

---

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

*Ce chapitre décrit le matériel et les méthodes mis en œuvre au cours des expériences conduites au laboratoire de biotechnologie de l'environnement à Narbonne dans le cadre de cette thèse. Les deux premières parties décrivent respectivement la mise en œuvre en batch de cultures mixte de fermentation et de systèmes bioélectrochimiques. La troisième partie correspond aux différentes méthodes d'analyse utilisées lors des expérimentations et pour l'exploitation des résultats. La quatrième partie décrit les techniques de biologie moléculaire utilisées pour l'analyse des communautés microbiennes.*



## DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

---

### II.1.1. PRODUCTION DE BIOHYDROGENE EN REACTEUR DISCONTINU

---

#### II.1.1.1. MISE EN ŒUVRE

---

Afin de mesurer la production de biohydrogène, des réacteurs en mode discontinu (batch) ont été réalisés à 35°C, sans agitation. Les BHP ont été effectués en bouteilles de 600mL, avec un volume de travail de 200 mL. Une quantité de 5 g/L de glucose a été ajoutée à chaque bouteille ainsi que du tampon MES (2-[N-morpholino] éthane sulfonic acid) ou phosphate à 100 mM, en fonction du pH ciblé (cf *Tableau II-1*), ainsi qu'une solution d'oligoéléments (7.50 g L<sup>-1</sup> FeCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, 0.30 g L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 0.59 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 0.13 g L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O, 0.35g L<sup>-1</sup> ZnCl<sub>2</sub>, 0.13 g L<sup>-1</sup> NiCl<sub>2</sub>,6H<sub>2</sub>O, 0.075 g L<sup>-1</sup> CuCl<sub>2</sub>,2H<sub>2</sub>O, 0.13 g L<sup>-1</sup> NaMoO<sub>4</sub>,2H<sub>2</sub>O) et de chlorure d'ammonium à 100 mM.

L'inoculum correspondait à des sédiments prélevés dans les salins de Saint Martin à Gruissan. Il a été ajouté en fixant le rapport substrat/inoculum (gDCO substrat/ gMV) inoculum entre 10 et 15, tel que décrit dans le *Tableau II-1*. Le pH initial a été ajusté à l'aide d'une solution de NaOH 1N. Le ciel gazeux de chaque bouteille a été rincé à l'azote (N<sub>2</sub>) afin d'assurer des conditions d'anaérobiose stricte. Chaque condition a été testée en triplicats.

Le volume de biogaz produit a été quantifié par mesure de la pression de l'espace de tête à l'aide d'un manomètre (Mano 2000, Leo 2 Keller). Le volume de biogaz a été déduit de la loi des gaz parfaits ; La composition du biogaz (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>) a été analysée à l'aide d'un chromatographe associé à un catharomètre (Clarus 580, Perkin Elmer), selon un protocole décrit dans le paragraphe II.3.4 en page 91.

Tableau II-1 : pH, nature et quantité du tampon (mM) et milieu utilisés lors des différentes expériences de fermentation

Expérience	Chapitre	pH	Substrat/Inoculum (gDCO <sub>substrat</sub> /gMV <sub>inoculum</sub> )	Tampon MIES	Tampon Phosphate	Solution d'oligo-éléments	Milieu Starkey modifié
Fermentation en milieu salin à pH 8	III.1.2	8	15	-	100 mM	X	-
Fermentation en milieu salin à pH 6	III.1.3	6	15	100 mM	-	X	-
Couplage Fermentation / Electrolyse microbienne : Influence des espèces exogènes sur le biofilm électroactif (production de biomasse)	Chapitre V	6	10	50 mM	-	-	X
		7					
		8					

### II.1.1.2. ANALYSE DES DONNEES DE PRODUCTION D'HYDROGENE

Dans les cultures en batch réalisées pour la production d'hydrogène, les courbes de suivi de l'hydrogène ont présenté, en phase de production d'hydrogène, une allure de courbe exponentielle de croissance. L'utilisation d'un modèle a permis de déterminer des paramètres cinétiques de la production d'hydrogène. Le type de modèle le plus rencontré est le modèle de Gompertz modifié qui s'applique principalement dans le cas des cultures pures en batch (Wang and Wan, 2009c; Rafrafi, 2010). Par extension, ce modèle a aussi été utilisé pour les cultures mixtes. L'intérêt de cette courbe est qu'elle fournit une méthode permettant la comparaison des productions par rapport aux données de la littérature. La courbe de Gompertz est décrite par l'équation suivante :

$$H_2(t) = H_{2\max} \cdot \exp[-\exp(V_{\max} \cdot \exp(1) / H_{2\max} (\lambda \cdot t + 1))]$$

Avec :  $H_2(t)$  : hydrogène cumulé en fonction du temps ;  $H_{2max}$  : quantité maximale d'hydrogène produite ;  $V_{max}$  : vitesse de production maximale d'hydrogène ;  $\lambda$  : temps de latence

L'ajustement de Gompertz a été réalisé sous Matlab® suivant une méthode de régression non linéaire par minimisation de l'erreur des moindres carrés.

