de leur taille. Tout comme pour les gels d'agarose, une concentration plus élevée permet une séparation plus nette des fragments de très petites tailles (Ausubel *et al.*, 1989). Ils sont utilisés pour séparer les PCR d'ITS (Jensen *et al.*, 1993 ; Prieto *et al.*, 2007), les fragments de RFLP (Prieto *et al.*, 2007) ou les simples brins des SSCP (Lee *et al.*, 1996 ; Smalla *et al.*, 2007).

c. En champ pulsé

L'électrophorèse en champ pulsé (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* ou PFGE) est une électrophorèse sur gel d'agarose utilisant des champs électriques alternés. Les changements de direction des molécules en fonction de leur structure tridimensionnelle durant la migration font varier leur distance totale de migration (Lai *et al.*, 1989). La PFGE permet de séparer des fragments de très grande taille, jusqu'à 10 Mb, alors que les électrophorèses traditionnelles séparent des fragments de maximum 50 kb (Herschleb *et al.*, 2007).

La PFGE peut être utilisée sur des génomes ou métagénomes entiers restreints avec des enzymes de restrictions coupant peu fréquemment (Quelle et Catalano, 2001 ; Nagase *et al.*, 2002), sur des PCR aléatoires (Brennan *et al.*, 2002) ou des RFLP (Satokari *et al.*, 2003 ; Soutos et Madden, 2007).

d. En gradient de dénaturant

Les électrophorèses en gradient de gel dénaturant (*Denaturing Gradient*

Gel Electrophoresis ou DGGE) et les électrophorèses en gradient de température (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis* ou TGGE) sont des techniques d'électrophorèse dénaturantes mises au point par Fischer et Lerman (1983) pour la première et Rosenbaum et collaborateurs (1987) pour la seconde. Les molécules d'ADN de petites tailles (entre 80 et 500 pb) se déplacent au sein du gel et subissent une dénaturation progressive durant l'électrophorèse en fonction de leur température de fusion (T_m). Une fois les brins dénaturés, leur encombrement stérique est trop important pour continuer la migration dans le gel. Ces techniques permettent donc de séparer des fragments de même taille en fonction de leur T_m , c'est-à-dire de leur composition nucléotidique : une augmentation du pourcentage en GC (3 ponts hydrogènes) par rapport au pourcentage en AT (2 ponts hydrogènes) augmente le T_m de la molécule pour une taille donnée (Fischer et Lerman, 1983).

Afin d'éviter la séparation complète des deux brins d'ADN, une séquence riche en GC est ajoutée à l'une des amorces lors de la PCR. Cette pince GC permet de garder les deux brins d'ADN attachés par cette extrémité grâce à la série de triples liaisons hydrogènes entre les guanines et les cytosines (Myers *et al.*, 1985). L'ajout de cette pince GC entraîne un rendement faible de la PCR. Pour augmenter le rendement, différentes techniques peuvent être employées. Le nombre de cycles, temps d'appariement et la quantité d'ADN de départ peuvent être augmentés (Abecia *et al.*, 2005). Des PCR nichées, qui amplifient l'ADN en deux temps, avec deux couples d'amorces dont le second amplifie un fragment interne au premier, peuvent être employées (Randazzo *et al.*, 2005 ; Boutte *et al.*, 2006) ou des PCR « *touchdown* », dont la température d'appariement augmente progressivement à chaque cycle (Suchodolski *et al.*, 2004 ; Yu et Morrison, 2004).

Cette technique offre des résultats semblables à la SSCP, une différence d'un seul nucléotide pouvant être détectée lorsque l'espèce représente plus de 2 % de la population étudiée (Myers *et al.*, 1985). Cependant, des trainées d'ADN sont souvent présentes sur les gels lorsque la population est trop riche. De plus, cette technique ne permet pas la mise en évidence des populations minoritaires (Rösch *et al.*,

2006). Les bandes obtenues peuvent être séquencées directement après extraction ou après un clonage.

La validation de la DGGE comme technique d'étude de population a été réalisée par Muyzer et collaborateurs (1993). Yu et Morrison (2004) ont comparé les différentes régions hypervariables du gène 16S par DGGE. Des flores caecales de lapins traités aux antibiotiques ont été comparées par DGGE (Abecia *et al.*, 2005) démontrant un changement de flore spécifique en fonction de l'antibiotique utilisé. Récemment, des flores bactériennes du sol ont été comparées par différentes techniques de biologie moléculaire notamment la DGGE (Smalla *et al.*, 2007).

e. Sur gel de polyacrylamide en deux dimensions (PAGE-2D)

Les PAGE-2D sont des électrophorèses en deux temps. La première migration a lieu sur un gel non dénaturant et permet de séparer les molécules en fonction de leur taille. La colonne est excisée et déposée sur le second gel contenant un gradient de dénaturant, tout comme dans la DGGE. La seconde migration permet donc de séparer les amplicons en fonction de leur séquence. Une pince G-C est donc nécessaire dans cette technique. La PAGE-2D a été employée sur les ITS de bactéries des sols (Jones et Thies, 2007).

7. PROFILS AUTOMATISÉS DE VISUALISATION DE L'ADN

Outre les profils d'électrophorèse sur gels, il existe également des méthodes automatisées pour visualiser l'ADN. Ces profils automatisés sont réalisés grâce à des électrophorèses sur capillaire. Ils demandent un marquage préalable par des molécules fluorescentes et permettent d'obtenir des profils précis, reproductibles et de haute résolution.

a. Les fragments de restriction terminaux

La technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* ou T-RFLP) est une RFLP automatisée grâce à des produits de PCR marqués par des amorces fluorescentes et à la migration des fragments sur capillaires. Avaniiss-Aghajani et collaborateurs (1994) sont les pionniers de cette

technique. Les fragments terminaux fluorescents d'ADN restreints possèdent une taille variable en fonction de leur séquence et, donc, des pics de fluorescence sont enregistrés à différents moments. Les profils obtenus par T-RFLP possèdent une grande répétabilité (Kitts, 2001). Le gène le plus souvent employé est le 16SrDNA. Les profils obtenus peuvent être enregistrés dans des bases de données, comme, par exemple, la *Ribosomal Database Project* (Cole *et al.*, 2007), ce qui permet aujourd'hui d'identifier une espèce présente sur un profil de T-RFLP sans passer par un séquençage (Marsh *et al.*, 2000). Récemment, un outil informatique permettant une aide au choix de l'enzyme lors de T-RFLP a été mis en place (Collins et Rocap, 2007).

