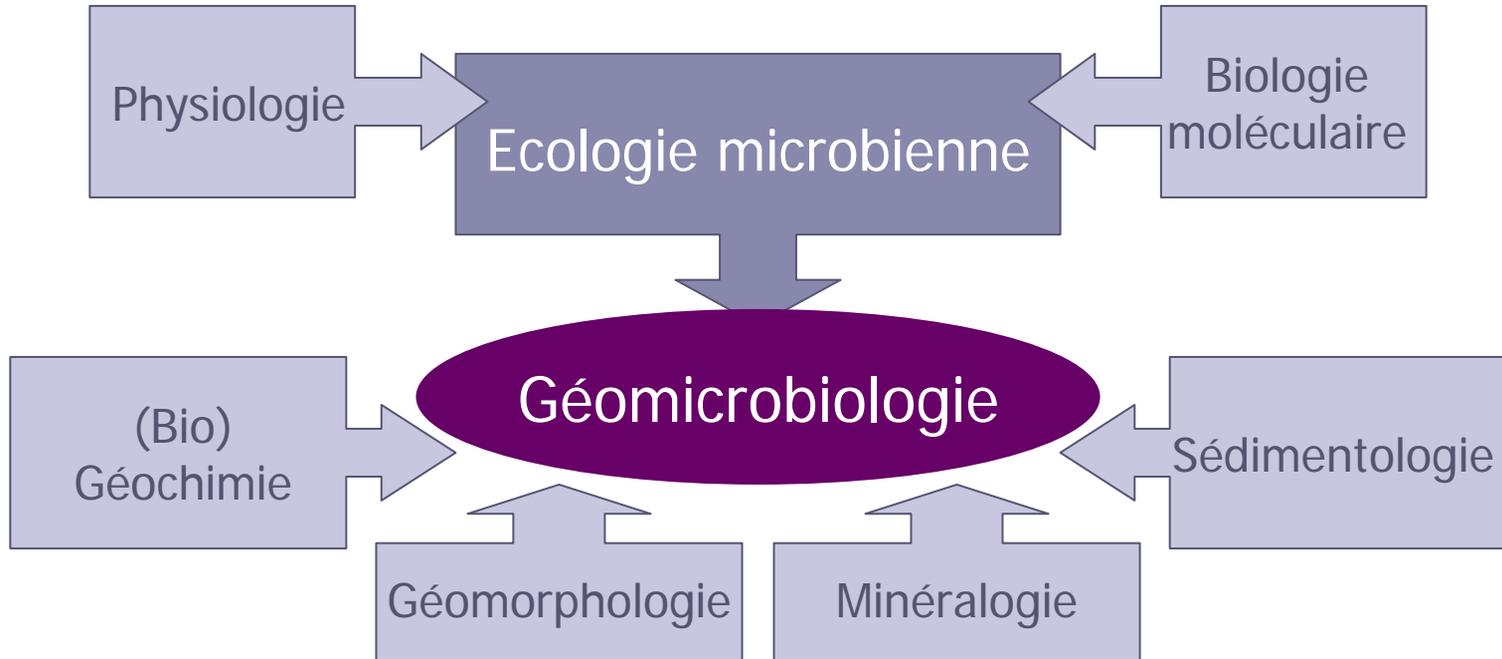


Une science interdisciplinaire



Intégration de phénomènes aux échelles de temps très différentes

Challenges et limitations

Identification d'un processus
(les microbes érodent activement les roches)



Démonstration de la présence
de microbes *in situ*



Isolation en culture pure



Reproduction du phénomène
par inoculation sur un substrat stérile

➡ Les processus sont lents

➡ Les roches sont dures,
les microbes petits et fragiles

➡ Toutes les espèces ne sont
pas cultivables/ symbiontes

➡ Les processus sont lents

Outils

Identification d'un processus
(les microbes érodent activement les roches)



Démonstration de la présence
de microbes *in situ*



Isolation en culture pure



Reproduction du phénomène
par inoculation sur un substrat stérile

- ➡ Observations de terrains
- ➡ Techniques non destructives
Microscopie LN et électronique,
extractions de biomarqueurs ...
- ➡ Techniques moléculaires
alternatives
- ➡ Palette analytique et
expérimentale,
Analyses *in situ* (μsenseurs)

Les micro-organismes

➡ Organisme vivant unicellulaire ou à cellules non différenciées de taille micrométrique, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique :

- les procaryotes (bactéries et archées)
 - les champignons inférieurs : filamenteux, levures
 - les protozoaires
 - les algues
 - les parasites multicellulaires
- } protistes

+ agents infectieux non-vivants (ne possède pas de cellules) : parasites intracellulaires qui ne peuvent se reproduire qu'en utilisant la machinerie cellulaire d'un autre organisme tels que les virus, prions

➡ Ubiquité des micro-organismes :

- le sol
- l'eau (les rivières, les mers, les lacs...)
- les organismes vivants (ils sont au nombre de 100 000 par cm² de peau)..
- même en conditions extrêmes de pression, température, salinité, etc.

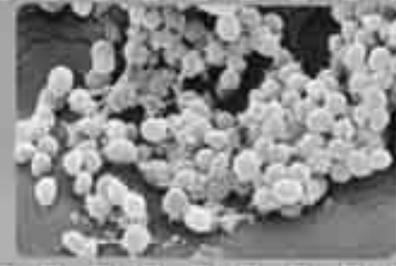
➡ Types de métabolisme très variés :

Interagissent chimiquement avec de nombreux minéraux et fluides géologiques

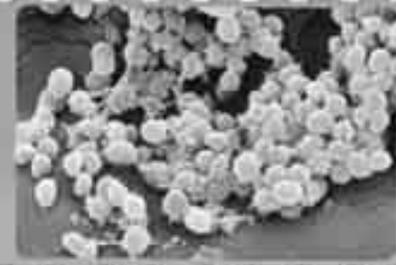
La croissance microbienne

Facteurs limitants

- Disparition d'un composé essentiel à la nutrition bactérienne
- Mécanisme de régulation (produit final de la réaction toxique, ...)
- Mécanisme de compétition entre les micro-organismes
- Variations physico-chimiques du milieu : pH, température...
- Présence d'agents chimiques ou bactériostatiques



Les biofilms

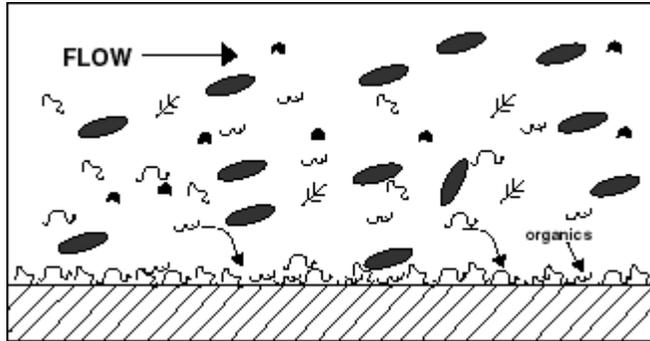


Les biofilms

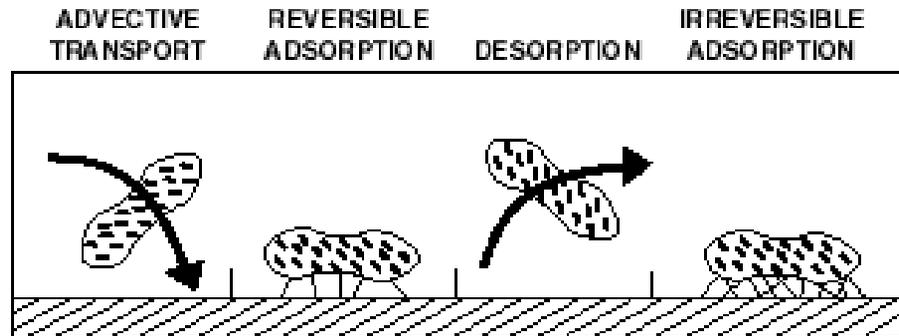
Assemblage constitué de colonies microbiennes fixées sur un support et enfermées dans une gangue polymère encapsulatrice (constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques,...) attachée à une surface inerte ou vivante

- Plus de 99% des bactéries vivent en communauté dans des biofilms
- Leur organisation et leur métabolisme dépendent de la nature de la surface et de l'environnement physico-chimique.
- Substances polymériques facilite l'attachement mais permet également les échanges ioniques pour concentrer les nutriments et prévenir de la déshydratation
- Dans un biofilm mature, 75-95% du volume est occupé par les EPS (substance polymérique extracellulaire) et 5-25% par les cellules bactériennes
- Caractérisé par de grandes hétérogénéités spatiales du fait des variations métaboliques importantes à l'intérieur du biofilms et à l'interface milieu liquide/milieu solide
- Aspect gélatineux du fait de la forte teneur en eau

Step 1.
Surface conditioning

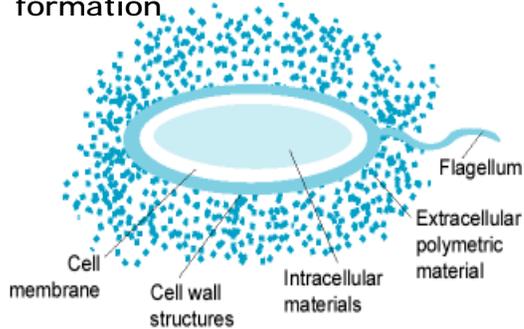


Step 2.
Adhesion of 'pioneer' bacteria

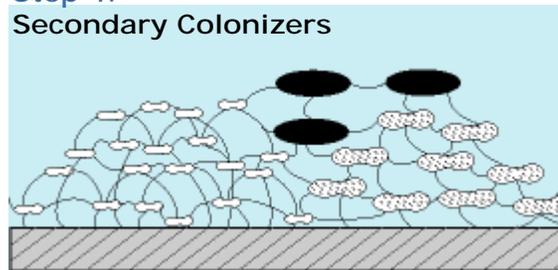


Neutralise les charges/énergie libre en surface

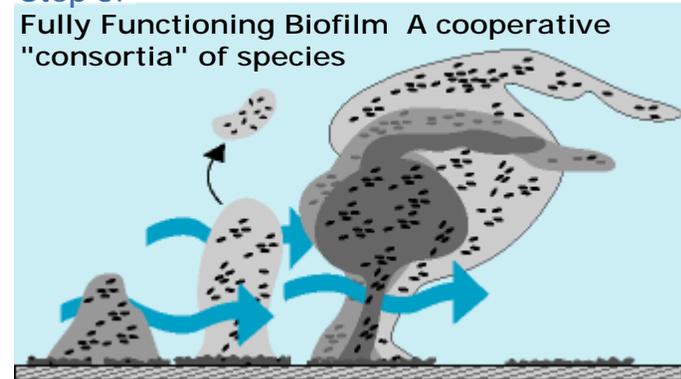
Step 3.
Glycocalyx or 'slime' formation



Step 4.
Secondary Colonizers



Step 5.
Fully Functioning Biofilm A cooperative "consortia" of species



Propriétés du microconsortium

L'organisation, la forme, la densité de ces entités sont des réponses aux variations des conditions écologiques

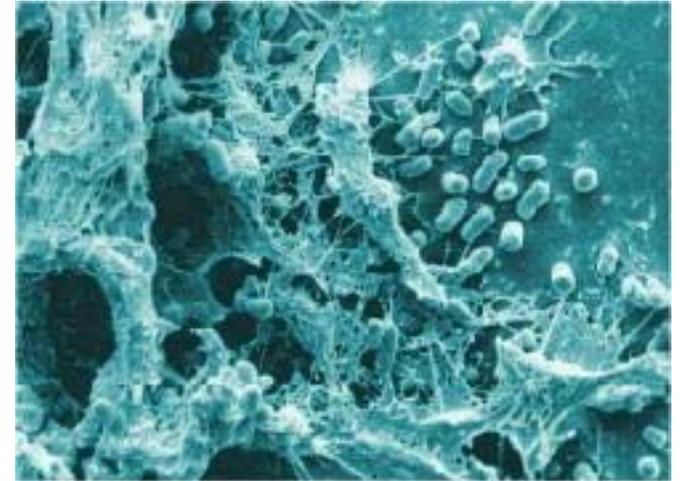
- très stable
- adapté et résistant au stress
- réseaux de pores et de canaux de circulation

accumulation de nutriments

concentration microbienne forte

communication entre les cellules

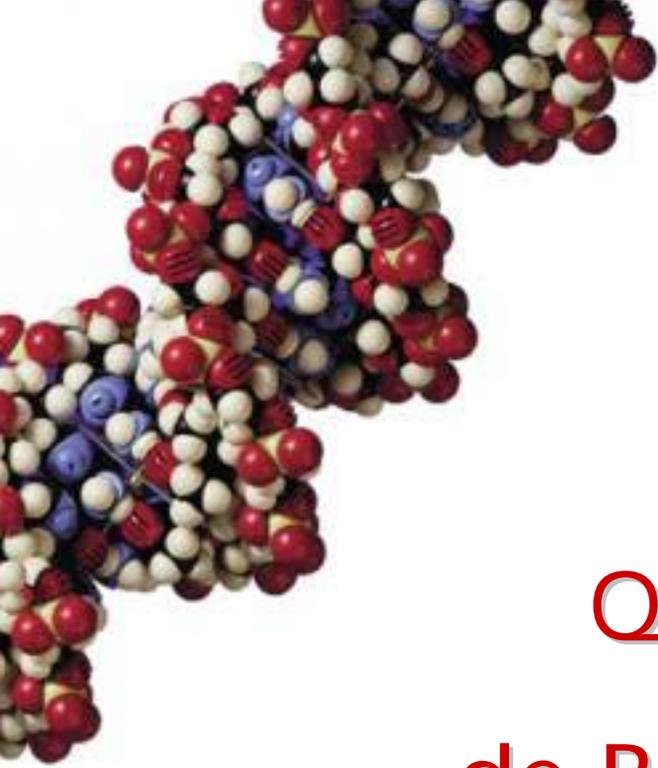
échanges génétiques



Grande diversité génétique et métabolique même au sein du même microenvironnement



Rôle écologique considérable des biofilms



Quelques rappels de Biologie Moléculaire

Macromolécules biologiques = polymères constitués d'un grand nombre de sous-unités similaires (monomères) associés entre eux par des liaisons covalentes