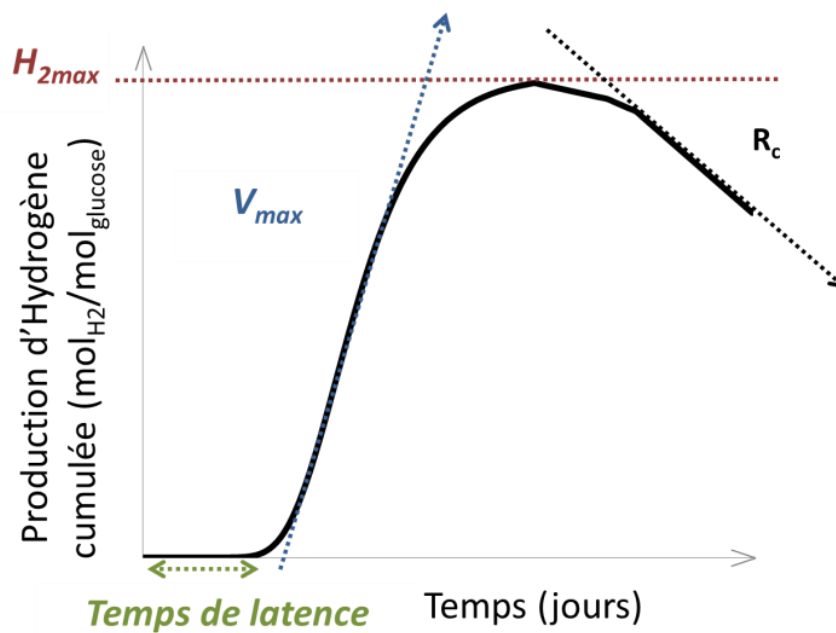


Figure I-1 : Courbe de production d'hydrogène en Batch.

Les paramètres de Gompertz sont obtenus pour la première phase de production d'hydrogène. Les valeurs estimées de  $H_{2max}$  et de  $V_{max}$  correspondent au potentiel de production d'hydrogène (en  $\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ ) et à la vitesse de production maximale d'hydrogène (en  $\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}/\text{jour}$ ). La vitesse de consommation  $R_c$  a été estimée par la diminution mesurée expérimentalement de la quantité d'hydrogène, ramenée à la quantité  $H_{2max}$  initiale.

## II.1.2. ELECTROLYSE MICROBIENNE

### II.1.2.1. REACTEURS ELECTROCHIMIQUES

#### II.1.2.1.1. Cellule à trois électrodes

Le système utilisé pour l'étude du biofilm était un système à trois électrodes mettant en jeu une électrode de travail, support du biofilm, une électrode de référence, permettant d'appliquer un potentiel à l'électrode de travail et une contre-électrode permettant de mesurer le courant généré par le biofilm sur l'électrode de travail.

Ces essais dits en « demi-cellule » ont été réalisés dans des réacteurs de 700 mL surmontés d'un couvercle permettant de maintenir 1 à 3 électrodes de travail, une électrode de référence (Ag/AgCl ou ECS), une contre-électrode (grille de platine). Le réacteur était clos hermétiquement grâce à un joint en silicone et une bague à sertir en acier. Le réacteur est maintenu à 37°C grâce à un bain marie maintenu à température avec un thermostat (Polystat). Le milieu est homogénéisé jusqu'à l'adhésion sur l'électrode des espèces électroactives par un barreau aimanté en rotation à 250 rpm.

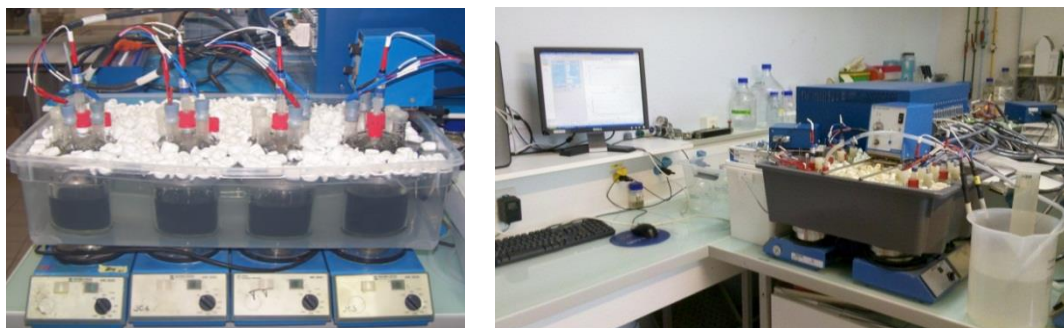


Figure I-2 : Mise en place des réacteurs en demi-cellule dans un bain marie maintenu à 37°C et agité par agitation magnétique à 250 rpm.