La taille des pics de fluorescence est un bon outil de quantification. En effet les pics les plus élevés sont les séquences le plus souvent mises en évidence lors de clonages (Rahalkar et Schink, 2007). De part sa rapidité, sa sensibilité et sa reproductibilité, la T-RFLP peut être un outil de diagnostic efficace (Thies *et al.*, 2007).

Jensen et collaborateurs ont très récemment utilisé cette technique pour étudier la flore des racines et des feuilles de la zostère marine (Jensen *et al.*, 2007). Les effets de la déforestation et de la reforestation sur les populations de bactéries méthanotrophiques ont également été étudiés grâce à la T-RFLP (Singh *et al.*, 2007).

b. Les espaces intergéniques de l'ADN ribosomal

L'analyse automatisée de l'espace intergénique de l'ADN ribosomal (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* ou ARISA) est un profil automatisé de RISA. L'ITS est amplifié par PCR en ajoutant un marqueur de fluorescence aux amorces. Les amplicons sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire et les pics de fluorescence sont enregistrés (Nocker *et al.*, 2007). Fisher et Triplett (1999) ont mis au point cette technique. L'inconvénient principal est toujours lié au nombre de copies différentes de cette séquence intergénique, 85 % des espèces produisant deux voire trois pics (Jensen *et al.*, 1993). L'ARISA fournit rapidement des profils contenant peu d'informations mais permettant des comparaisons entre les populations. Tout comme la T-RFLP, elle a une très bonne répétabilité (Jones *et al.*, 2007).

La dynamique des populations bactériennes est l'objet d'études fréquentes par ARISA, par exemple l'effet de la composition minérale du sol (Carson *et al.*, 2007) ou la colonisation de l'intestin des dindes (Scupham, 2007). Cette dernière étude a identifié une période de transition de la flore intestinale des dindes vers 12 semaines d'âge. L'ARISA est également employée dans l'étude des populations fongiques (Ranjard *et al.*, 2001).

c. Avec ADN simple brin

Les différents brins obtenus par SSCP peuvent aussi être séparés par électrophorèse capillaire. Cette technique est appelée l'électrophorèse capillaire du polymorphisme de conformation des simples brins (*Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism* ou CE-SSCP). Elle a été utilisée très récemment dans une comparaison de flores des matières fécales et des cæcotrophes de lapins avant et après intervention chirurgicale sur le tractus digestif (Michelland *et al.*, 2008). Cette étude démontre que les flores des matières fécales et cæcotrophes sont semblables et qu'une intervention sur le tractus digestif du lapin entraîne un changement notable de la flore.

d. Séquençage

Le séquençage est la technique apportant le plus d'informations phylogénétiques lors d'études de flores bactériennes (Nocker *et al.*, 2007). Des bandes intéressantes excisées des gels ou des fragments d'ADN clonés dans un vecteur peuvent ainsi être séquencés. Dans le premier cas, l'ADN extrait du gel peut être séquencé directement (Nagpal *et al.*, 1998), après réamplification ou après clonage (Zeng *et al.*, 2007). Le séquençage des produits de PCR après clonage est fréquemment employé avec le gène 16S (Kassinen *et al.*, 2007 ; Kjeldsen *et al.*, 2007 ; Shinzato *et al.*, 2007). En effet, le séquençage de ce gène permet généralement l'identification de la souche jusqu'à l'espèce (Van de Peer *et al.*, 1996). La comparaison de différentes bibliothèques de clones du gène 16S permet d'estimer les flores en fonction des milieux. La dynamique au sein d'un milieu est par contre difficilement étudiable grâce à cette technique (Singleton *et al.*, 2001). Le séquençage peut également avoir comme cible des fragments de restrictions de génomes clonés. Cette approche, appelée shotgun a permis le séquençage du premier

chromosome bactérien (Fleischmann *et al.*, 1995). Venter et collaborateurs (2004) ont énormément contribué à la base de données des séquences procaryotiques grâce à leur séquençage shotgun des espèces présentes dans la mer des Sargasses. Ils ont été les premiers à employer cette technique pour l'étude d'une population entière.

De nouvelles techniques de séquençage permettent d'éviter la pré-amplification et le clonage des échantillons qui sont des activités chronophages (Cardenas et Tiedje, 2008). Grâce à ces techniques de séquençage à ultra haut débit, des milliers de simples brins d'ADN peuvent être séquencés en même temps. Trois techniques commerciales (SOLiD, Helicos, Illumina) font appel à des principes similaires : le matériel génétique est restreint en fragments de 30 à 36pb et un adaptateur (queue poly A ou un oligo) est fixé à une extrémité. Ces fragments sont ensuite fixés sur des lames grâce à des billes magnétiques et/ou des oligo. Des PCR universelles sont réalisées sur la lame pour les techniques de SOLiD et Illumina tandis qu'un seul brin est employé pour le séquençage lors d'une Helicos. Les émissions de fluorescence des nucléotides utilisés pour le séquençage sont localisées sur la lame et permettent de séquencer simultanément une quantité de fragments allant de 100 000 à 400 000 (Steemers et Gunderson, 2005). La réunion de ces différentes séquences grâce à des algorithmes permet d'obtenir le génome ou méta-génome complet de l'échantillon dans des temps record (Huang *et al.*, 2009). D'autres techniques de séquençage à ultra haut débit sont en cours de développement, notamment l'utilisation de nanopores (Oxford Nanopore Technology, 2009). Ces techniques devraient bientôt être utilisées pour les études de populations bactériennes.

Ces différentes méthodes permettent d'étudier l'évolution d'une population bactérienne et/ou d'en comparer plusieurs. Ces techniques sont plus ou moins coûteuses ; certaines donnent des informations complémentaires ; d'autres des informations semblables. L'important est de trouver la ou les techniques les plus appropriées à l'étude choisie.