Seulement 70 monomères sont utilisés par tous les êtres vivants sur Terre pour la construction d'une très grande variété de macromolécules

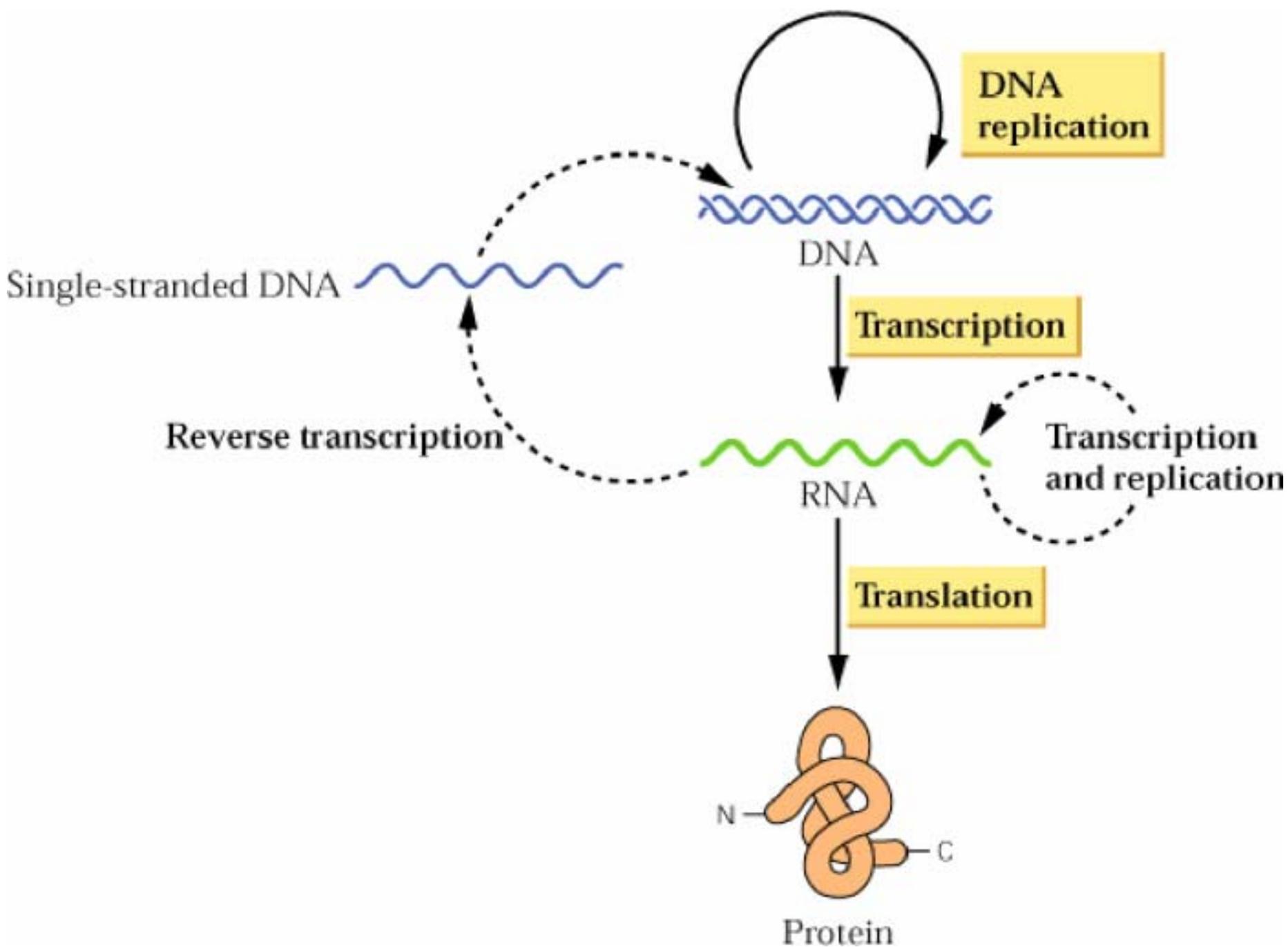
Macromolécule	Monomères
Carbohydrates	20-30 monosaccharides (ou sucres simples)
Protéines (chaînes polypeptidiques)	20 acides aminés
Acides nucléiques	4 nucléotides
Lipides	~ 20 acides gras et glycérol

Variation structurale des molécules = base de la diversité

Les fonctions variées des protéines

- **Enzymes:** catalyse des réactions cellulaires
- **Protéines structurales:** maintien de la morphologie
- **Transport:** dans la cellule, l'organisme et au travers de la paroi cellulaire
- **Communication:** messagers, hormones, récepteurs
- **Défense:** anticorps et autres molécules liant les molécules étrangères pour les détruire
- **Contraction:** mouvement musculaire
- **Réserve:** stockage des acides amines pour une utilisation ultérieure

La fonction d'une protéine dépend de sa structure 3D (conformation)

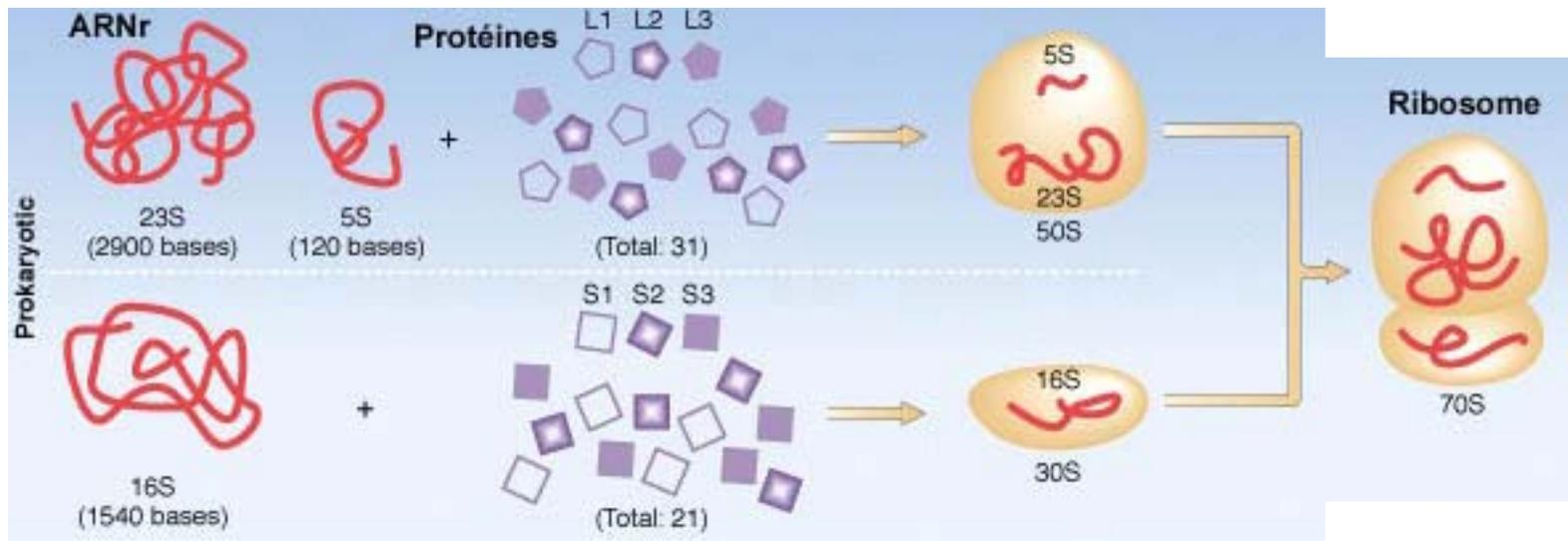


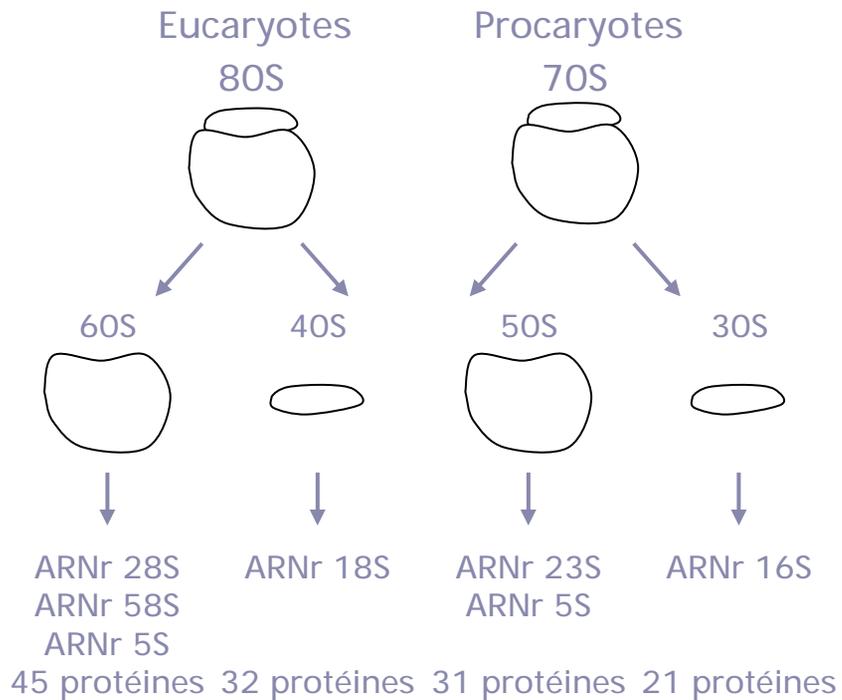
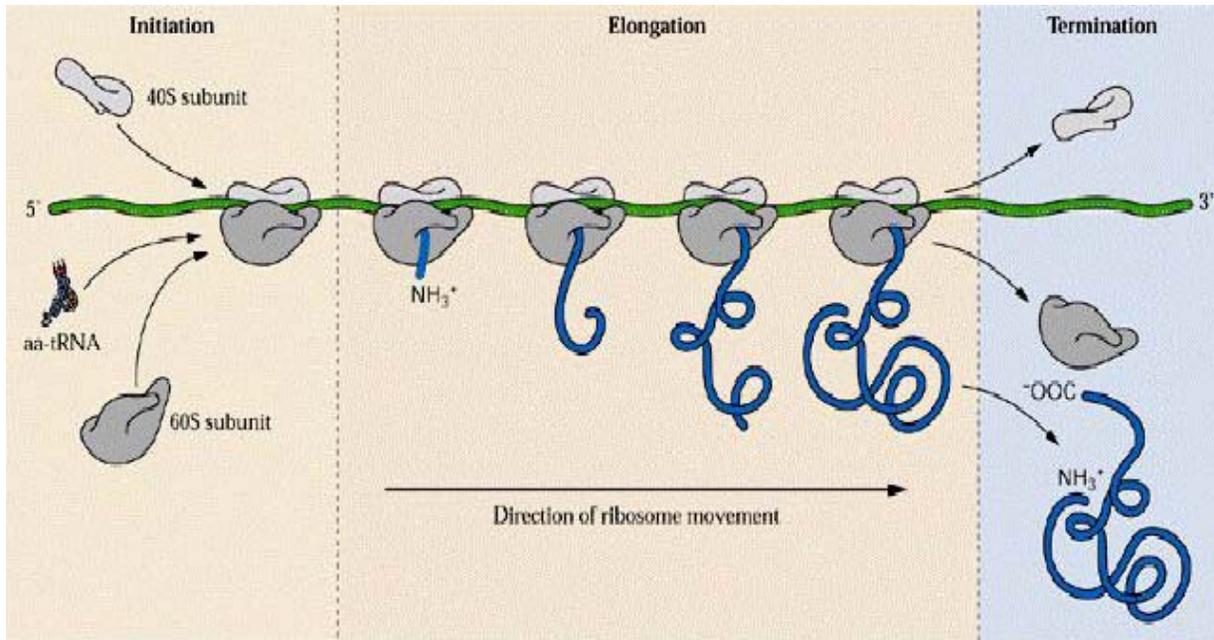
Les ribosomes

Organites (structure cellulaire de forme bien définie et qui remplit une fonction cellulaire déterminée) responsables de la synthèse des protéines



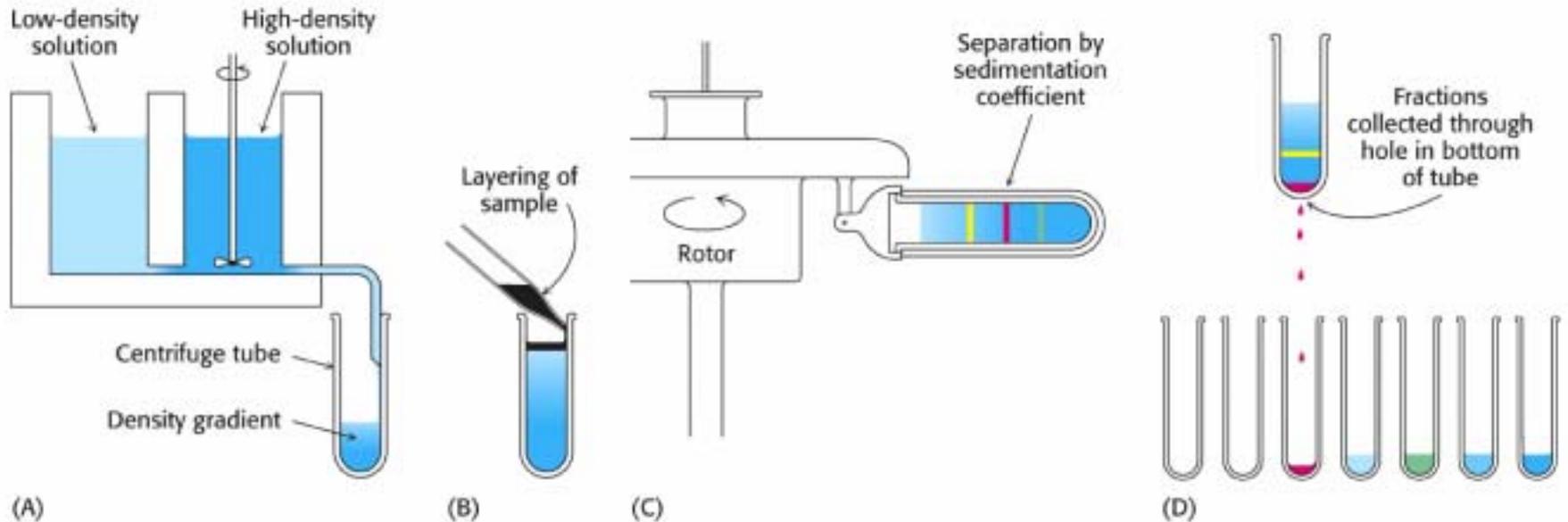
- Comprend 2 sous-unités de tailles différentes
- Association de **chaines d'ARN (ARNr)** et de **protéines**