#### II.1.2.1.2. N-Stat : Réacteur à plusieurs électrodes de travail

Le dispositif NStat (Bio-Logic SA) permet de placer dans un même bioréacteur plusieurs électrodes de travail pour le développement de biofilms électroactifs. Ces électrodes ont été construites par des plaques de graphite d'une surface totale de 13 cm<sup>2</sup> accrochées sur des tiges de titane (cf. II.1.2.2.1). Le dispositif était complété par une contre électrode de platine et une électrode de référence qui permettait le maintien par le potentiostat (VMP3 BioLogic

Science Instruments) du potentiel appliqué (+0,200 V vs ECS). La contre électrode constituait la cathode du système où se déroule la réduction des protons en dihydrogène. Une sortie gaz et une sortie liquide ont été mises en place pour assurer l'échantillonnage dans les deux phases.

La grille de platine utilisée avec le N-Stat présente la même maille qu'en demi-cellule mais une taille plus grande, de 5x5 cm afin d'assurer une surface non-limitante par rapport à l'électrode de travail en graphite.

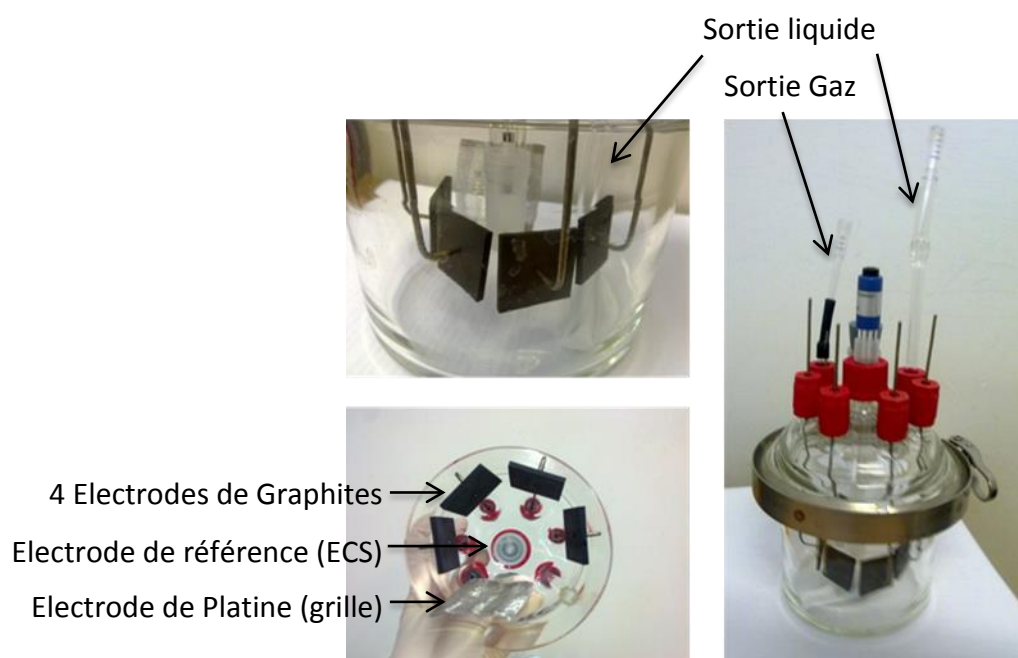


Figure I-3 : Dispositif N-Stat utilisé contenant 4 électrodes de travail en graphite, 1 électrode de référence au calomel saturé (ECS) et une contre électrode en platine (grille)



Figure I-4 : Branchement des électrodes dans un réacteur en configuration N-Stat dans un bain-marie.

## II.1.2.2. MATERIEL ELECTROCHIMIQUE

### II.1.2.2.1. Electrodes

Les électrodes de travail en graphite étaient des plaques de dimension 25 mm x 25 mm x 2 mm (Goodfellow) connectées électriquement par une tige de titane (diamètre 2 mm, Goodfellow) filetée et vissée dans l'électrode. Ces électrodes étaient préalablement nettoyées à l'eau et au papier de verre P800, puis rincées à l'éthanol et conservées dans une solution d'éthanol (50/50 v/v).

Deux types d'électrodes de référence ont été utilisés :

- une électrode au calomel saturé (ECS, Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Cl)
- une électrode au chlorure d'argent : chlorure d'argent préparé à partir d'un fil d'argent (diamètre 1.5 mm, Goodfellow) plongé successivement dans une solution d'acide nitrique à 65 % puis dans une solution saturée de KCl.

Les électrodes de référence ont été conservées dans une solution de KCl saturée.

Les contre-électrodes correspondaient à des grilles de platine/iridium (90%/10%) (Heraeus) de diamètre de fil 0.25 mm et de largeur de maille 0.75 mm et de dimension totale 25 mm x 25 mm pour les réacteurs à 3 électrodes et 50 mm x 50 mm pour les réacteurs N-Stat. Elles ont été préalablement traitées sous la flamme d'un bec Bunsen pendant une minute avant d'être utilisées.