8. CHOIX DES TECHNIQUES

La première alternative à envisager est l'étude de l'ADN ou de l'ARN. Des informations différentes sont obtenues

en fonction de ce choix. L'ARN reflète beaucoup mieux l'activité de la population (Sorensen et Teske, 2006). Mais il est également plus difficile à manipuler et est facilement contaminé par de l'ADN ou des RNase qui le dégradent (Halet *et al.*, 2006 ; Lahtinen *et al.*, 2008).

Les inconvénients et avantages des différentes techniques sont présentés au tableau I. Parmi toutes les techniques présentées, une différence doit être faite entre les profils automatisés et les autres techniques. L'automatisation permet une comparaison rapide, d'un nombre important d'échantillons avec une reproductibilité importante pour un moindre coût une fois l'appareil amorti (Nocker *et al.*, 2007). Le gros inconvénient des techniques automatisées est l'impossibilité de séquencer les pics intéressants (tableau II). Leur utilité est donc de déceler des différences entre populations (Jensen *et al.*, 2007 ; Rahalkar et Schink, 2007) ou au sein de la même population au cours du temps (Scupham, 2007) ou lors d'un changement d'environnement (Carson *et al.*, 2007).

Comme le décrivent Kirk et collaborateurs (2004) dans une synthèse sur l'étude de la biodiversité des flores du sol, les biais présents dans les différentes techniques entraînent souvent la nécessité d'en utiliser plusieurs afin d'obtenir une vision globale et plus complète de la, ou des, populations étudiées. Par exemple, Smalla et collaborateurs (2007) étudient les flores du sol avec la DGGE, la T-RFLP et la SSCP. Les conclusions qu'ils en ont tirées sont les suivantes : les profils obtenus avec les DGGE et SSCP sont comparables tandis que les profils obtenus avec la T-RFLP sont moins riches. Ces derniers, bien qu'apportant moins de résultats permettent d'obtenir des arbres phylogénétiques de bonne qualité, ils sont donc très intéressants pour une étude de routine à réaliser sur du long terme. D'un autre côté, seuls les profils de SSCP et DGGE permettent d'identifier les espèces présentes dans les populations par séquençage.

D'autres auteurs se contentent d'une seule technique. Il s'agit en grande majorité d'études démontrant une simple variation de population. Par exemple, Abecia et collaborateurs (2005) n'ont utilisé que la DGGE afin de démontrer que des traitements antibiotiques modifiaient fortement les flores digestives des lapins. Ou encore l'étude de Carson et collaborateurs (2007) qui

démontre un changement de flore bactérienne dans les sols enrichis en minéraux grâce à l'ARISA.

9. QUELLES SONT LES MÉTHODES UTILISÉES POUR LES ÉTUDES SUR LA FLORE DIGESTIVE ?

Toutes les techniques d'études de populations peuvent potentiellement être utilisées pour l'étude de flore digestive. Néanmoins certains critères doivent être pris en compte lors d'un travail sur matières fécales ou contenus intestinaux.

Tout d'abord le stockage des prélèvements se font en général à -80°C (Suchodolski *et al.*, 2004 ; Scupham, 2007) en attendant l'extraction. Certains auteurs utilisent, avec de bons résultats, d'autres méthodes de conservation par exemple à -20°C (Fenicia *et al.*, 2007 ; Peng *et al.*, 2007) ou à 4°C dilué dans un tiers d'éthanol 98 % (Badiola *et al.*, 2005). Si les extractions ne peuvent être réalisées peu de temps après la récolte d'échantillons, la conservation à -80°C ou -20°C est recommandée.

Comme dit plus haut, les matières fécales contiennent énormément d'inhibiteurs de PCR (Duenngai *et al.*, 2008), les extractions doivent donc éliminer un maximum ces inhibiteurs. Des kits commerciaux donnent de bons résultats mais souvent inférieurs à une méthode développée spécifiquement pour un type de prélèvement (Schuurman *et al.*, 2007). Le kit le plus populaire et très efficace pour les extractions de matières fécales est le QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®) (Li *et al.*, 2003).

Les amorces utilisées sur des flores digestives dépendent de la flore type de l'animal étudié. Par exemple, pour une flore riche en bactéries gram positives, des amorces riches en guanine et cytosine généralement plus fréquentes chez les bactéries gram positives seront privilégiées. Des amorces spécifiques ciblant les gènes codant pour les ARN ribosomiaux des entérobactéries ou des bifido- et lactobactéries (Sato-kari *et al.*, 2003) peuvent être utilisées pour des études sur ces populations particulières.

Il existe des articles de revue spécifiques à l'étude des populations digestive, humaines ou animales (Macfarlane *et al.*, 2004 ; Richards *et al.*, 2005).

Tableau I : Avantages et inconvénients des techniques présentées

PCR aléatoire (RAPD, AP-PCR et DAF)	Avantages	Pas besoin d'équipement spécifique Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel
	Inconvénients	Manque de reproductibilité Présence d'artefacts (amplification dans le témoin négatif)
AFLP	Avantages	Possibilité de tester in silico pour choisir les enzymes intéressantes Permet de différencier des espèces voir des sous espèces Compatible avec une analyse automatisée
	Inconvénients	Demande beaucoup de temps
REP	Avantages	Pas besoin d'équipement spécifique Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel
	Inconvénients	Les séquences présentent entre les REP peuvent être très variables au sein d'une même espèce
RISA	Avantages	Pas besoin d'équipement spécifique Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel
	Inconvénients	Une seule espèce peut avoir plusieurs signaux
ARDRA	Avantages	Pas besoin d'équipement spécifique
	Inconvénients	Plusieurs restrictions nécessaires pour trouver une résolution adéquate Demande beaucoup de temps
SSCP	Avantages	Pas besoin d'amorce avec pince GC Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel Compatible avec une analyse automatisée (CE-SSCP)
	Inconvénients	Taux élevé de ré appariement des brins d'ADN Une espèce peut présenter plusieurs bandes
DGGE / TGGE	Avantages	Les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel Peu cher
	Inconvénients	Sensibilité limité La pince GC diminue la rentabilité de la PCR et favorise la formation de dimère La manipulation du gel demande de l'expérience
T-RFLP	Avantages	Haute sensibilité Rapide Permet une comparaison entre les différents essais
	Inconvénients	Restriction incomplète entraine une surestimation d'une espèce Plusieurs restrictions sont nécessaires pour une analyse complète Les profils complexes sont difficiles à interpréter phylogénétiquement
ARISA	Avantages	Permet de détecter de très légères différences de population Compatible avec RFLP et séquençage pour des analyses complémentaires
	Inconvénients	Une seule espèce peut avoir plusieurs signaux
Séquençage	Avantages	La plus haute résolution phylogénétique Permet l'identification de l'espèce
	Inconvénients	Prend du temps si passe par le clonage