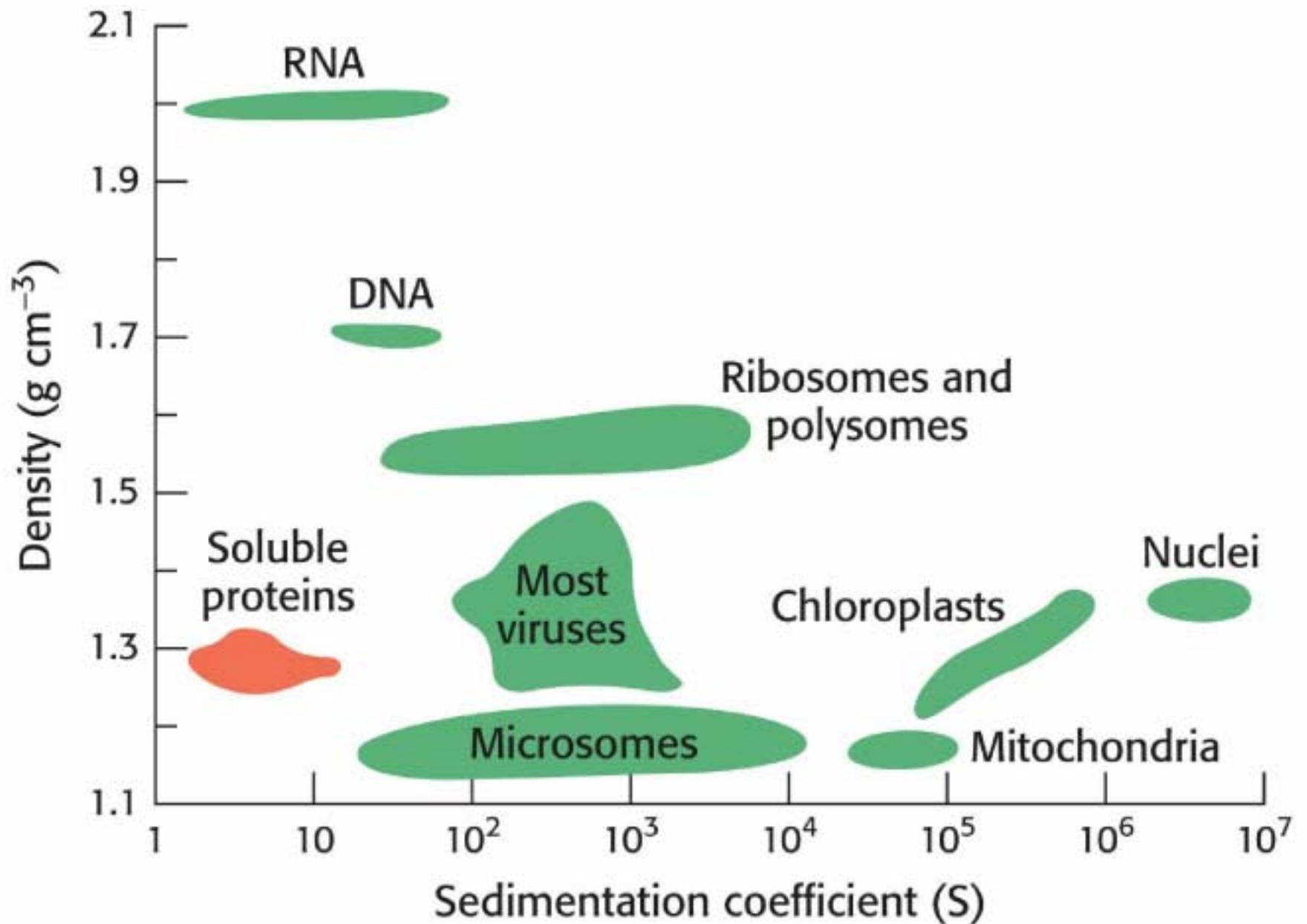
L'ARNr 16S est l'une des 3 molécules ARN associées aux ribosomes des procaryotes. 16S rend compte de sa taille.

Mesure de la vitesse de sédimentation d'une particule dans une ultracentrifugeuse



⇒ Coefficient de sédimentation spécifique de chaque macromolécule

- fonction de sa taille et de son poids moléculaire
- s'exprime en unité de Sverdborg ($S = 10^{-13}$ secondes)



Carbohydrates

Oligosaccharides (< 30 monosaccharides/chaîne) et polysaccharides (> 30 monosaccharides/chaîne) fabriqués à l'intérieur de la cellule par une polymérase (transférase)

- Réserve d'énergie "fuel" biologique
- Composant structural (paroi cellulaire)
- Composant de l'ADN/ARN
- Formule générale : $(CH_2O)_n$
- Groupes fonctionnels -OH et =CO
- Différents groupes
 - Monosaccharides (glucose, galactose, fructose)
 - Disaccharides (maltose lactose sucrose)
 - Polysaccharides (cellulose, quitine)

Lipides

Graisses, phospholipides, stéroïdes

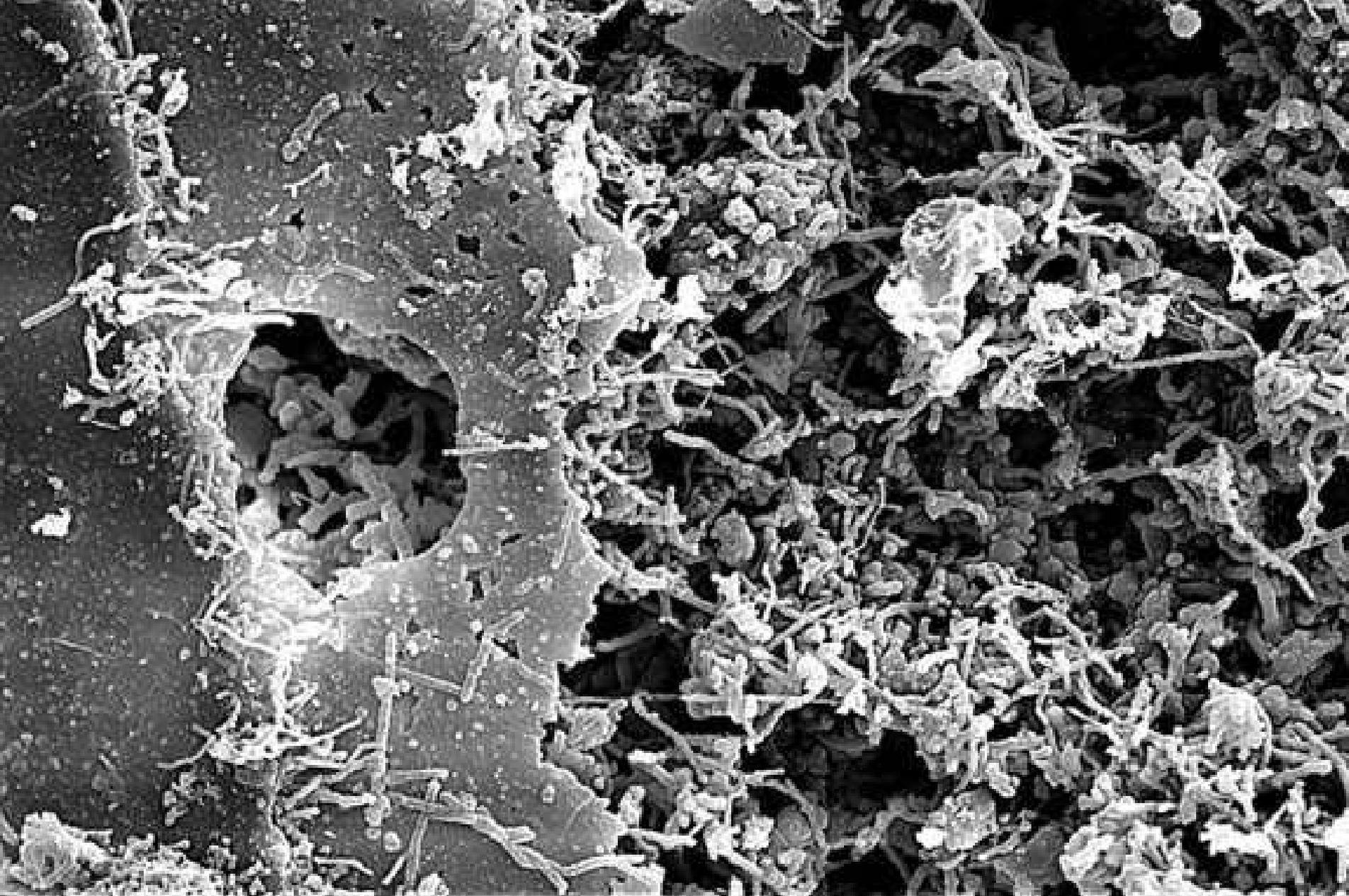
- Réserve d'énergie, "fuel" biologique
- Composant structural (paroi cellulaire)
- Hormones
- Composants : C, H, (O)



Caractérisation de la diversité microbienne d'un échantillon naturel

=

Détermination du nombre d'espèces et du nombre d'individus
par espèce dans un échantillon



WT1-spicule

00012

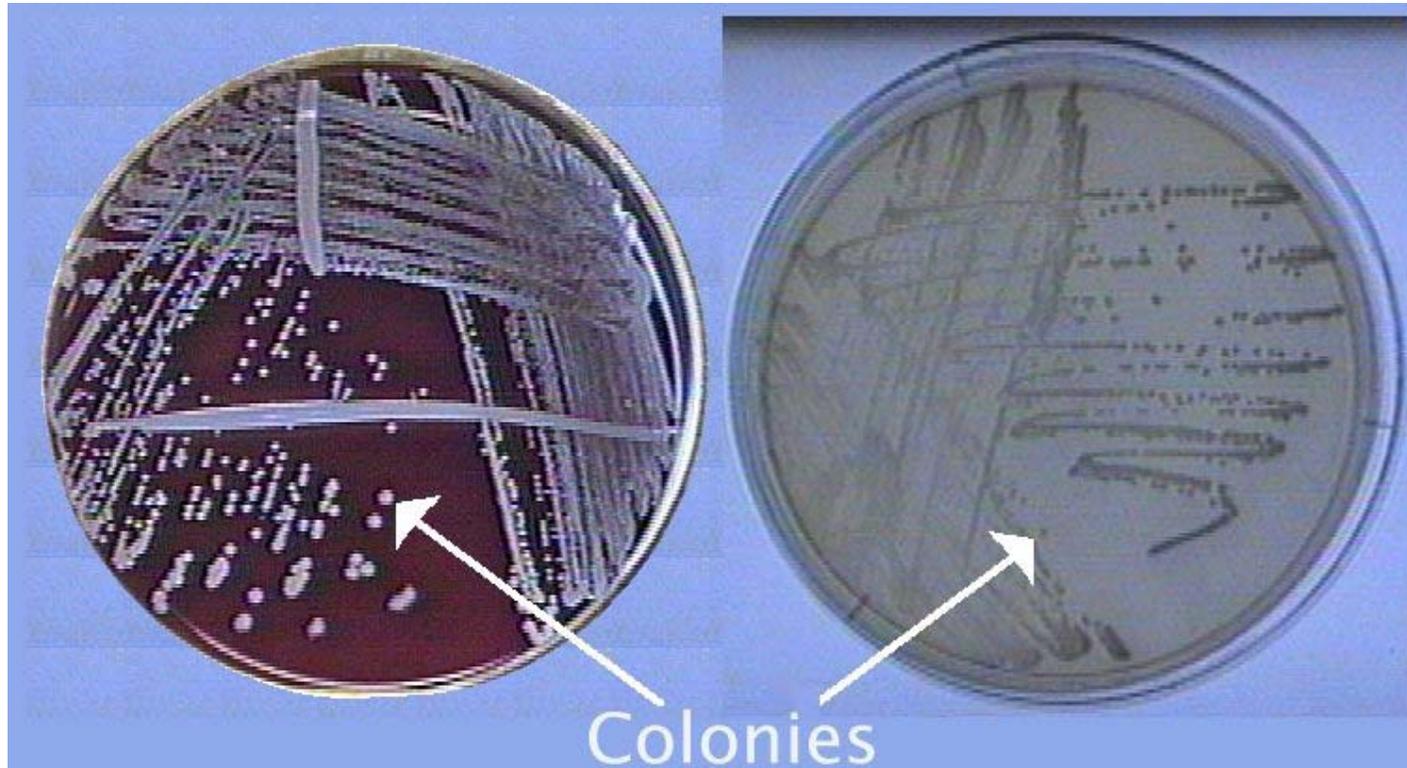
30 μ m



Caractérisation de la diversité microbienne d'un échantillon naturel

Microbiologie classique =

Techniques d'isolement/de culture sur milieu sélectif pour obtenir des cultures pures
(même espèce)



Identification et phylogénie basées sur des critères morphologiques, physiologiques et
métaboliques

La **physiologie** étudie le fonctionnement mécanique, physique et biochimique des organismes vivants et de leurs interactions avec leur environnement.

Le **métabolisme** est l'ensemble des transformations moléculaires et des transferts d'énergie qui se déroulent de manière ininterrompue dans la cellule.