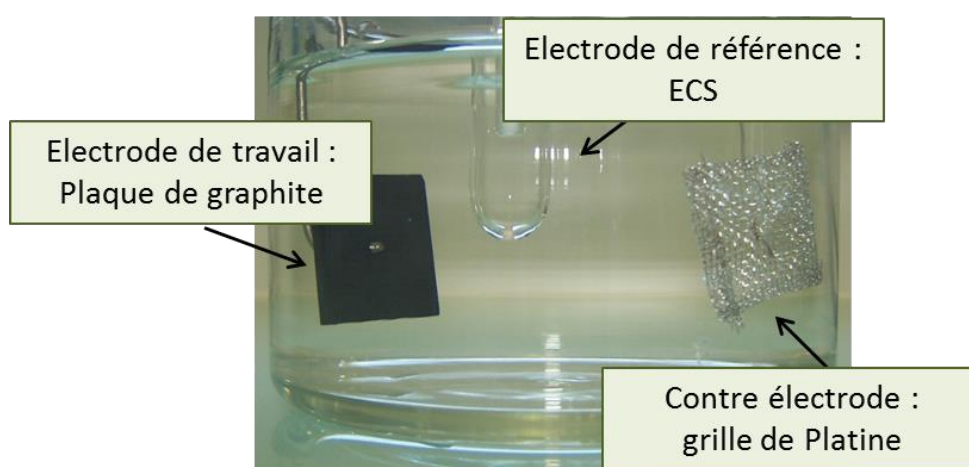


Figure I-5 : Dispositif expérimental à 3 électrodes.



#### II.1.2.2.2. Chrono-ampérométrie

La chronoampérométrie consiste à imposer un potentiel constant à l'électrode de travail et à enregistrer la réponse en production de courant au cours du temps. Les courants enregistrés sont divisés par la surface de l'électrode de travail et sont donc exprimés en densité de courant  $j$  (A/m<sup>2</sup>).

L'ensemble des mesures électrochimiques a été réalisé avec un multipotentiostat (VMP, Bio-Logic S.A., France) piloté par le logiciel EC- Lab. Le potentiel appliqué était de +0,2 V vs Ag/AgCl ou ECS. Le courant était enregistré toutes les 300 s. La durée totale d'une chronoampérométrie était d'environ 15 jours.

Nota : Plusieurs électrodes de travail placées dans un même milieu peuvent être polarisées indépendamment via une unique électrode de référence et une unique contre-électrode par l'utilisation du dispositif N-Stat (Bio-Logic SA) (cf. II.1.2.1.2).

## II.2. INOCULA ET MILIEUX

Les sédiments utilisés comme inoculum ont été fraîchement prélevés à partir de sédiments de bord du lac salé de Gruissan (Aude) ou de sédiments issus d'un canal de récupération des eaux des plateformes des salins de Saint-Martin à Gruissan. Le pH des sédiments issus des salins de Saint-Martin dans leur milieu était de 8 et la concentration en chlorure de sodium dans les sédiments de 67,4 g<sub>NaCl</sub>/L. Ces sédiments contenaient 0,481±0.008 g<sub>MS</sub>/g<sub>sédiments</sub> et 0,042 g<sub>MV</sub>/g<sub>sédiments</sub>. La conductivité de cet inoculum était de 105,6 mS/cm



Figure I-6 : Sédiments issus des salins de Saint Martin (Gruissan, Aude)

Les inocula « Fermenteur », « curet », « vinasses », « compost » et « sol » ont été utilisés pour une présélection d'inocula. Leurs concentrations en matières sèches et volatiles ainsi que leurs conductivités sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau I-2 : Caractéristiques (MS, MV et conductivité) des inocula utilisés pour la présélection d'un inoculum.

Inoculum	Matières Sèches (g <sub>MS</sub> /g)	Matières Volatiles (g <sub>MV</sub> /g)	Conductivité (mS/cm)
Fermenteur	0,018	0,015	5,83
Curet	0,354	0,013	7,15
Vinasses	0,009	0,005	5,71
Compost	0,023	0,005	5,80
Sol	0,079	0,006	6,03

## II.3. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

---

### II.3.1. MESURE DE LA CONCENTRATION EN ACIDES GRAS VOLATILS (AGV) PAR CPG

---

L'analyse des acides gras volatils (AGV) a été réalisée à l'aide d'un chromatographe GC Clarus 580 (Perkin Elmer). Les échantillons liquides étaient contenus dans des flacons de 1 mL disposés dans un passeur automatique. Chaque flacon contenait 300  $\mu$ L d'échantillon et 300  $\mu$ L d'une solution d'étalon interne d'acide éthyl 2 butyrique à 1 g/L. Une seringue prélevait automatiquement 0,5  $\mu$ L d'échantillon et le plaçait dans l'injecteur, chauffé à 250°C. La colonne utilisée est une ELITE FFAP, 15000 x 0,53 mm, (Perkin Elmer). Le four était chauffé sous un gradient de température de 80 à 120°C. Le gaz vecteur était de l'azote à 6mL/min. La température de l'injecteur était fixée à 250°C et celle du détecteur FID à 280°C.