Tableau II : Techniques permettant un séquençage des bandes d'intérêts

Après extraction du gel	Après clonage	Impossible
DGGE / TGGE SSCP RISA AFLP	RAPD AP-PCR DAF REP ARDRA	T-RFLP ARISA CE-SSCP

10. CONCLUSION

Il existe beaucoup de choix au niveau des techniques de biologie moléculaire pour l'étude des populations bactériennes. La technique utilisée dépendra du but de l'étude, du budget, des habitudes du laboratoire, de la complexité de la population étudiée et du temps disponible. Même si les profils automatisés sont les plus faciles à comparer et reproduire, ils ne permettent pas de séquençage ultérieur. La plupart des études actuelles utilisent et comparent plusieurs méthodes.

ABSTRACT

Today, traditional bacterial cultures techniques aren't sufficient for studying complex bacterial population. For the past twenty years, a lot of studies have shown that a wide majority of bacterial species can't be grown on traditional culture media. They've also approved the use of biomolecular methods to assess complex bacterial populations whatever their

origin, digestive, aquatic, from the soil... These methods are numerous but follow generally the same framework. The DNA is extracted then amplified, sometimes treated and finally visualized or sequenced. This review discussed the more common methods used to assess bacterial population and the different points to consider before choosing one or several appropriated methods.

BIBLIOGRAPHIE

- ABECIA L., MCEWAN N.R., NEWBOLD C.J., FONDEVILA M., BALCELLS J. (2005). Molecular profiling of the major bacterial species in the rabbit caecum as affected by therapeutical doses of antibiotics. In : Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, September 7-10, 2004, Puebla Mexico. World Rabbit Science Association : Paris, 2004, 404-409.
- ALDERTON R.P., ECCLESTON L.M., HOWE R.P., READ C.A., REEVE M.A., BECK S. Magnetic bead purification of M13 DNA sequencing templates. *Anal. Biochem.*, 1992, **201**, 166-169.
- ATIENZAR F.A., JHA A.N. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat. Res.*, 2006, **613**, 76-102.
- AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R., MOORE D.D., SEIDMAN J.G., SMITH J.A., STRUHL K. Current Protocols in molecular biology. John Wiley: New York, 1989.
- AVANISS-AGHAJANI E., JONES K., CHAPMAN D., BRUNK C. A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *Biotechniques*, 1994, **17**, 144-146, 148-149.
- BABA S., KUKITA Y., HIGASA K., TAHIRA T., HAYASHI K. Single-stranded conformational polymorphism analysis using automated capillary array electrophoresis apparatuses. *Biotechniques*, 2003, **34**, 746-750.
- BADIOLA I., PEREZ DE ROZAS A.M., ROCA M., CARABANO R., GOMEZ M., GARCIA J., BLAS C.D. Characterization of the microbial diversity of rabbit intestinal tract by restriction fragment length polymorphism. In : Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, September 7-10, 2004, Puebla Mexico. World Rabbit Science Association : Paris, 2004.
- BAIRD R.E., TRIGIANO R.N., WINDHAM G., WILLIAMS P., KELLEY R., ABBAS H.K., MOULTON J.K., SCRUGGS M.L. Comparison of aflatoxigenic and nonaflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* using DNA amplification fingerprinting techniques. *Mycopathologia*, 2006, **161**, 93-99.
- BAKER G.C., SMITH J.J., COWAN D.A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods*, 2003, **55**, 541-555.
- BERESWILL S., HINKELMANN S., KIST M., SANDER A. Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the ribC gene for differentiation of *Bartonella species* by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 3159-3166.
- BERGSLAND K.J., HASELKORN R. Evolutionary relationships among eubacteria, cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the rpoC1 gene of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, 1991, **173**, 3446-3455.