Classification des organismes

Hierarchie des catégories taxonomiques

DOMAINE

Royaume

◆ Phylum ou Division

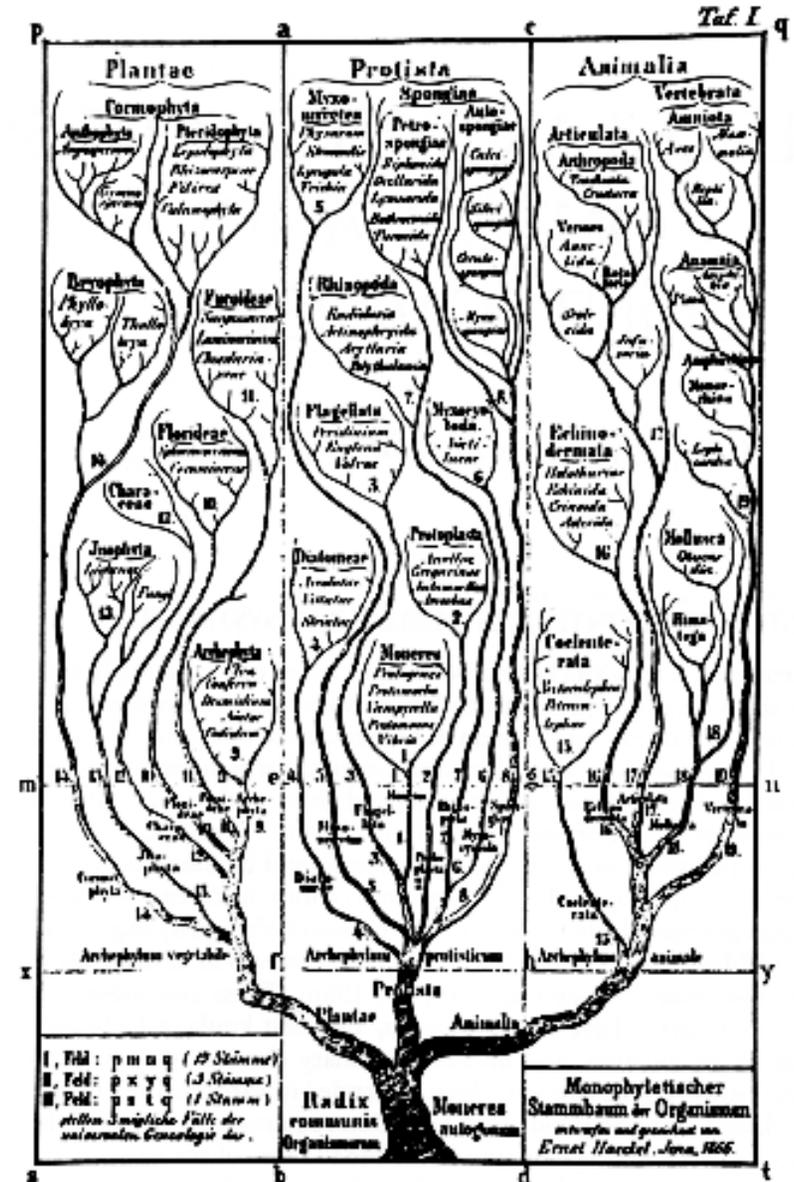
◆ Classe

◆ Ordre

◆ Famille

◆ *Genre*

espèce



The phylogeny and classification of life as proposed by Haeckel (1866).

Caractérisation de la diversité microbienne d'un échantillon naturel

Isolement et culture

- ☆ Plus de 90% des micro-organismes présents dans la nature sont réfractaires à la culture en milieux enrichis
 - Les conditions de culture utilisées ne sont pas adaptées à certains taxons
 - Perte de la capacité à se multiplier suite à une situation prolongée de stress
 - Certaines espèces sont des symbiontes obligatoires d'autres espèces



Induction de large biais dans le recensement de la diversité microbienne

- ☆ La morphologie et les caractéristiques phénotypiques des microorganismes ne sont suffisamment informatives



Difficulté de rattachement à des familles évolutives (classification phylogénétique)

Caractérisation de la diversité microbienne d'un échantillon naturel

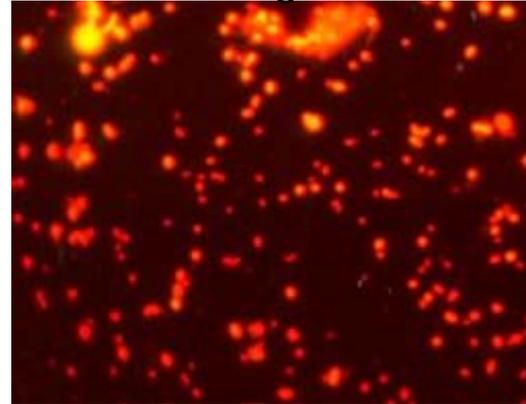
Approche moléculaire

Dénombrement effectué directement sur l'échantillon grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes se fixant sur l'ADN

DAPI



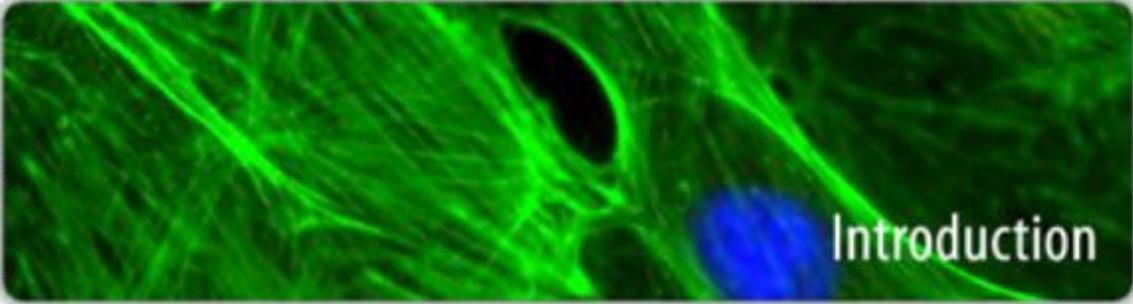
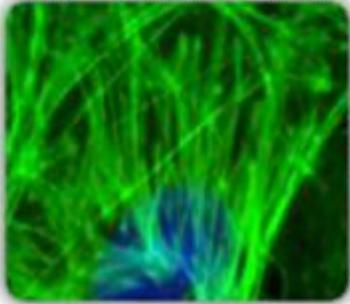
Acridine orange



(Nbre de cellules)_{comptage direct} > (Nbre de cellules)_{culture}

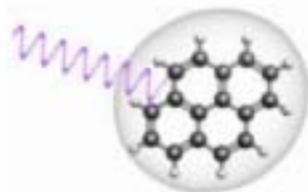


Fluorescence



Introduction

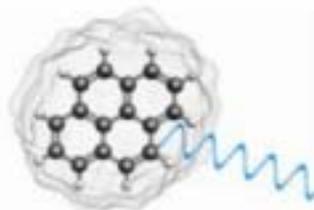
Definition of Fluorescence



Absorption



Excitation

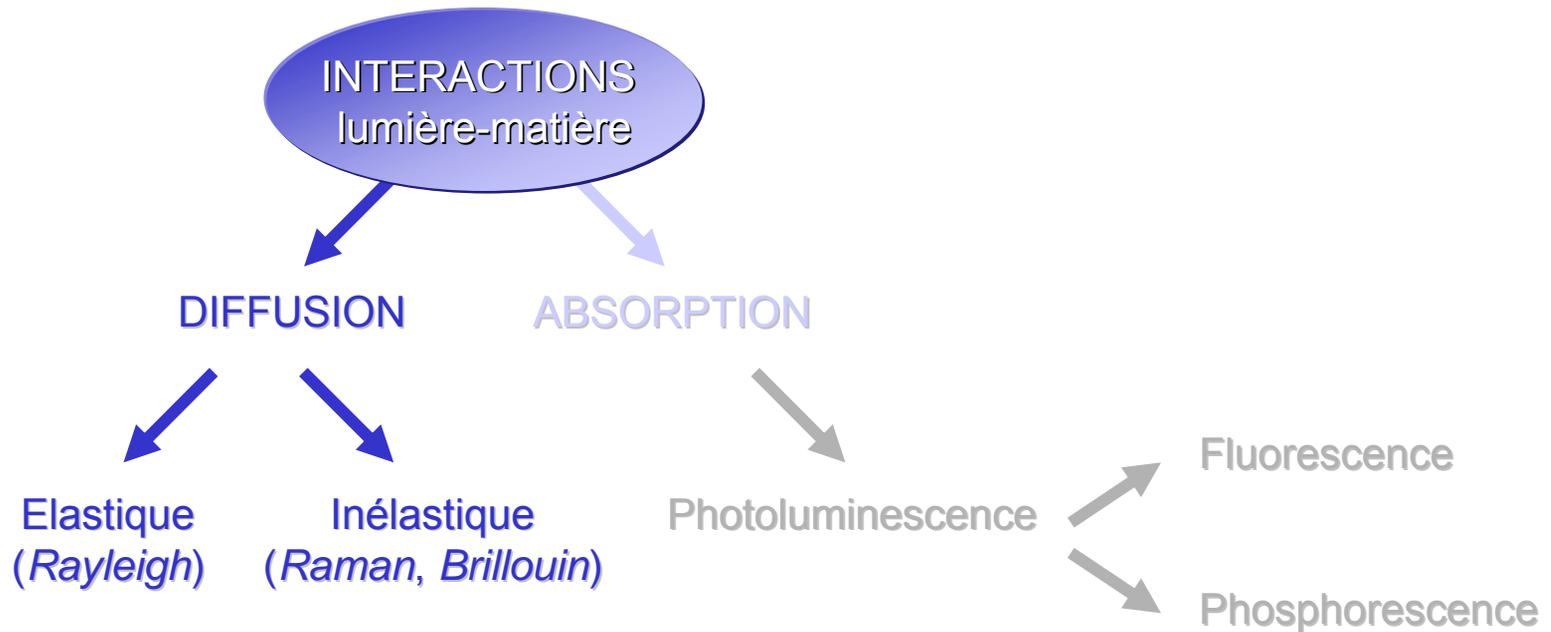


Emission

Fluoresce

Photoluminescence

L'absorption de photons conduit les espèces absorbantes dans un état électronique excité (un des phénomènes résultant d'une interaction matière/lumière

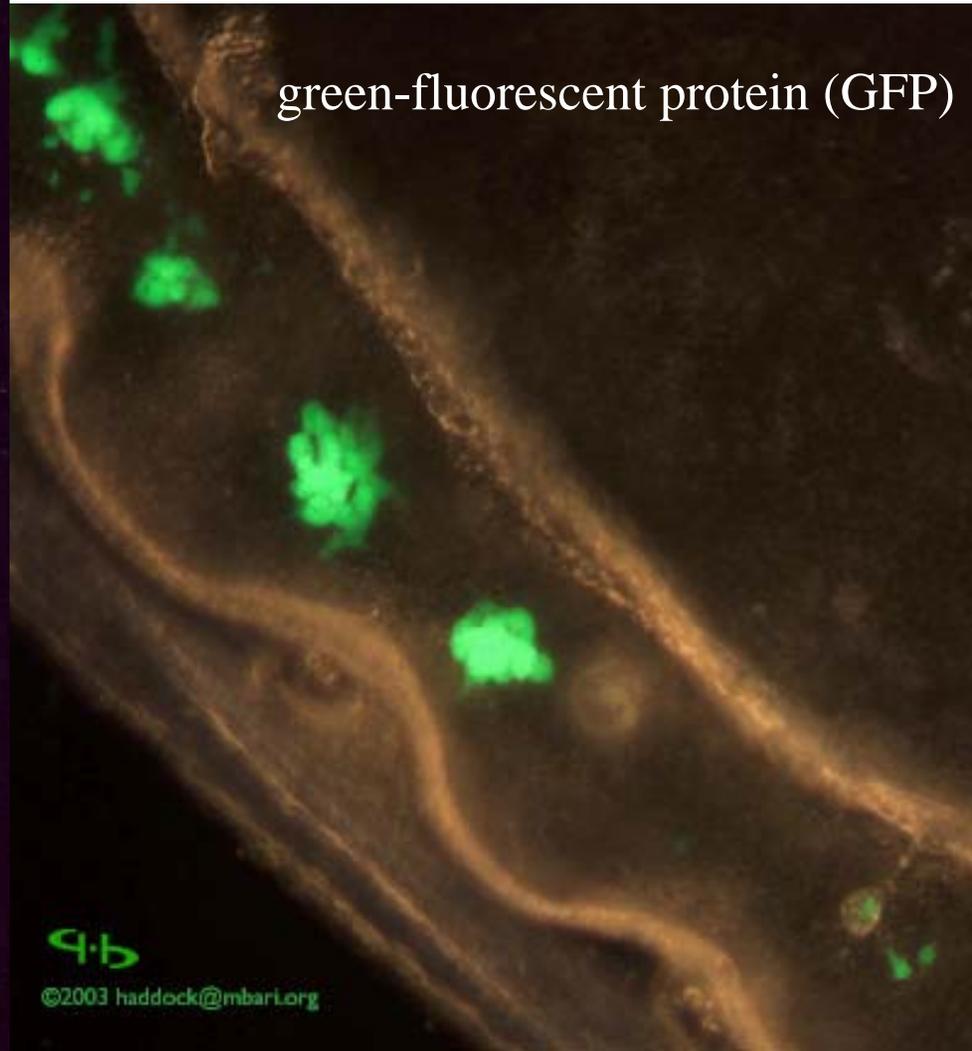


- **luminescence**: émission d'un rayonnement électromagnétique visible, UV ou IR qui n'est pas d'origine purement thermique (\neq thermoluminescence)
- Composés luminescents (nombreux)
 - **organiques**:
hydrocarbures aromatiques (naphtalène, anthracène, phénanthrène, pyrène, pérylène, ...), fluorescéine, rhodamines, coumarines, oxazines, cyanines, polyènes, diphenylpolyènes, acides aminés (tryptophane, tyrosine, phénylalanine, ...), ...
 - **inorganiques**:
ions uranyle (UO_2^+), ions lanthanides (Eu^{3+} , Tb^{3+}), verres dopés (Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag), monocristaux ou poudres cristallines (ZnS, CdS, ZnSe, CdSe, BaS, GaS, GaP, $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Cr}^{3+}$ ou rubis), ...
 - **organométalliques**:
complexes du ruthénium (ex: $\text{Ru}(\text{biPy})_3$), complexes d'ions lanthanides, complexes de certains cations métalliques avec des chélatants organiques (ex: oxinates métalliques)...
- Classés en fonction du mode d'excitation