Figure I-7 : Chromatographe GC Clarus 580 (Perkin Elmer) et son passeur automatique

### II.3.2. MESURE DE LA CONCENTRATION DES ACIDES ORGANIQUES PAR HPLC

---

Les concentrations en sucres résiduels et sous-produits métaboliques tels que les acides organiques (lactate, formate, AGV) et les alcools (éthanol, butanol...) ont été mesurées par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Après centrifugation à 20 000 g pendant 10 minutes le surnageant de l'échantillon est récupéré et est directement placé sur le passeur. L'HPLC était équipée d'un passeur automatique et couplée à un réfractomètre (Waters R410). Une pré-colonne (Micro guard cation H refill cartbridges, Bio-Rad) était disposée en amont de la colonne pour filtrer les éventuels résidus de l'échantillon. Au moment de l'analyse, 10 $\mu$ L d'échantillon étaient injectés dans la colonne à l'aide d'une seringue automatique. Les composés étaient séparés en utilisant une colonne Aminex HPX-

87H, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad) placée dans un four. Une solution d'  $H_2SO_4$  à  $0.222 \mu\text{L.L}^{-1}$  était utilisée comme éluant.

La température de la colonne était fixée à  $35^\circ\text{C}$ , la température du réfractomètre à  $40^\circ\text{C}$  et le débit de l'éluant à  $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$ .



Figure I-8 : Chromatographe liquide haute performance (HPLC)

### **II.3.3. MESURE DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE**

---

La concentration en biomasse, lors des expérimentations, a été évaluée à partir de la mesure des matières volatiles (MV), selon les Standards Methods (APHA et al., 1995).

Les sédiments ont été introduits dans un creuset en porcelaine préalablement séché et pesé. Le creuset a été mis à l'étuve à  $105^\circ\text{C}$  pendant 24 heures. L'eau ainsi évaporée, il ne reste dans le creuset que les matières en suspension (MS). Le creuset est ensuite pesé après refroidissement dans un dessiccateur. La différence de masse entre le creuset après son passage à l'étuve et le creuset vide correspond donc aux MS de l'échantillon. En considérant la masse de liquide initial, la mesure est exprimée en  $\text{g.g}_{\text{sédiments}}^{-1}$ .

Le creuset a ensuite été mis au four à  $550^\circ\text{C}$  pendant 2 heures. Après refroidissement le creuset a de nouveau été pesé, ne restant plus que les matières minérales. La masse des MV est obtenue par différence entre la masse des MS et la masse des matières minérales.

### II.3.4. MESURE DE LA COMPOSITION DE BIOGAZ

---

La composition du gaz a été déterminée à partir d'un prélèvement effectué directement dans le ciel gazeux de la fiole ou du réacteur à l'aide d'une seringue. Ainsi, 0,2 mL de gaz a été analysé par chromatographie en phase gazeuse.

La composition en biogaz ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$ ,  $H_2$  and  $N_2$ ) a été analysée à l'aide d'un chromatographe (Clarus 580, Perkin Elmer) équipé de deux colonnes : une colonne RtQBond et un tamis moléculaire (Molsieve, 5Å), ainsi que d'un détecteur de conductivité thermique (TCD). La première colonne (RtQBond) était utilisée pour séparer  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $N_2$ , et  $CH_4$  et la seconde (RtMolsieve) pour séparer le  $CO_2$  des autres gaz. La calibration a été réalisée avec un gaz standard (Linde™) composé de 25%  $CO_2$ , 2%  $O_2$ , 10%  $N_2$ , 5%  $H_2$  et 58%  $CH_4$ . Toutes les valeurs de potentiel hydrogène sont exprimées en conditions standards (0°C, 1013hPa).

Le gaz vecteur utilisé était de l'argon placé à une pression initiale de 3.5 bar. La température du four était de 60°C, celle de l'injecteur, de 250°C et celle du détecteur de 150°C. La détection a été réalisée à l'aide d'un détecteur de conductivité thermique (principe du pont de Wheatstone) dont l'intensité du courant était fixé à 40 mA.



Figure I-9 : Chromatographe Clarus 580 (Perkin Elmer)

### II.3.5. MESURE DE LA CONDUCTIVITE

---

La conductivité (mS/cm) et la salinité (g/L) ont été mesurées à l'aide d'un conductimètre Multi 340i (WTW) équipé d'une cellule de mesure de conductivité (TetraCon® 325)

## **II.4. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES**

---

### **II.4.1. EXTRACTION DE L'ADN**

---

Une méthode spécifique d'extraction d'ADN a été sélectionnée car elle permet d'obtenir de bons résultats malgré des échantillons contenant des inhibiteurs et/ou peu de matière.

Les échantillons provenant des différents bioréacteurs ont été traités selon cette méthode d'extraction. Pour éviter sa dégradation lors de sa décongélation, l'ADN a d'abord été protégé par l'ajout de guanidine et N-LS 10%. Puis le mélange de Lauryl-sarosine 5% – tampon phosphate 0,1 M a permis la lyse des membranes bactériennes (activité du détergent ionique). Les échantillons ont été homogénéisés à l'aide d'un vortex pendant une minute puis ont été incubés une heure dans un bain-marie à 70°C. Les échantillons ont ensuite été placés pendant 30 secondes et à vitesse maximale dans un vibro-broyeur (FastPrep 24® MP™) après l'ajout de 500 µL de billes de zirconium. Environ 15 mg de PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone) ont été ajoutés aux mélanges pour fixer certains inhibiteurs de la polymérase (acides humiques). Un passage au vortex et une centrifugation de 3 minutes à vitesse maximale a permis de récupérer les surnageants.