- BEZIRTZOGLU, E., MAIPA V., CHOTOURA N., APAZIDOU E., TSIOTSIAS A., VOIDAROU C., KOSTAKIS D., ALEXOPOULOS A. Occurrence of Bifidobacterium in the intestine of newborns by fluorescence in situ hybridization. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2006, **29**, 345-352.
- BIKANDI J., MILLAN R.S., REMENTERIA A., GARAIZAR J. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics*, 2004, **20**, 798-799.
- BIRTLES R.J., RAOULT D. Comparison of partial citrate synthase gene (gltA) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1996, **46**, 891-897.
- BLACKWOOD C.B., OAKS A., BUYER J.S. Phylum- and Class-Specific PCR primers for general microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 6193-6198.
- BODOUR A.A., DREES K.P., MAIER R.M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid Southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 3280-3287.
- BOOM R., SOL C., WEEL J., LETTINGA K., GERRITS Y., VAN BREDA A., WERTHEIM-VAN DILLEN P. Detection and quantitation of human cytomegalovirus DNA in faeces. *J. Virol. Methods*, 2000, **84**, 1-14.
- BOUTTE C., GRUBISIC S., BALTHASART P., WILMOTTE A. Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. *J. Microbiol. Methods*, 2006, **65**, 542-550.
- BOYER S.L., FLECHTNER V.R., JOHANSEN J.R. Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in Cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.*, 2001, **18**, 1057-1069.
- BREEN A., ROPE A.F., TAYLOR D., LOPER J.C., SFERRA P.R. Application of DNA amplification fingerprinting (DAF) to mixed culture bioreactors. *J. Ind. Microbiol.*, 1995, **14**, 10-16.
- BRENNAN N.M., WARD A.C., BERESFORD T.P., FOX P.F., GOODFELLOW M., COGAN T.M. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 820-830.
- BRIM H., HEUER H., KROGERECKLENFORT E., MERGEAY M., SMALLA K. Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil. *Can. J. Microbiol.*, 1999, **45**, 326-338.
- BULTREYS A., GILBERT V. Interest of tests based on phytotoxin and pyoverdinin production and of the rep-PCR and AP-PCR techniques for identifying and characterizing *Pseudomonas syringae* strains. *Parasitica*, 2003, **59**, 11-18.
- CARDENAS E., TIEDJE J.M. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2008, **19**, 544-549.
- CARROLL N.M., JAEGER E.E.M., CHOUDHURY S., DUNLOP A.A.S., MATHESON M.M., ADAMSON P., OKHRAVI N., LIGHTMAN S. Detection of and discrimination between Gram-positive and Gram-negative bacteria in intraocular samples by using nested PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**, 1753-1757.
- CARSON J.K., ROONEY D., GLEESON D.B., CLIPSON N. Altering the mineral composition of soil causes a shift in microbial community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, **61**, 414-423.
- CASES I., DE LORENZO V. The grammar of (micro)biological diversity. *Environ. Microbiol.*, 2002, **4**, 623-627.
- CHENY., DUMONT M.G., NEUFELD J.D., BODROSSY L., STRALIS-PAVESE N., MCNAMARA N.P., OSTLE N., BRIONES M.J., MURRELL J.C. Revealing the uncultivated majority: combining DNA stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomic analyses of uncultivated *Methylocystis* in acidic peatlands. *Environ. Microbiol.*, 2008, **10**, 2609-2622.
- COLE J.R., CHAI B., FARRIS R.J., WANG Q., KULAM-SYED-MOHIDEEN A.S., MCGARRELL D.M., BANDELA A.M., CARDENASE., GARRITY G.M., TIEDJE J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, D169-172.
- COLLINS R.E., ROCAP G. REPCK: an analytical web server to select restriction endonucleases for terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, W58-62.
- CONNOR S.A., GIOVANNONI S.J. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 3878-3885.
- CUSICK S.M., O'SULLIVAN D.J. Use of a single, triplicate arbitrarily primed-PCR procedure for molecular fingerprinting of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 2227-2231.
- DE WOLF H., BLUST R., BACKELJAU T. The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2004, **566**, 249-262.
- DEAN F.B., NELSON J.R., GIESLER T.L., LASKEN R.S. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.*, 2001, **11**, 1095-1099.
- DONG D., YAN A., LIU H., ZHANG X., XU Y. Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate. *J. Microbiol. Methods*, 2006, **66**, 217-222.
- DORIGO U. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Res.*, 2005, **39**, 2207-2218.
- DUENNGAI K., SITHITHAWORN P., RUDRAPPA U.K., IDDYA K., LAHA T., STENSVOLD C.R., STRANDGAARD H., JOHANSEN M.V. Improvement of PCR for detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in human stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, **46**, 366-368.

- ELLSWORTH D.L., RITTENHOUSE K.D., HONEYCUTT R.L. Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*, 1993, **14**, 214-217.
- FENICIA L., ANNIBALLI F., DE MEDICI D., DELIBATO E., AURELI P. SYBR green real-time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 2891-2896.
- FINDLAY S., SINSABAUGH R.L. Large-scale variation in subsurface stream biofilms: a cross-regional comparison of metabolic function and community similarity. *Microb. Ecol.*, 2006, **52**, 491-500.
- FISCHER S.G., LERMAN L.S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1983, **80**, 1579-1583.
- FISHER M.M., TRIPLETT E.W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 4630-4636.
- FLEISCHMANN R.D., ADAMS M.D., WHITE O., CLAYTON R.A., KIRKNESS E.F., KERLAVAGE A.R., BULT C.J., TOMB J.F., DOUGHERTY B.A., MERRICK J.M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 1995, **269**, 496-512.
- FOGEL G.B., COLLINS C.R., LI J., BRUNK C.F. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microb. Ecol.*, 1999, **38**, 93-113.
- FRAGA J., RODRIGUEZ J., FUENTES O., FERNANDEZ-CALIENES A., CASTEX M. Optimization of random amplified polymorphic DNA techniques for use in genetic studies of Cuban Triatominae. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 2005, **47**, 295-300.
- FRANKLIN R.B., GARLAND J.L., BOLSTER C.H., MILLS A.L. Impact of dilution on microbial community structure and functional potential: comparison of numerical simulations and batch culture experiments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 702-712.
- FREEMAN W.M., WALKER S.J., VRANA K.E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 1999, **26**, 112-122, 124-115.
- FRITSCH P.W. Phylogeny and biogeography of the flowering plant genus styrax (*Styracaceae*) based on chloroplast DNA restriction sites and DNA sequences of the internal transcribed spacer region. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2001, **19**, 387-408.
- GONZALEZA., HIERRON., POBLET M., MAS A., GUILLAMON J.M. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, **102**, 295-304.
- GONZALEZ J.M., PORTILLO M.C., SAIJ-ZIMENEZ C. Multiple displacement amplification as a pre-polymerase chain reaction (pre-PCR) to process difficult to amplify samples and low copy number sequences from natural environments. *Environ. Microbiol.*, 2005, **7**, 1024-1028.
- GONZALEZ N., ROMERO J., ESPEJO R.T. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer region. *J. Microbiol. Methods*, 2003, **55**, 91-97.
- GUEIMONDE M., LAITINEN K., SALMINEN S., ISOLAURI E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, 2007, **92**, 64-66.
- HALET D., BOONN., VERSTRAETE W. Community dynamics of methanotrophic bacteria during composting of organic matter. *J. Biosci. Bioeng.*, 2006, **101**, 297-302.
- HAYASHI K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.*, 1991, **1**, 34-38.
- HERRERA A., COCKELL C.S. Exploring microbial diversity in volcanic environments: A review of methods in DNA extraction. *J. Microbiol. Methods*, 2007, **70**, 1-12.
- HERSCHLEB J., ANANIEV G., SCHWARTZ D.C. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc*, 2007, **2**, 677-684.
- HERTOGH G.D., AERSSSENS J., HOOGT R.D., PEETERS P., VERHASSELT P., EYKEN P.V., ECTORS N., VERMEIRE S., RUTGEERTS P., COULIE B., GEBOES K. Validation of 16S rDNA sequencing in microdissected bowel biopsies from Crohn's disease patients to assess bacterial flora diversity. *J. Pathol.*, 2006, **209**, 532-539.
- HIGGINS C.F., MCLAREN R.S., NEWBURY S.F. Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion? A review. *Gene*, 1988, **72**, 3-14.
- HOPFL P., LUDWIG W., SCHLEIFER K.H., LARSEN N. The 23S ribosomal RNA higher-order structure of *Pseudomonas cepacia* and other prokaryotes. *Eur. J. Biochem.*, 1989, **185**, 355-364.
- HOSHINO Y.T., MATSUMOTO N. DNA- versus RNA-based denaturing gradient gel electrophoresis profiles of a bacterial community during replenishment after soil fumigation. *Soil Biol. Biochem.*, 2007, **39**, 434-444.
- HUANG X., FENG Q., QIAN Q., ZHAO Q., WANG L., WANG A., GUAN J., FAN D., WENG Q., HUANG T., DONG G., SANG T., HAN B. High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. *Genome Res.*, 2009, **19**, 1068-1076.
- ISHOEY T., WOYKE T., STEPANAUSKAS R., NOVOTNY M., LASKEN R.S. Genomic sequencing of single microbial cells from environmental samples. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2008, **11**, 198-204.
- JAMESON E., JOINT I., MANN N., MÜHLING M. Application of a novel rpoC1 -RFLP approach reveals that marine *Prochlorococcus* populations in the atlantic gyres are composed of greater microdiversity than previously described. *Microb. Ecol.*, 2007, **55**, 141-151.