- Photoluminescence (<i>fluorescence, phosphorescence</i>)	photons (UV, visible)
- Radioluminescence	RX, rayonnements α , β , γ
- Cathodoluminescence	Electrons accélérés
- Electroluminescence	Champ électrique
- Chimiluminescence	Réaction chimique
- Bioluminescence	Réaction enzymatique
- Triboluminescence	Frottement, rupture, déformation
- Sonoluminescence	Ultrasons
- Thermoluminescence	Elévation de température



hydromedusa *Aequorea victoria*



green-fluorescent protein (GFP)

9.5
©2003 haddock@mbari.org

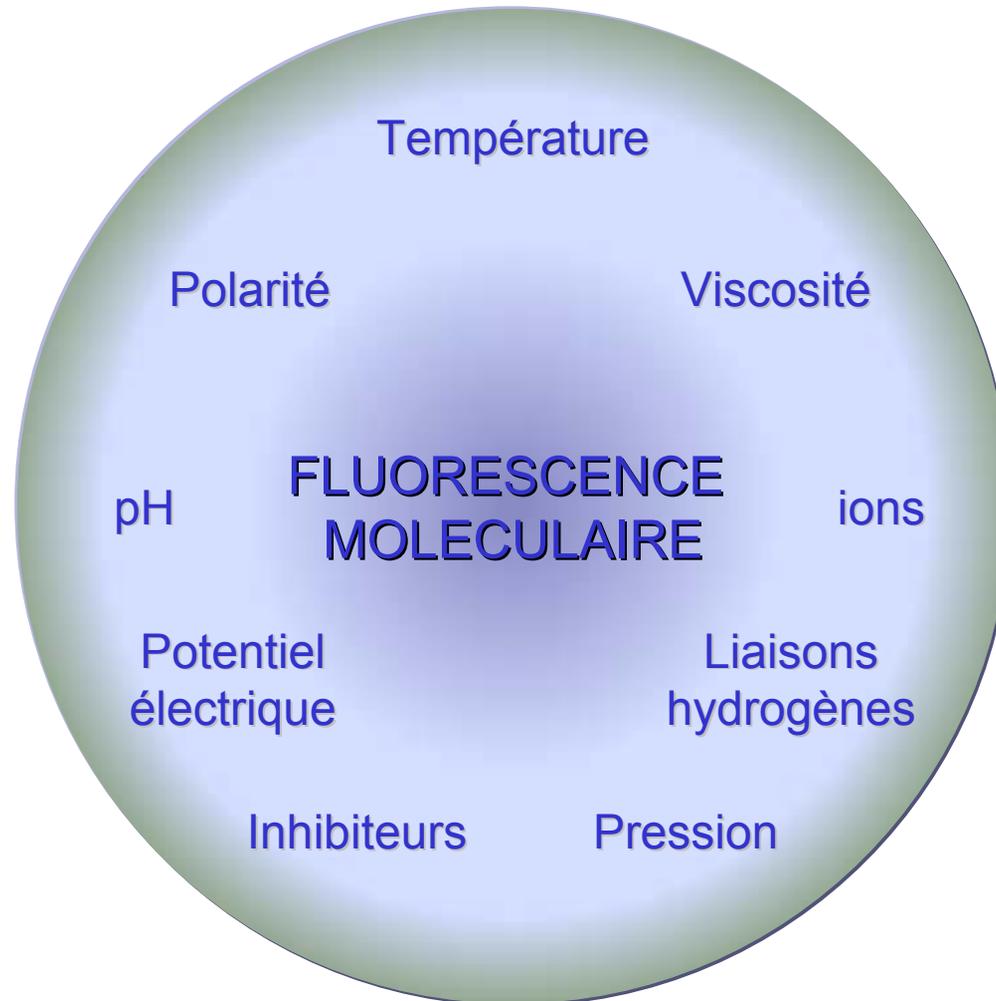
Et l'homme créa le cochon fluorescent !



cochons transgéniques qui brillent d'une couleur verte dans le noir lorsqu'on leur met une lumière bleue

Effets d'environnement sur la fluorescence moléculaire

Paramètres physiques et chimiques du milieu environnant susceptibles d'agir sur l'émission d'une molécule fluorescente:



Applications de la fluorescence moléculaire

Utilisation extensive dans de nombreux domaines:

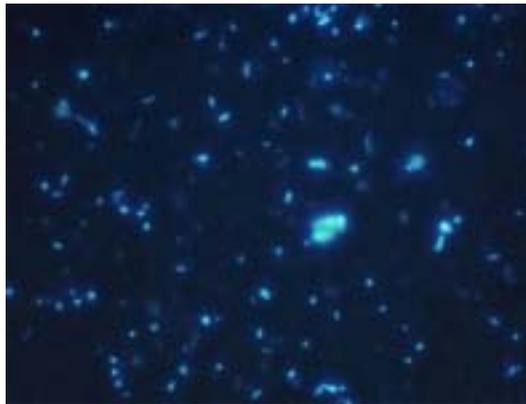
- Détection et dosage d'espèces intrinsèquement fluorescentes (hydrocarbures, polluants, médicaments, drogues, ...)
- Détection et/ou dosage à l'aide de sondes fluorescentes:
 - Ions métalliques, anions, molécules neutres
 - Dosage d'anticorps
 - Contrôle du sang et des urines (pH, sodium, potassium, chlorure, CO₂)
 - Cytofluorimétrie (triage de cellule vivantes)
 - Puces à ADN
- Exploration de la matière inanimée ou vivante à l'aide de sondes fluorescentes (polymères, surfaces solides, solutions de tensioactifs, membranes biologiques, protéines, acides nucléiques; informations sur des paramètres physiques structuraux ou chimiques (polarité, viscosité, ordre moléculaire, pH, concentration d'ions, ...))
- Autres applications pratiques
 - Lasers à colorants
 - Capteurs optiques, chimiques, biocapteurs optiques (optodes)
 - Lampes fluorescentes
 - Marquage de sécurité de documents (ex: billets de banque)
 - Azurants optiques
 - Contrôle non destructif
 - Hydrologie
 - Criminologie
 - Décoration, spectacle
 - ...

Caractérisation de la diversité microbienne d'un échantillon naturel

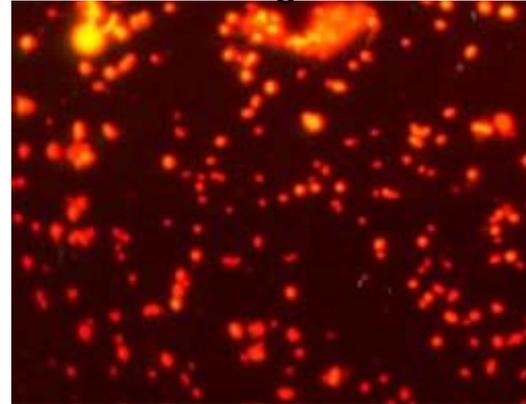
Approche moléculaire

Dénombrement effectué directement sur l'échantillon grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes se fixant sur l'ADN

DAPI



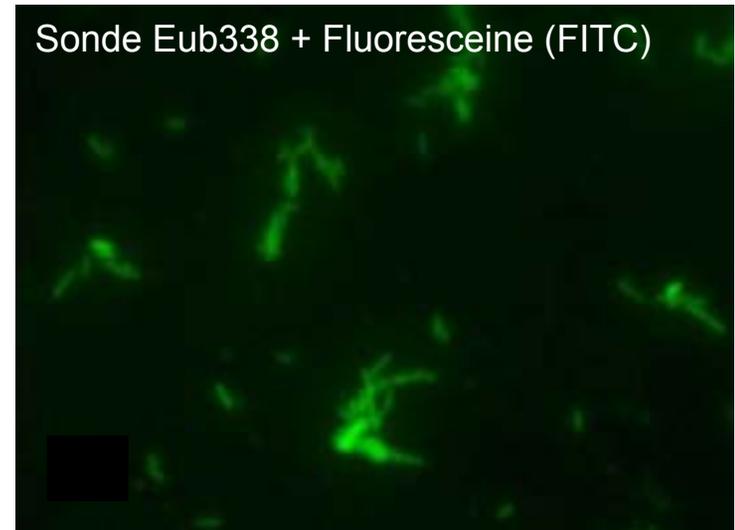
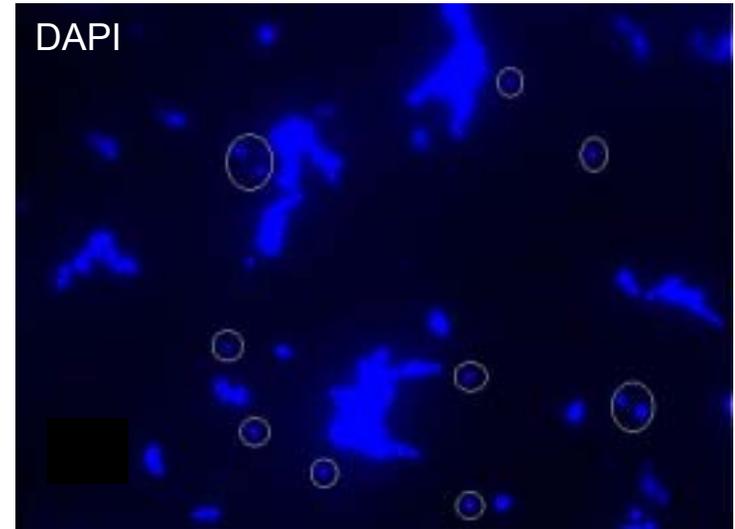
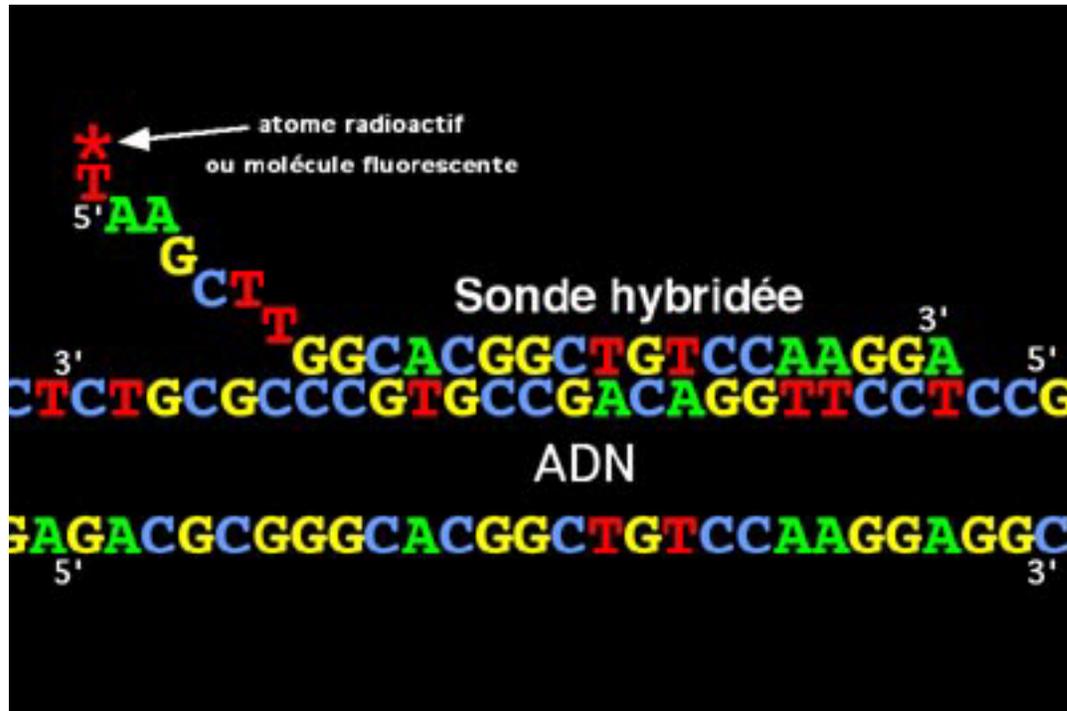
Acridine orange



(Nbre de cellules)_{comptage direct} > (Nbre de cellules)_{culture}

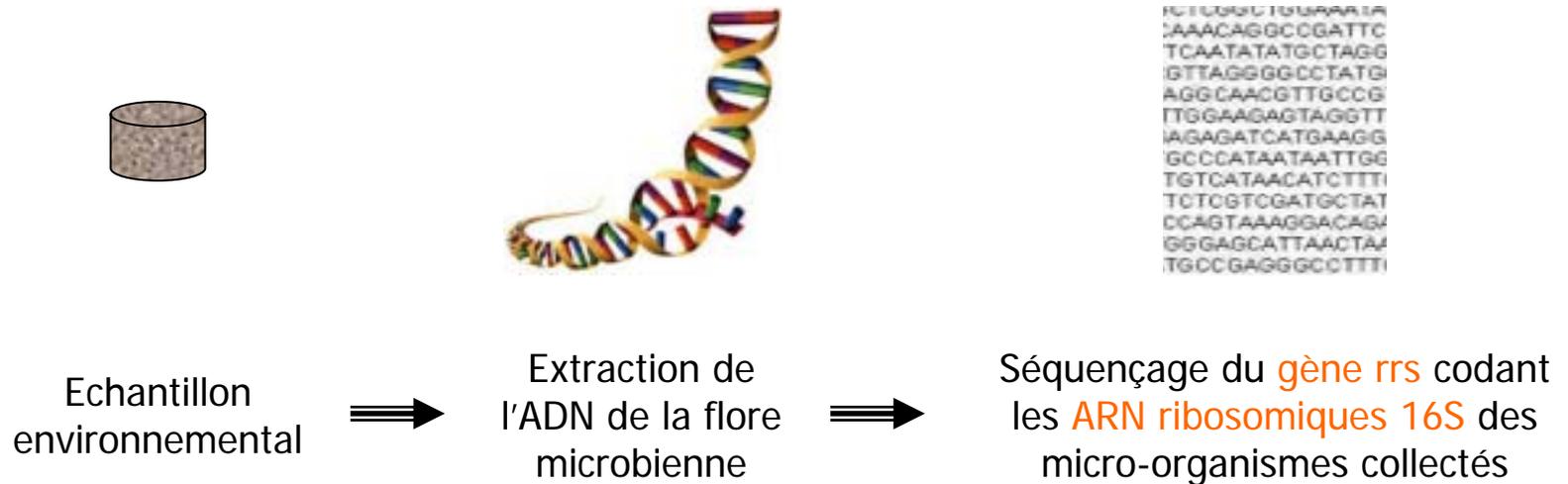
Caractérisation de la diversité microbienne d'un échantillon naturel