Les culots contenant les billes de zirconium ont été traités par trois lavages successifs au TENP (Tris-Cl 50mM, EDTA pH 8 20mM, NaCl 100mM et PVPP 1%). Cette étape permet de récupérer une quantité maximale d'ADN, d'éliminer les inhibiteurs de la polymérase et de chélater les cofacteurs des ADNases et autres enzymes dégradant le matériel génétique en empêchant ainsi leur action. Ces lavages se sont déroulés par ajout successif de 500 µL du mélange TENP, suivi de 3 minutes de centrifugation à 20 000 g. Les surnageants récupérés ont été mélangés dans un même tube Eppendorf de 2 mL par échantillon.

La précipitation de l'ADN et l'élimination des impuretés résiduelles ont été réalisées comme suit : les surnageants sont répartis en deux tubes de 1 mL dans lesquels un volume d'isopropanol a dû être ajouté (1 mL). Une agitation lente est appliquée aux tubes. Les échantillons sont ensuite laissés 10 minutes à température ambiante. Après 15 minutes de centrifugation à 20 000 g, les culots ont été récupérés dans de l'eau pour préparations injectables (ppi) et réunis. Cette étape de purification d'ADN a alors été complétée par un ajout de RNase à 1mg/mL, un passage au vortex et une incubation de 10 minutes à 37°C.

L'ADN a été purifié selon le protocole du kit Qlamp DNA stool® Mini Kit.

Après les étapes d'extraction et de purification, la pureté et la quantité d'ADN extraits ont été vérifiées par mesure des absorbances à 260 et 280 nm (spectromètre Infinite M 200 NanoQuant, Tecan). Le ratio DO260nm/DO280nm permet de vérifier la pureté de l'ADN. Il doit être compris entre 1,8 et 2.



Figure I-10 : spectromètre Infinite M 200 NanoQuant (Tecan)

#### II.4.2. AMPLIFICATION DE L'ADN PAR PCR

La PCR est une procédure rapide d'amplification *in vitro* des fragments d'ADN grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques qui encadrent la région ciblée, d'une ADN polymérase thermorésistante et de briques élémentaires d'ADN (nucléotides : dNTP). Les conditions opératoires telles que les amorces, la polymérase utilisée et les durées des différentes étapes des cycles d'amplification varient en fonction des techniques mises en place après la PCR.

Dans le cas de la PCR précédant la SSCP, la région V3 du gène codant l'ARNr 16S (d'environ 200 pb) a été amplifiée pour cibler spécifiquement les bactéries à l'aide des amorces universelles W49 et W104. Afin de permettre la détection du fragment amplifié par le laser de la CE-SSCP, l'amorce w104 était marquée par un fluorochrome. Chaque mix PCR (50  $\mu$ L) contenait 36,9  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O pure, 5  $\mu$ L de tampon 10x Pfu Turbo, 4  $\mu$ L de dNTP (2,5 mM), 1,3  $\mu$ L de W49 (100ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>), 1,3  $\mu$ L de W104 (100ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>), 0,5  $\mu$ L Pfu Turbo (2,5 U/ $\mu$ L) et 1  $\mu$ L d'ADN (dilué si nécessaire). Les différents cycles de la PCR ont été réalisés dans un Mastercycler egradient S (Eppendorf) (Figure I-11). La région V3 a été amplifiée en appliquant le programme suivant : 2 minutes de dénaturation de l'ADN à 94°C, puis 25 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 61°C et 30 secondes de



ligation à 72°C. Une fois les 25 cycles terminés, une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72°C a été effectuée.

L'efficacité des PCR a été vérifiée à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent) (Figure I-11) qui permet l'analyse des produits PCR par électrophorèse miniaturisée. L'ajout d'un marqueur fluorescent a permis de détecter les fragments d'ADN par fluorescence aux UV induite par un laser. Cette technique est basée sur le principe de l'électrophorèse qui permet de séparer les brins d'ADN en fonction de leur poids moléculaire. Les acides nucléiques, chargés négativement, migrent sous l'effet d'un champ électrique. La séparation s'effectue au travers d'un gel matrice. Le maillage est plus ou dense selon le pourcentage d'agarose. Plus les molécules sont petites plus elles migrent rapidement. L'intensité des bandes permet d'estimer les dilutions à effectuer pour la CE-SSCP.



Figure I-11 : à gauche : Mastercycler epgradient S (Eppendorf) pour l'amplification de l'ADN par PCR, à droite : Bioanalyzer 2100 (Agilent) pour l'analyse des produits de PCR.

#### **II.4.3. QUANTIFICATION DES COMMUNAUTE MICROBIENNES PAR PCR QUANTITATIVE**

---

La PCR quantitative permet le suivi en continu (« en temps réel ») du processus d'amplification par PCR en détectant la fluorescence émise par le produit PCR. La quantification se fait en comparant l'échantillon étudié amplifié à un échantillon de référence. Une quantification absolue de l'échantillon testé pourra être obtenue en nombre de copies grâce à l'utilisation comme référence d'un échantillon où le nombre de molécule est connu.