- JAYARAO B.M., BASSAM B.J., CAETANO-ANOLLES G., GRESSHOFF P.M., OLIVER S.P. Subtyping of *Streptococcus uberis* by DNA amplification fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**, 1347-1350.
- JENSEN M.A., WEBSTER J.A., STRAUS N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 945-952.
- JENSEN S.I., KUHL M., PRIEME A. Different bacterial communities associated with the roots and bulk sediment of the seagrass *Zostera marina*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, **62**, 108-117.
- JONESC.M., THIES J.E. Soil microbial community analysis using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the bacterial ribosomal internal transcribed spacer regions. *J. Microbiol. Methods*, 2007, **69**, 256-267.
- JONES S.E., SHADE A.L., MCMAHON K.D., KENT A.D. Comparison of primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of aquatic bacterial communities: an ecological perspective. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 659-662.
- KASSINEN A., KROGIUS-KURIKKA L., MAKIVUOKKO H., RINTTILA T., PAULIN L., CORANDER J., MALINEN E., APAJALAHTI J., PALVA A. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology*, 2007, **133**, 24-33.
- KETO-TIMONEN R., NEVAS M., KORKEALA H. Efficient DNA fingerprinting of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F by amplified fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 1148-1154.
- KIRK J.L., BEAUDETTE L.A., HART M., MOUTOGLIS P., KLIRONOMOS J.N., LEE H., TREVORS J.T. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods*, 2004, **58**, 169-188.
- KITTS C.L. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 2001, **2**, 17-25.
- KJELDSSEN K.U., KJELLERUP B.V., EGLI K., FROLUND B., NIELSEN P.H., INGVORSEN K. Phylogenetic and functional diversity of bacteria in biofilms from metal surfaces of an alkaline district heating system. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, **61**, 384-397.
- KVIST T., AHRING B.K., LASKEN R.S., WESTERMANN P. Specific single-cell isolation and genomic amplification of uncultured microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **74**, 926-935.
- LAHTINEN S.J., AHOKOSKI H., REINIKAINEN J.P., GUEIMONDE M., NURMI J., OUWEHAND A.C., SALMINEN S.J. Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2008, **46**, 693-698.
- LAI E., BIRREN B.W., CLARK S.M., SIMON M.I., HOOD L. Pulsed field gel electrophoresis. *Biotechniques*, 1989, **7**, 34-42.
- LALAM N. Estimation of the reaction efficiency in polymerase chain reaction. *J. Theor. Biol.*, 2006, **242**, 947-953.
- LANE D.J., STAHL D.A., OLSEN G.J., HELLER D.J., PACE N.R. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *J. Bacteriol.*, 1985, **163**, 75-81.
- LASKEN R.S. Single-cell genomic sequencing using Multiple Displacement Amplification. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2007, **10**, 510-516.
- LEE D.H., ZO Y.G., KIM S.J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**, 3112-3120.
- LIM., GONG J., COTTRILL M., YU H., DE LANGE C., BURTON J., TOPP E. Evaluation of QIAamp DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. *J. Microbiol. Methods*, 2003, **54**, 13-20.
- MAARIT NIEMI R., HEISKANEN I., WALLENIS K., LINDSTROM K. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods*, 2001, **45**, 155-165.
- MACFARLANE S., MACFARLANE G.T., ALLEN I. LASKIN J.W.B.A.G.M.G. Bacterial diversity in the human gut. *Adv. Appl. Microbiol.*, 2004, **54**, 261-289.
- MANZ W. In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Water Res.*, 1994, **28**, 1715-1723.
- MARCY Y., ISHOEY T., LASKEN R.S., STOCKWELL T.B., WALENZ B.P., HALPERN A.L., BEESON K.Y., GOLDBERG S.M., QUAKE S.R. Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells. *PLoS Genet*, 2007, **3**, 1702-1708.
- MARSH T.L., SAXMAN P., COLE J., TIEDJE J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 3616-3620.
- MATHIEU-DAUDE F., WELSH J., VOGT T., MCCLELLAND M. DNA rehybridization during PCR: the 'Cot effect' and its consequences. *Nucleic Acids Res.*, 1996, **24**, 2080-2086.
- MCCLELLAND M., WELSH J. DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *Genome Res.*, 1994, **4**, S59-65.
- MCINERNEY J.O., WILKINSON M., PATCHING J.W., EMBLEY T.M., POWELL R. Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a deep-sea deposit feeder. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**, 1646-1648.
- MEADE H.M., LONGS.R., RUVKUN G.B., BROWN S.E., AUSUBEL F.M. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.*, 1982, **149**, 114-122.