Approche moléculaire par hybridation



Caractérisation de la diversité microbienne d'un échantillon naturel

Approche moléculaire par analyse des gènes



Le gène *rrs*

- Présent chez tous les procaryotes
- Possède des domaines hautement conservés qui n'ont fixé que très peu de mutations au cours de l'évolution
- Possède des domaines variables d'autant plus différents entre deux individus que ceux ci sont phylogénétiquement éloignés

Approche moléculaire

- a révolutionné la **phylogénie**
- a conduit à la découverte du 3^{ème} domaine du vivant : les **Archées**
- a conduit à la découverte d'une **diversité** de microorganismes inattendue dans des milieux très variés (dont les milieux extrêmes)

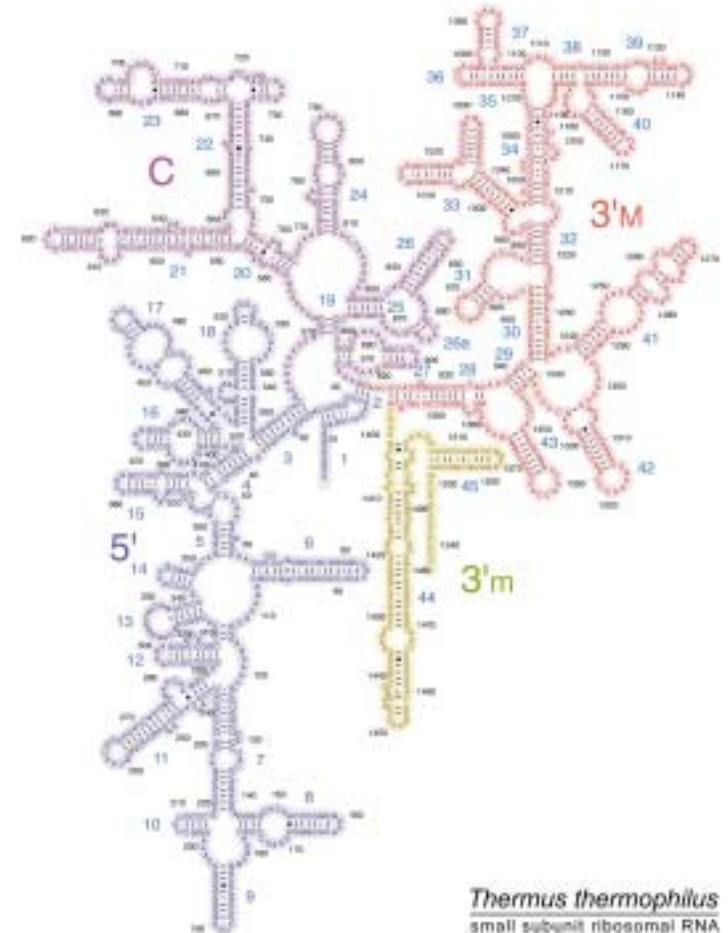
La phylogénie moléculaire

= *phylogénie par comparaison de gène*

Utilisation de l'**information évolutive** accumulée dans la séquence de nucléotides des acides nucléiques (ADN ou ARN) et dans la séquence d'acides aminés protéiniques

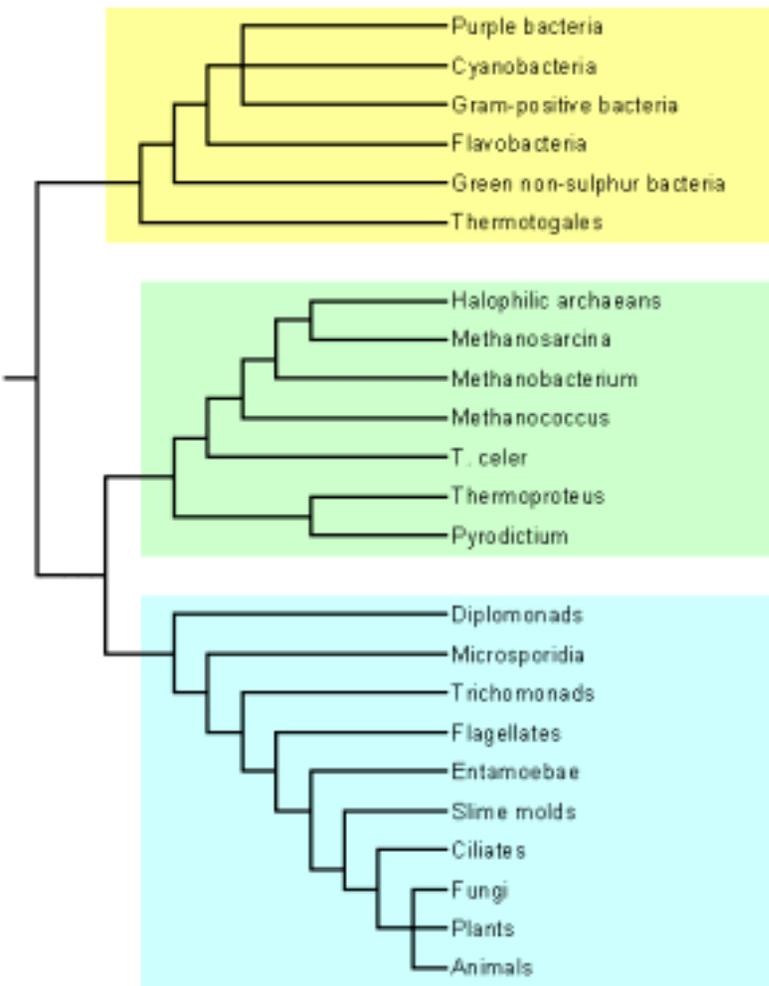
L'ARNr 16S : le marqueur moléculaire privilégié chez les procaryotes

- Abondant dans l'environnement (nombreuses copies par cellules)
- Molécule très conservée entre les différentes espèces (comparaison facile)
- Facilement séquençable (amorces universelles)
- Nombreuses données disponibles dans les banques
- Ne se transfère pas



Thermus thermophilus
small subunit ribosomal RNA

La phylogénie moléculaire



- Fournit un cadre de travail dans lequel les procaryotes peuvent être rapprochés objectivement : **arbre de vie universel** (Woese et Fox, 1977)

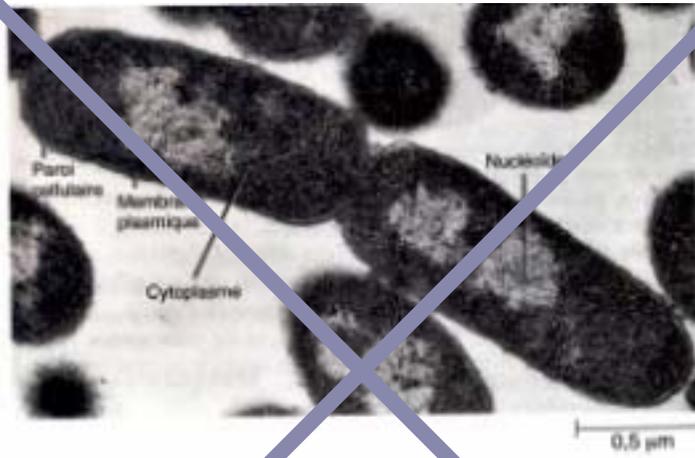
- Permet d'appréhender l'**évolution** des micro-organismes

➔ La distribution phylogénétique des différents phénotypes (métabolismes, formes, pigmentations...) des micro-organismes ne suit pas celle de l'ARNr16S. Cette absence de correspondance est interprétée par l'existence de **transferts horizontaux** (échanges de matériel génétique entre procaryotes)

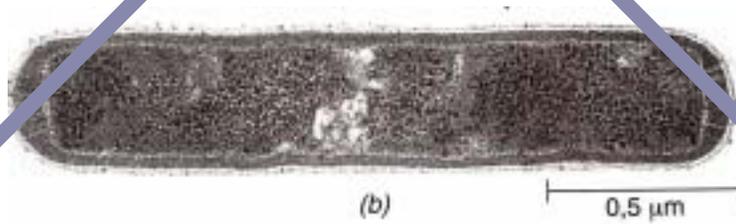
Approche moléculaire

- a révolutionné la **phylogénie**
- a conduit à la découverte du 3^{ème} domaine du vivant : les **Archées**
- a conduit à la découverte d'une **diversité** de microorganismes inattendue dans des milieux très variés (dont les milieux extrêmes)

bactérie

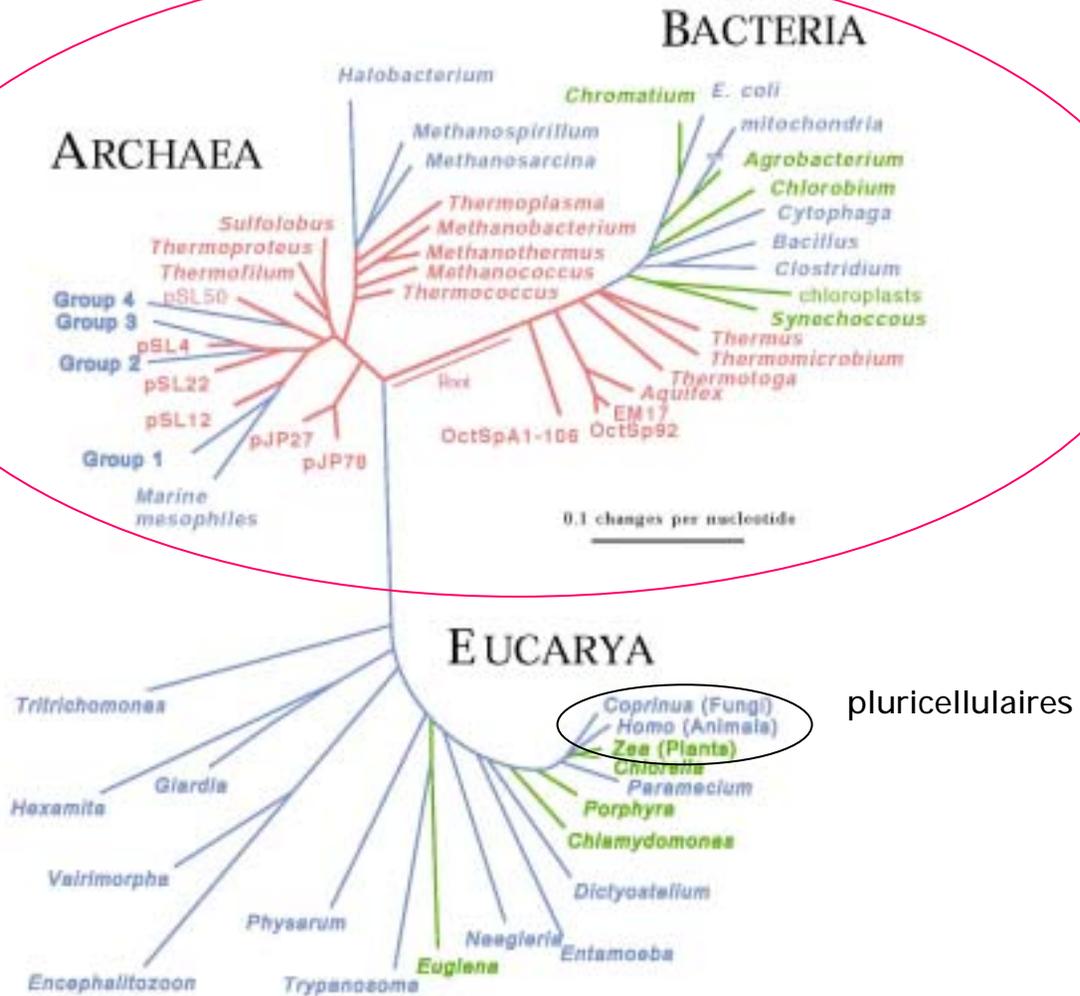


archée



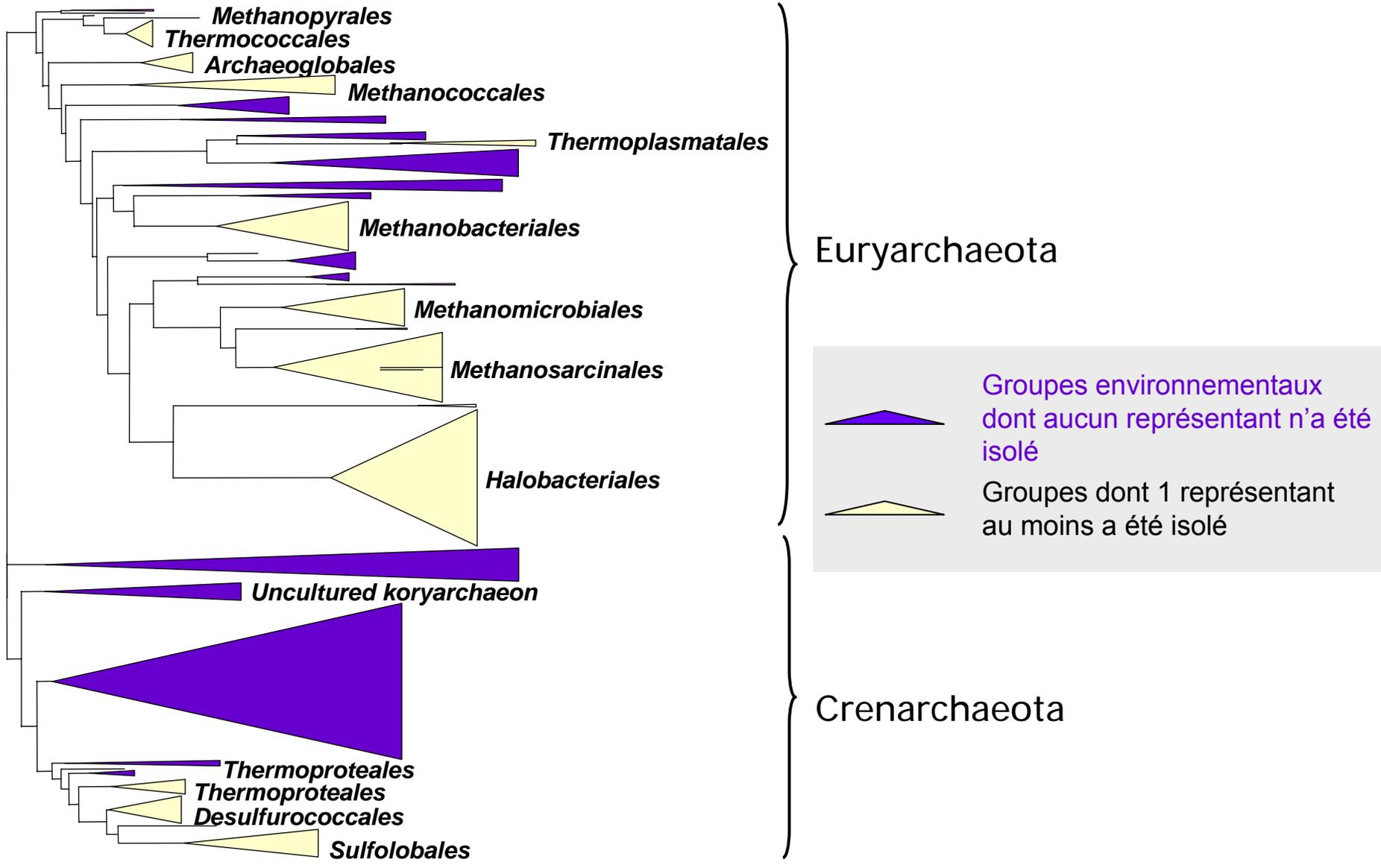
Les Archées : le 3^{ème} domaine du vivant