La réaction de quantification des bactéries par PCR quantitative (qPCR) a été réalisée dans des plaques RT-PCR 96 puits (Eppendorf) par un Mastercycler ep realplex2S (Eppendorf). L'amplification a été réalisée pour les bactéries dans 25 µL de mélange PCR contenant 12,5 µL d'Express qPCR Supermix pré-mélangé à du ROX (Invitrogen), 5 µL d'ADN dilué, 100 nM de l'amorce BAC338F, 250 nM de l'amorce BAC805R, et 50 nM de sonde TaqMan, complétés avec de l'eau pure pour obtenir le volume réactionnel souhaité. Le programme de température appliqué était de 95°C pendant 2 min, suivi de 40 cycles de 15 s à 95°C, 1 min à 60°C. Une courbe de référence a été générée pour chaque essai en utilisant 10 degrés de dilution d'un produit PCR provenant de clones connus. Le clone DF10 a été utilisé comme standard de référence pour les bactéries. Chaque échantillon est testé en 3 dilutions.

#### **II.4.4. CARACTERISATION DE LA COMMUNAUTE MICROBIENNE PAR CE-SSCP**

---

Les empreintes moléculaires, basées sur la mise en évidence de la variabilité de longueur et/ou de séquence nucléotidique des fragments amplifiés, permettent d'avoir rapidement une image représentative de l'ensemble de la communauté microbienne.

La technique d'analyse de polymorphisme de conformation d'acides nucléiques simples brins par électrophorèse capillaire (CE-SSCP : Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism) est basée sur la migration différentielle des brins d'ADN simple brin selon leur structure secondaire (Figure I-12). La migration a été réalisée, en CE-SSCP, dans un séquenceur équipé de capillaires, contrairement aux méthodes classiques d'électrophorèse sur gel en gradient (DGGE, TGGE ou TTGE). Elle est donc plus précise, reproductible et permet d'analyser un plus grand nombre d'échantillons. Le principe de cette méthode réside dans le marquage de l'une des deux amorces utilisées en PCR un fluorophore. En conséquence, un seul des deux brins des fragments néoformés est marqué. Les fragments ont ensuite été dénaturés thermiquement (à 95°C) puis refroidis brusquement (à 0°C). Chaque fragment d'ADN simple brin adopte alors une conformation tridimensionnelle secondaire unique et répétable. La formamide déionisée permet de maintenir cette conformation. Cette dernière dépend de la composition en bases azotées (A, G, C ou T) du fragment d'ADN et de la succession de ces bases azotées. Lors de la migration électrophorétique de l'ADN simple brin dans le capillaire, la masse moléculaire et la structure secondaire de chaque brin définissent la vitesse de migration de chaque fragment.

Lors de leur passage devant un détecteur laser, l'intensité de fluorescence émise est mesurée et transcrite sous la forme d'un pic. Elle est proportionnelle au nombre de brins marqués de même conformation. Chaque pic représente une « espèce moléculaire ». Cependant des phénomènes de co-migration peuvent intervenir et plusieurs espèces différentes peuvent générer un même pic.

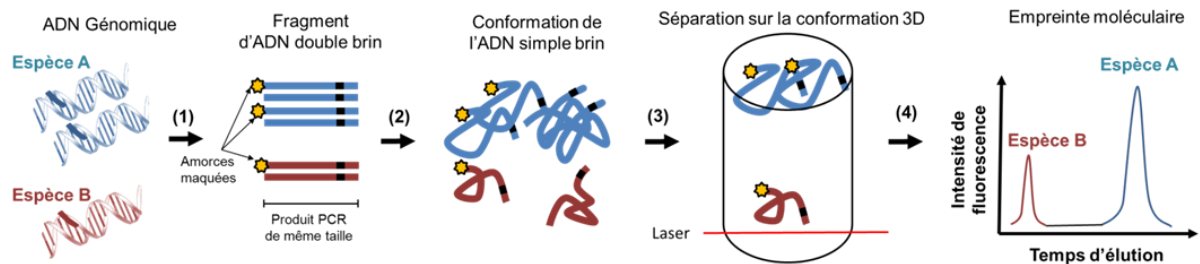


Figure I-12 : Principe de la CE-SSCP (Braun, 2012)

Un volume de 1  $\mu\text{L}$  de produit PCR amplifié à l'aide du couple d'amorces W49/W101 marqué en 5' (fluorophore FAM) a été dilué dans de l'eau ppi, de manière à ce que la fluorescence émise ne dépasse pas la limite de détection du laser. 1  $\mu\text{L}$  de chaque dilution a ensuite été déposé dans une plaque 96 puits avec 18.8  $\mu\text{L}$  de formamide et 0.2 %L de standard interne GeneScan ROX (Applied Biosystems). Ce dernier permet d'attribuer à chaque fragment une position de migration spécifique de sa structure secondaire, donc de sa séquence. Les échantillons ont ensuite été dénaturés par chauffage (5 min à 95°C), puis refroidis rapidement (10 min dans de la glace).