- MEDINA A., MATEO R., LOPEZ-OCANA L., VALLE-ALGARRA F.M., JIMENEZ M. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 4696-4702.
- MEN A.E., BORISOV A.Y., ROZOV S.M., USHAKOV K.V., TSYGANOV V.E., TIKHONOVICH I.A., GRESSHOFF P.M. Identification of DNA amplification fingerprinting (DAF) markers close to the symbiosis-ineffective sym31 mutation of pea (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 1999, **98**, 929-936.
- MEUDT H.M., CLARKE A.C. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci.*, 2007, **12**, 106-117.
- MICHELLAND R., COMBES S., CAUQUIL L., GIDENNE T., MONTEILS V., FORTUN-LAMOTHE L. Characterization of bacterial communities in caecum, hard and soft feces of rabbit using 16S rRNA genes capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP). In : proceedings of the 9th World Rabbit Congress, June 10-13, 2008, Verona. World Rabbit Science Association : Paris, 2008, 1025-1030.
- MOORE P.B., STEITZ T.A. The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu. Rev. Biochem.*, 2003, **72**, 813-850.
- MOYER C.L., DOBBS F.C., KARL D.M. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 871-879.
- MULLIS K., FALOONA F., SCHARF S., SAIKI R., HORN G., ERLICH H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1986, **51 Pt 1**, 263-273.
- MULLIS K.B. The polymerase chain reaction in an anemic mode: how to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion. *PCR Methods Appl.*, 1991, **1**, 1-4.
- MUYZER G., DE WAAL E.C., UITTERLINDEN A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 695-700.
- MYERS R.M., FISCHER S.G., LERMAN L.S., MANIATIS T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 1985, **13**, 3131-3145.
- NAGASE N., SASAKI A., YAMASHITA K., SHIMIZU A., WAKITA Y., KITAI S., KAWANO J. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *J. Vet. Med. Sci.*, 2002, **64**, 245-250.
- NAGPAL M.L., FOX K.F., FOX A. Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms? *J. Microbiol. Methods*, 1998, **33**, 211-219.
- NATARAJ A.J., OLIVOS-GLANDER I., KUSUKAWAN., HIGHSMITH W.E., JR. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, 1999, **20**, 1177-1185.
- NOCKER A., BURR M., CAMPER A. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb. Ecol.*, 2007, **54**, 276-289.
- NOLLER H.F. Structure of ribosomal RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, **53**, 119-162.
- OLSEN G.J., LANE D.J., GIOVANNONI S.J., PACE N.R., STAHL D.A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1986, **40**, 337-365.
- ORITA M., IWAHANA H., KANAZAWA H., HAYASHI K., SEKIYA T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, **86**, 2766-2770.
- OXFORD NANOPORE TECHNOLOGY Nanopore sequencing of genomes. [en ligne] Adresse url : <http://www.nanoporetech.com/sections/index/52>, consulté le 19/05/2009.
- PECCOUD J., JACOB C. Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophys. J.*, 1996, **71**, 101-108.
- PEINADO M.A., MALKHOSYAN S., VELAZQUEZ A., PERUCHO M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, **89**, 10065-10069.
- PENG Y., JIN J., WU C., YANG J., LI X. Orthogonal array design in optimizing ERIC-PCR system for fingerprinting rat's intestinal microflora. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, **103**, 2095-2101.
- PODAR M., ABULENCIA C.B., WALCHER M., HUTCHISON D., ZENGLER K., GARCIA J.A., HOLLAND T., COTTON D., HAUSER L., KELLER M. Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 3205-3214.
- PRAVIN D., ATYA K., PUROHIT H.J. Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater-containing hydrocarbons. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2007, **14**, 7-11.
- PRIETO C., JARA C., MAS A., ROMERO J. Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, **115**, 348-355.
- QUELLE L.S., CATALANO M. Efficacy of two DNA fingerprinting methods for typing *Acinetobacter baumannii* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2001, **39**, 215-223.
- RAGHUNATHAN A., FERGUSON

- H.R., JR., BORNARTH C.J., SONG W., DRISCOLL M., LASKEN R.S. Genomic DNA amplification from a single bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 3342-3347.
- RAHALKAR M., SCHINK B. Comparison of aerobic methanotrophic communities in littoral and profundal sediments of Lake Constance by a molecular approach. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 4389-4394.
- RANDAZZO C.L., HEILIG H., RESTUCCIA C., GIUDICI P., CAGGIA C. Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. *J. Appl. Microbiol.*, 2005, **99**, 251-258.
- RANJARD L., POLY F., LATA J.C., MOUGEL C., THIOULOUSE J., NAZARET S. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 4479-4487.
- RICHARDS J.D., GONG J., LANGE C.F.M.D. The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Can. J. Anim. Sci.*, 2005, **85**, 421-435.
- ROSA G.L., CAROLIS E.D., SALI M., PAPACCHINI M., RICCARDI C., MANSIA, PABA E., ALQUATI C., BESTETTI G., MUSCILLO M. Genetic diversity of bacterial strains isolated from soils, contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, by 16S rRNA gene sequencing and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Microbiol. Res.*, 2006, **161**, 150-157.
- RÖSCH C., EILMUS S., BOTHE H. Approaches to assess the biodiversity of bacteria in natural habitats. *Biochem. Soc. Trans.*, 2006, **34**, 169-173.
- ROSENBAUM V., RIESNER D. Temperature-gradient gel electrophoresis: thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys. Chem.*, 1987, **26**, 235-246.
- SADEGHIFARD N., GURTNER V., BEER M., SEVIOUR R.J. The mosaic nature of intergenic 16S-23S rRNA spacer regions suggests rRNA operon copy number variation in *Clostridium difficile* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **72**, 7311-7323.
- SATOKARI R.M., VAUGHAN E.E., SMIDT H., SAARELA M., MATTO J., DE VOS W.M. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2003, **26**, 572-584.
- SAVELKOUL P.H.M., AARTS H.J.M., DE HAAS J., DIJKSHOORN L., DUIM B., OTSEN M., RADEMAKER J.L.W., SCHOULS L., LENSTRA J.A. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 3083-3091.
- SCHUURMAN T., DE BOER R., PATTY R., KOOISTRA-SMID M., VAN ZWET A. Comparative evaluation of in-house manual, and commercial semi-automated and automated DNA extraction platforms in the sample preparation of human stool specimens for a *Salmonella enterica* 5'-nuclease assay. *J. Microbiol. Methods*, 2007, **71**, 238-245.
- SCHWIEGER F., TEBBE C.C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 4870-4876.
- SCUPHAM A.J. Succession in the intestinal microbiota of preadolescent turkeys. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, **60**, 136-147.
- SELVAKUMAR N., DING B.C., WILSON S.M. Separation of DNA strands facilitates detection of point mutations by PCR-SSCP. *Biotechniques*, 1997, **22**, 604-606.
- SETTE L., SIMIONI K., VASCONCELLOS S., DUSSAN L., NETO E., OLIVEIRA V. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2007, **91**, 253-266.
- SHARKEY F.H., BANAT I.M., MARCHANT R. Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 3795-3806.
- SHARMA S., RADL V., HAI B., KLOOS K., MRKONJIC FUKA M., ENGEL M., SCHAUSS K., SCHLOTTER M. Quantification of functional genes from prokaryotes in soil by PCR. *J. Microbiol. Methods*, 2007, **68**, 445-452.
- SHINZATO N., MURAMATSU M., MATSUI T., WATANABE Y. Phylogenetic analysis of the gut bacterial microflora of the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007, **71**, 906-915.
- SINGH B.K., TATE K.R., KOLIPAKA G., HEDLEY C.B., MACDONALD C.A., MILLARD P., MURRELL J.C. Effect of afforestation and reforestation of pastures on the activity and population dynamics of methanotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 5153-5161.
- SINGLETON D.R., FURLONG M.A., RATHBUN S.L., WHITMAN W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 4374-4376.
- SIQUEIRA J.F., ROCAS I.N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections - Part 1: current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J. Endod.*, 2005, **31**, 411-423.
- SMALLA K., OROS-SICHLER M., MILLING A., HEUER H., BAUMGARTE S., BECKER R., NEUBER G., KROPF S., ULRICH A., TEBBE C.C. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results? *J. Microbiol. Methods*, 2007, **69**, 470-479.
- SORENSEN K.B., TESKEA. Stratified communities of active *Archaea* in deep marine subsurface sediments.

- Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **72**, 4596-4603.
- SOULTOS N., MADDEN R.H. A genotyping investigation of the colonization of piglets by *Campylobacter coli* in the first 10 weeks of life. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, **102**, 916-920.
- STAHL D.A., LANE D.J., OLSEN G.J., PACE N.R. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, **49**, 1379-1384.
- STEEMERS F.J., GUNDERSON K.L. Illumina, Inc. *Pharmacogenomics*, 2005, **6**, 777-782.
- STERNM.J., AMESG.F., SMITHN.H., ROBINSON E.C., HIGGINS C.F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*, 1984, **37**, 1015-1026.
- SUCHODOLSKI J.S., RUAUX C.G., STEINER J.M., FETZ K., WILLIAMS D.A. Application of molecular fingerprinting for qualitative assessment of small-intestinal bacterial diversity in dogs. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 4702-4708.
- SUNDIN G.W., DOMEZAS D.H., BENDER C.L. Genetic and plasmid diversity within natural populations of *Pseudomonas syringae* with various exposures to copper and streptomycin bactericides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 4421-4431.
- SWEENEY R.W., WHITLOCK R.H., MCADAMS S.C. Comparison of three DNA preparation methods for real-time polymerase chain reaction confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* growth in an automated broth culture system. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2006, **18**, 587-590.
- THIES F.L., KONIG W., KONIG B. Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting. *J. Med. Microbiol.*, 2007, **56**, 755-761.
- TOBES R., PAREJA E. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for Insertion Sequence elements. *BMC Genomics*, 2006, **7**, 62.
- TORSVIK V., DAAE F.L., SANDAA R.-A., OSLASH, VREAS L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.*, 1998, **64**, 53-62.
- TOTH I.K., AVROVA A.O., HYMAN L.J. Rapid identification and differentiation of the soft rot *erwinias* by 16S-23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 4070-4076.
- VAN DE PEER Y., CHAPELLE S., DE WACHTER R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24**, 3381-3391.
- VAN DER VLIET G.M., SCHEPERS P., SCHUKKINK R.A., VAN GEMEN B., KLATSER P.R. Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994, **38**, 1959-1965.
- VENTER J.C., REMINGTON K., HEIDELBERG J.F., HALPERN A.L., RUSCH D., EISEN J.A., WU D., PAULSEN I., NELSON K.E., NELSON W., FOUTS D.E., LEVY S., KNAP A.H., LOMAS M.W., NEALSON K., WHITE O., PETERSON J., HOFFMAN J., PARSONS R., BADEN-TILLSON H., PFANNKUCH C., ROGERS Y.-H., SMITH H.O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, **304**, 66-74.
- VERSALOVIC J., KOEUTH T., LUPSKI J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**, 6823-6831.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ET AL. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**, 4407-4414.
- WANG P., LI X., XIANG M., ZHAI Q. Characterization of efficient aerobic denitrifiers isolated from two different sequencing batch reactors by 16S-rRNA analysis. *J. Biosci. Bioeng.*, 2007, **103**, 563-567.
- WANG Q., GARRITY G.M., TIEDJE J.M., COLE J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 5261-5267.
- WELSH J., MCCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**, 7213-7218.
- WHITEHOUSE C.A., HOTTEL H.E. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. *Mol. Cell. Probes*, 2007, **21**, 92-96.
- WILLIAMS J.G.K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**, 6531-6535.
- WILSON I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 3741-3751.
- YE N.F., LU F., SHAO L.M., GODON J.J., HE P.J. Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, **103**, 1055-1065.
- YU Z., MORRISON M. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 4800-4806.
- ZENG Y., LIU W., LI H., YU Y., CHEN B. Effect of restriction endonucleases on assessment of biodiversity of cultivable polar marine planktonic bacteria by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Extremophiles*, 2007, **11**, 685-692.
- ZHANG B.W., LI M., MA L.C., WEI F.W. A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples. *Biochem. Genet.*, 2006, **44**, 503-512.
- ZHANG K., MARTINYA.C., REPPAS N.B., BARRY K.W., MALEK J., CHISHOLM S.W., CHURCH G.M. Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning. *Nat. Biotechnol.*, 2006, **24**, 680-686.