PROCARYOTES



Woese, 1987

Diversité des Archées



Approche moléculaire

- a révolutionné la **phylogénie**
- a conduit à la découverte du 3^{ème} domaine du vivant : les **Archées**
- a conduit à la découverte d'une **diversité** de microorganismes inattendue dans des milieux très variés (dont les milieux extrêmes)

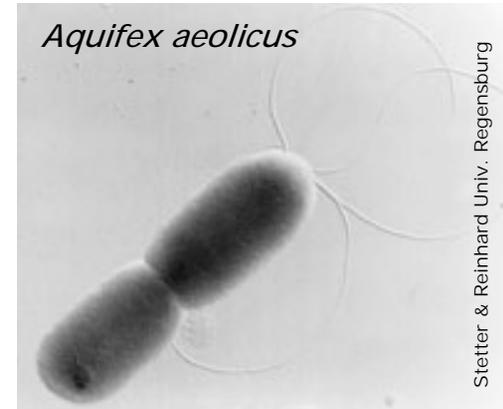
Découverte (encore partielle !) de nouveaux phyla

Dans les sources chaudes :

- Découverte d'*Aquifex aeolicus* (Octopus Spring, 1994), considéré comme le plus ancien lignage bactérien
- L'étude d'une très riche communauté d'Archées dans les sédiments d'Obsidian pool révèle des séquences très divergentes qui pourraient constituer un royaume à l'intérieur des Archées : Korarchaeota (1996)

Dans le plancton marin :

- Découverte de Crenarchaeota mésophiles et même psychrophiles (1997) qui représenteraient 39% du picoplancton marin



La multiplication des environnements étudiés révèle constamment de nouveaux groupes

- 1987 : 12 phyla bactériens reconnus
- 1997 : 25-30 phyla bactériens reconnus

Ecologie moléculaire

Utilisation de la phylogénie moléculaire (phylogénie par comparaison de gènes)
pour l'identification et l'étude des micro-organismes

• Discipline en pleine expansion

- on estime actuellement que 99% des micro-organismes ne sont pas cultivables simplement
- inventaire par séquençage de communautés microbiennes prélevées directement dans l'environnement sans culture et isolation
- ne nécessite de connaître que la séquence d'un seul gène
- permet d'appréhender l'incroyable diversité microbienne

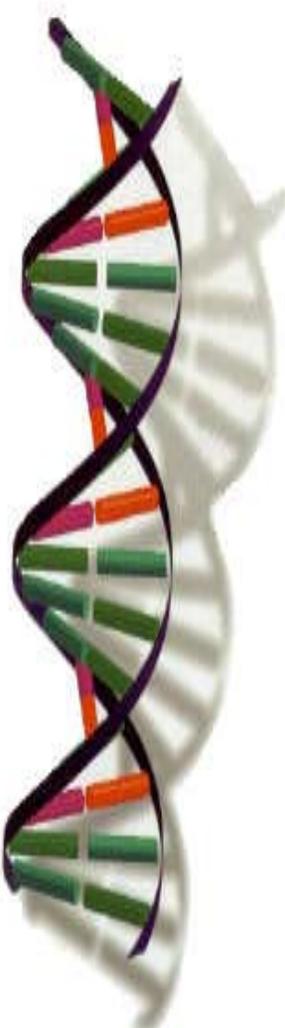
• Limites de l'écologie moléculaire

- ne permet pas de connaître les caractéristiques métaboliques, physiologiques ...
- ne donne aucune information sur les relations qui structurent les écosystèmes

Génomique environnementale

(= *écogénomique/métagénomique*)

consiste à séquencer non pas un gène mais **des grands fragments de génomes**
(~ 40kb / ~ 40 gènes) à partir de prélèvements environnementaux



phylogénie (utilisation de marqueurs alternatifs à l'ARNr 16S)

organisation génomique (densité de gène, structures, ...)

transferts horizontaux

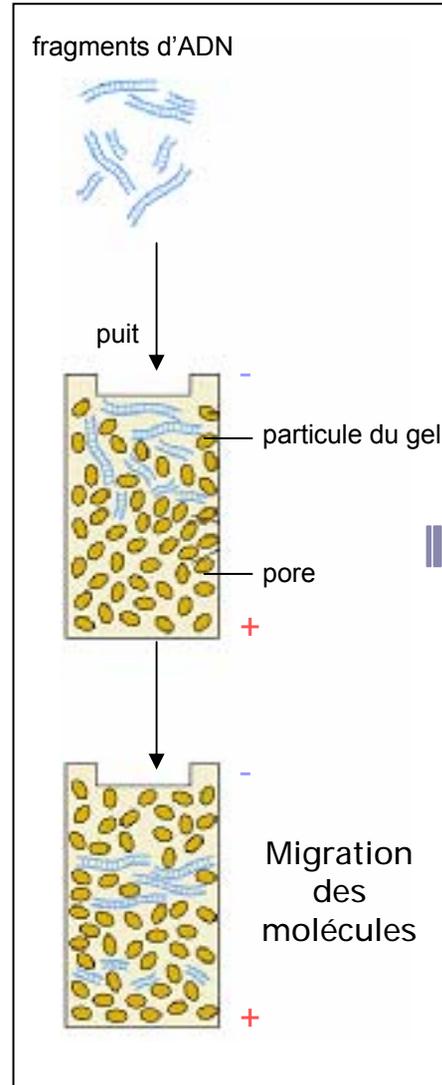
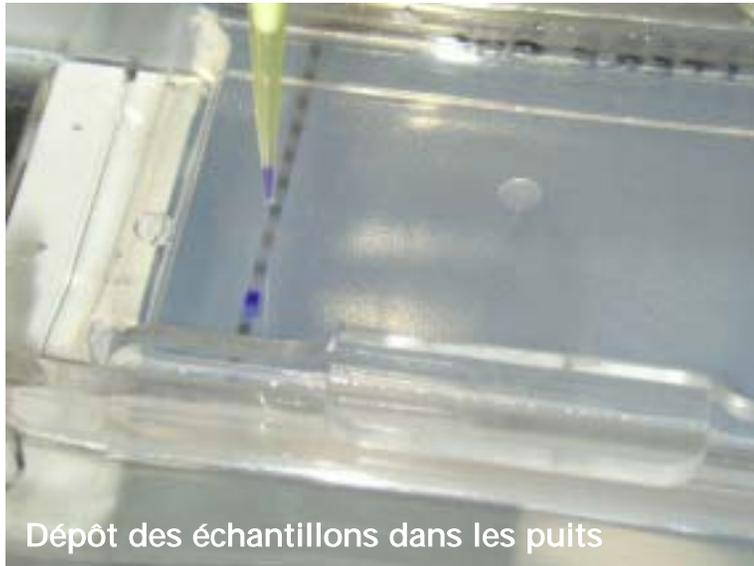
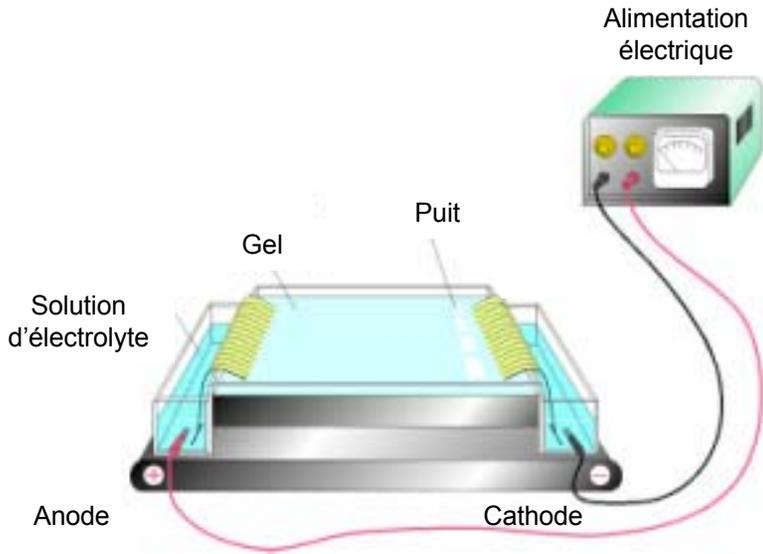
activité enzymatique, le métabolisme ou la physiologie



Les Méthodes
en
Ecologie Moléculaire

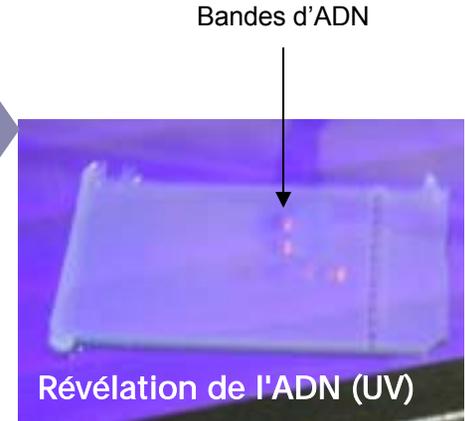
L'électrophorèse en gel

Visualisation des fragments d'ADN



ADN (anions) migrent vers le pôle + plus ou moins rapidement

Migration à travers les pores du gel (inversement proportionnelle à la longueur de leur chaîne)

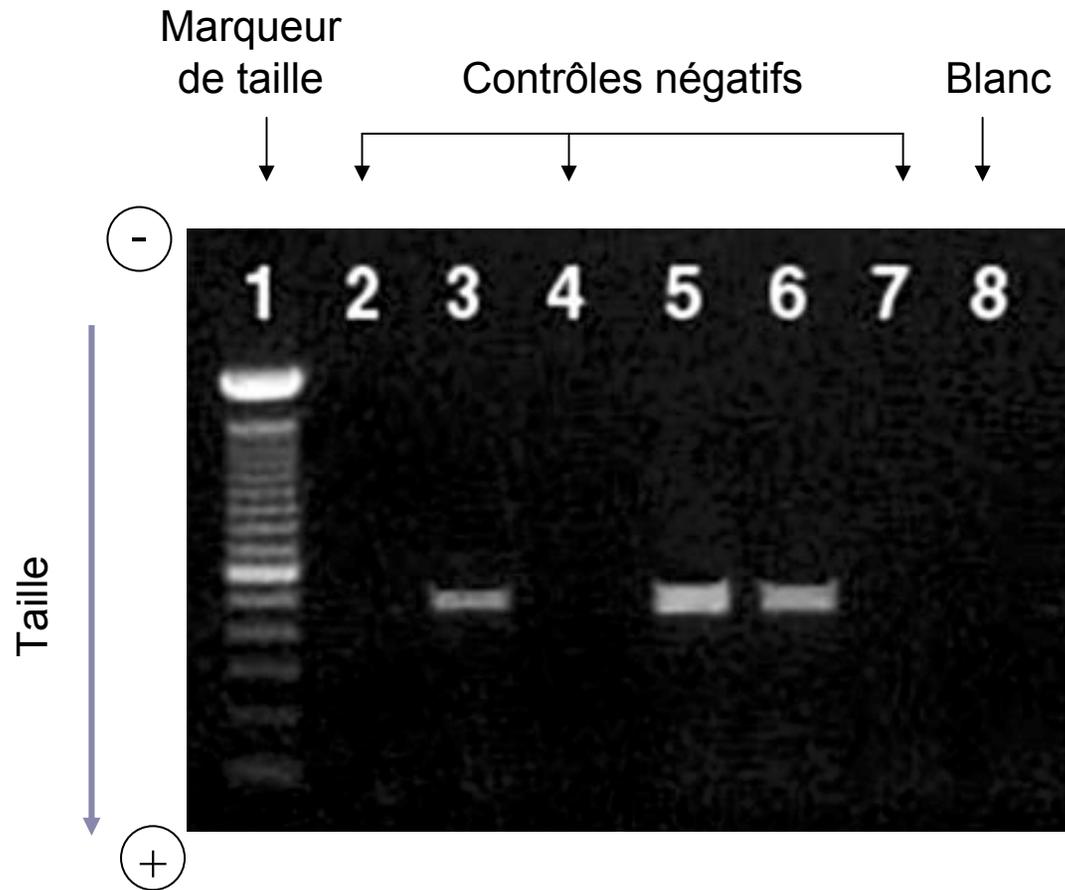


Quand ?