L'électrophorèse a été réalisée en séquenceur par l'ABI Prism 3130 genetic analyser (Applied Biosystems, Figure I-13). Les fragments d'ADNr 16S migrent dans un capillaire (47cm $\times$ 50 $\mu\text{m}$ ) rempli à 5,6% d'un polymère d'analyse de conformation (GeneScan polymer, Applied Biosystems). Chaque amorce marquée par un fluorophore est détectée par le laser de l'appareil, qui transcrit le signal sous la forme d'un pic où chaque pic correspond à un fragment d'ADN. La migration de chaque échantillon a été réalisée à 32°C sous une intensité de courant de 12 kV pendant 320 minutes.



Figure I-13 : Séquenceur capillaire SSCP ABI Prism 3130 genetic analyser

Chaque profil CE-SSCP a été aligné avec un standard interne ROX pour corriger toute modification de la mobilité électrophorétique entre les différents passages. La somme des surfaces des pics a été normalisée à l'unité avant l'analyse statistique. La complexité des communautés microbiennes a été estimée en utilisant l'indice de Simpson (D) à partir des profils (Simpson 1949). Cet indice a été calculé à partir du nombre de pic et de leur abondance relative (aire sous les pics) avec à la formule suivante :

$$D = -\ln(\sum(\text{aire des pics})^2)$$

Ces étapes de traitement des profils ont été réalisées à l'aide du package StatFingerprints (Michelland et al., 2009) sur la version 2.11.1 de R (R. Development Core Team, 2010)

Une analyse en composante principale (ACP) a été faite en utilisant le logiciel R (Michelland et al., 2009) afin de visualiser et analyser rapidement les corrélations entre les profils CE-SSCP, de visualiser et d'analyser les observations initialement décrites par les variables sur un graphique à deux dimensions, construit de manière à ce que la dispersion entre les données soit aussi bien préservée que possible. L'ACP est une méthode de projection permettant de visualiser une série de données dans des dimensions réduites. Cette étape a permis de comparer sur un graphique, les relations entre les profils CE-SSCP entre eux. En pratique, les profils SSCP sont divisés en 824 parties (correspondant aux scans individuels du laser). Les individus consistent à chaque profil SSCP et les variables à chacune des 824 parties du profil.

## II.4.5. PYROSEQUENÇAGE

Le séquençage permet de déterminer l'enchaînement des nucléotides d'une séquence d'ADN donnée. Cette méthode consiste à séquencer un ADN monobrin par synthèse du brin complémentaire, base par base, en détectant pour chaque étape le nucléotide qui a été ajouté. Le pyroséquençage par la technologie 454-FLX Titanium a pour avantage d'être rapide et moins coûteux que les méthodes de séquençage classiques. Les échantillons d'ADN sont amplifiés dans une émulsion de fines gouttelettes, puis sont fixés sur des billes et placés dans des micropuits où s'effectuent le pyroséquençage. Le nucléotide (A, T C, G) est lu dès qu'il s'incorpore à la séquence en synthèse (Figure I-14). Chaque nucléotide est donc incorporé successivement à la réaction (contrairement aux méthodes classiques d'amplification PCR). Chaque nucléotide incorporé dans le brin d'ADN synthétisé libère un pyrophosphate (PPi). Ce PPi est transformé en ATP par une ATPsulfurylase et une luciférase couple cet ATP à une luciférine. Le produit de ce couplage est une oxyluciférine qui émet un signal lumineux capté par le scanner du séquenceur. Le surplus de nucléotides dans le milieu est dégradé par une apyrase. Le processus peut alors se poursuivre avec l'ajout d'un autre nucléotide.

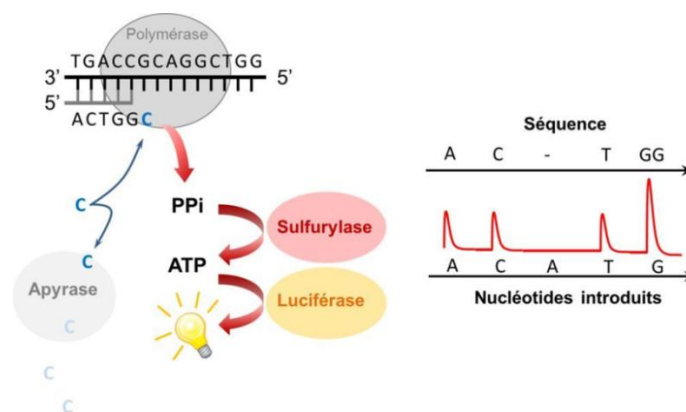


Figure I-14 : Principe du pyroséquençage (Braun, 2012)

Après sélection à partir des profils SCCP, les échantillons d'ADN totaux paraissant comme les plus intéressants ont été envoyés à la société Research and Testing Laboratory (Lubbock, USA). Le séquençage de l'ADNr 16S des bactéries a été réalisé sur GS-FLX 454 Titanium de Roche et les analyses bioinformatiques standard (contrôles qualité du process, qualité des séquences, groupement en OTU) ont été réalisées par cette même société. Les noms des espèces indiqués ce travail sont ceux de l'espèce cultivée la plus proche.