Contrôle de l'ADN total extrait d'un échantillon
Visualisation des produits de PCR

L'électrophorèse en gel

Estimation de la quantité et de la taille des fragments d'ADN



Les fragments d'ADN ont migré de manière inversement proportionnelle à la longueur de leur chaîne

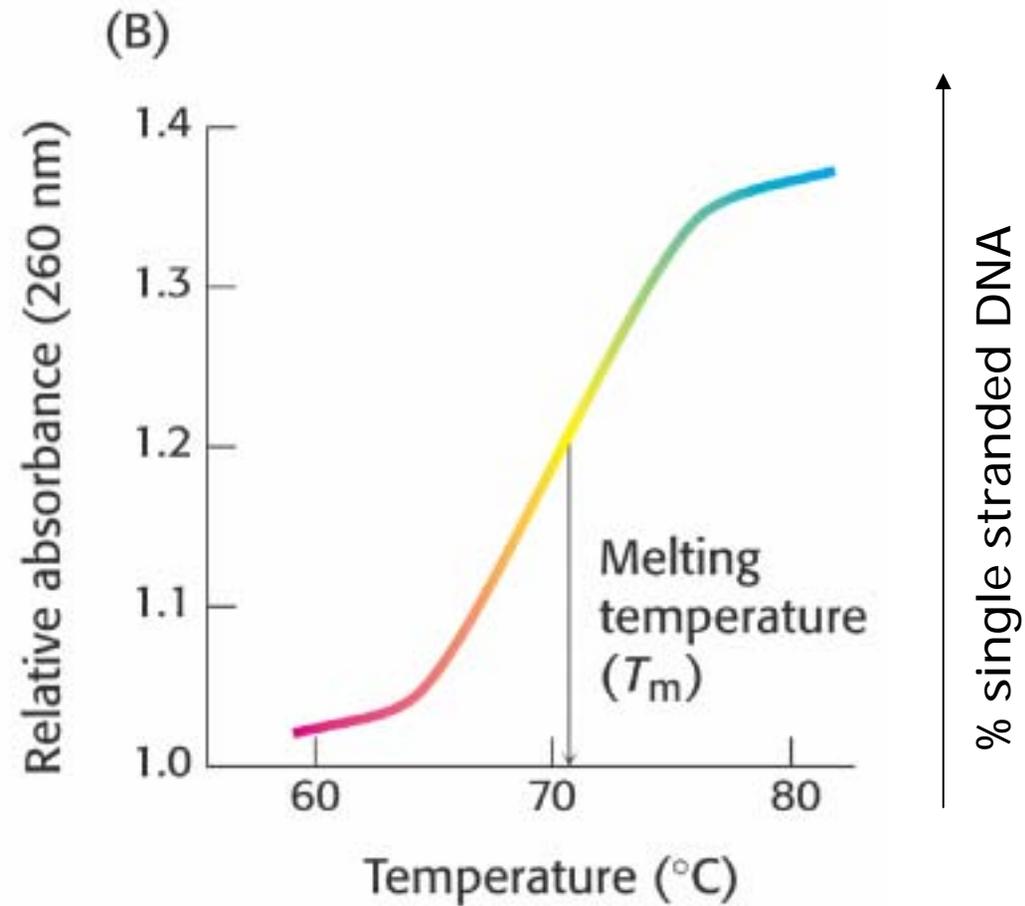
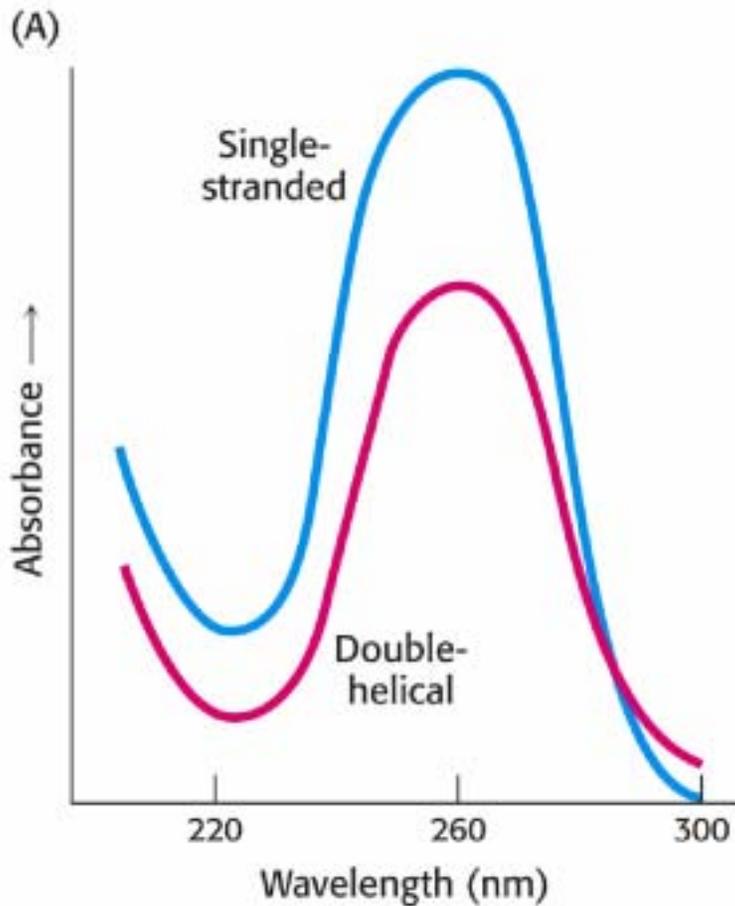
L'hybridation d'acides nucléiques ou de protéines

détection et identification d'une molécule d'ADN ou d'ARN, ou de protéine de séquence donnée dans un mélange

⇒ Utilisation de sondes complémentaires

- ✓ complémentarité de séquence (AN) ou de structure (protéines)
- ✓ complexe sonde-cible (hybride) :
 - ADN-ADN (sonde= complémentaire antiparallèle)
 - ADN-ARN
 - protéine-protéine
- ✓ spécifique même en présence d'un large excès de molécules similaires mais non identiques
- ✓ en solution ou sur support solide (membrane, verre, colonie bactérienne, chromosome, coupe de tissus, ...)

Fusion de l'ADN (réaction réversible)



T_m : température de fusion
= 50% des fragments sous forme simple brin

fonction de :

- longueur du fragment simple brin
- composition en bases
- présence de certains ions dans le milieu

L'hybridation d'acides nucléiques ou de protéines

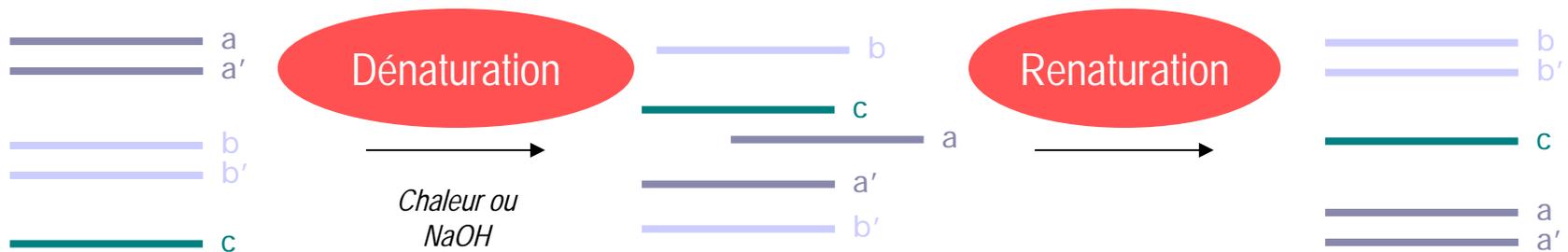
Principe

✓ Dénaturation d'ADN double brin de séquences différentes

séparation des brins par rupture des liaisons hydrogènes ($T > T_m$ ou $\text{pH} > 12$)

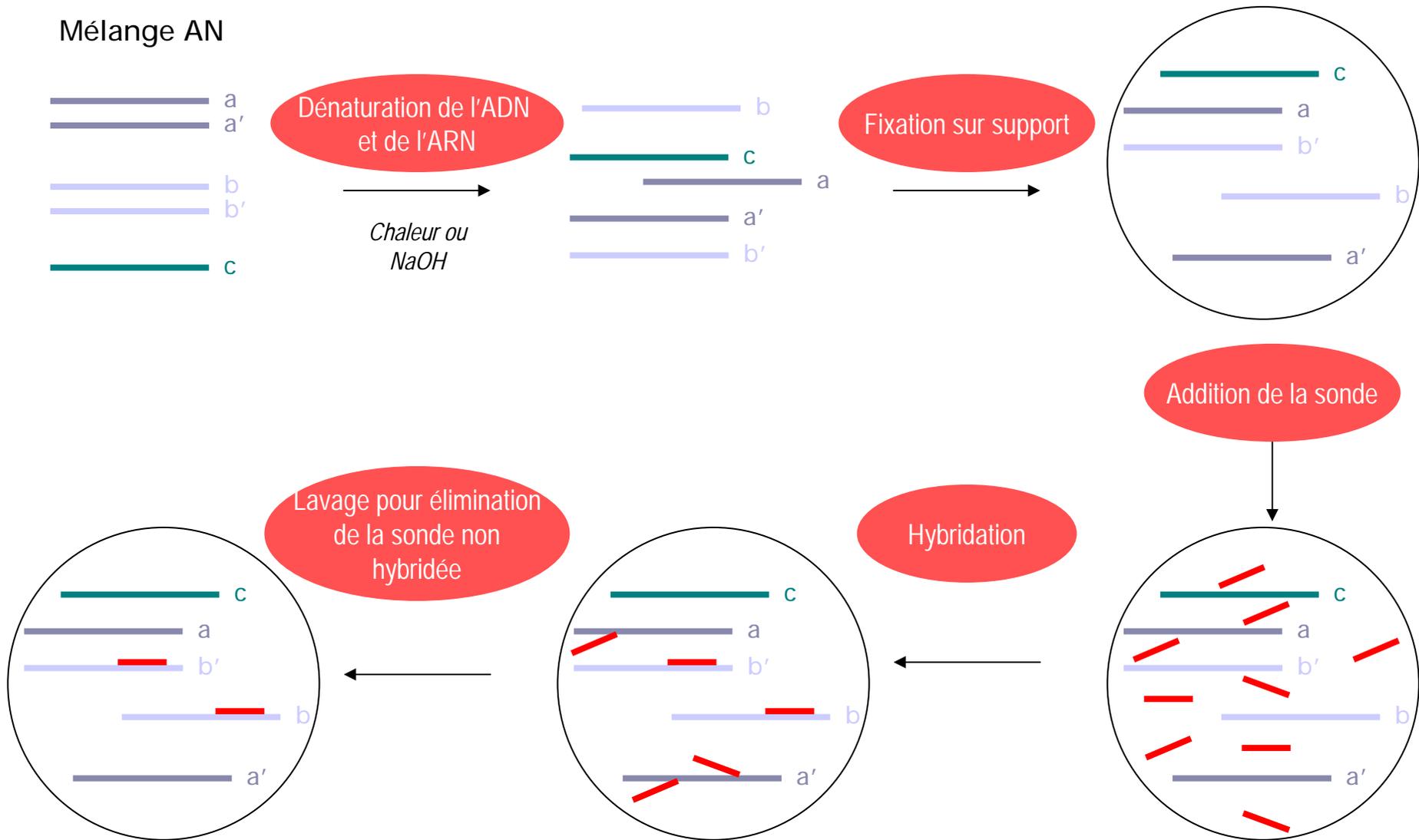
✓ Réassociation spécifique des ADN simple brin

conditions favorables température/pH



(a,a'), (b,b') séquences double brin complémentaires

Mélange AN



Températures d'hybridation et de lavage < à T_m sonde (~ 5 à 10°C)

(favoriser et conserver l'association de la sonde sur sa cible et défavoriser les mésappariements de la sonde avec une séquence homologue)

Le marquage des sondes

sondes radioactives

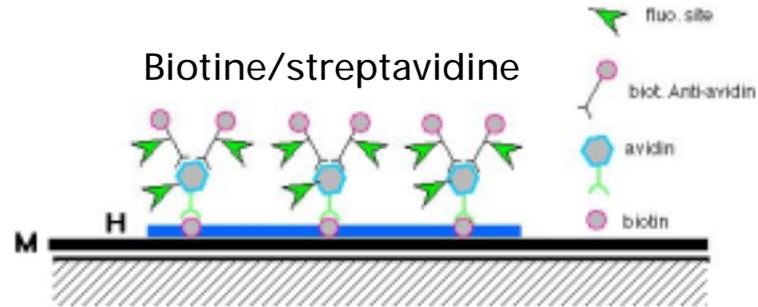
- double ou simple brin
- Phosphore³² (radioisotope le plus utilisé), Soufre³⁵, Tritium H³
- incorporé dans la sonde enzymatiquement au moyen de nucléotides triP radiomarqués
- marquage aux extrémités ou sur la totalité de la molécule

Le marquage des sondes

sondes froides

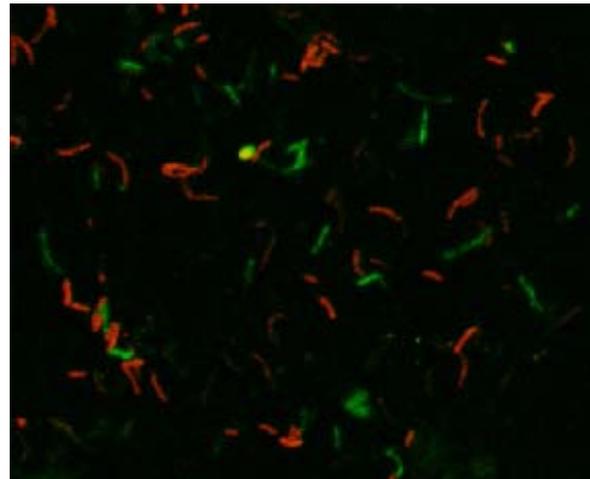
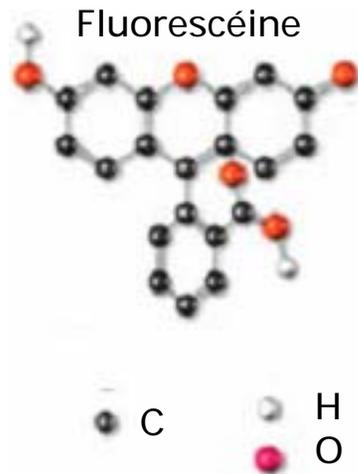
✓ Haptènes

molécules qui peuvent être reconnues par un anticorps

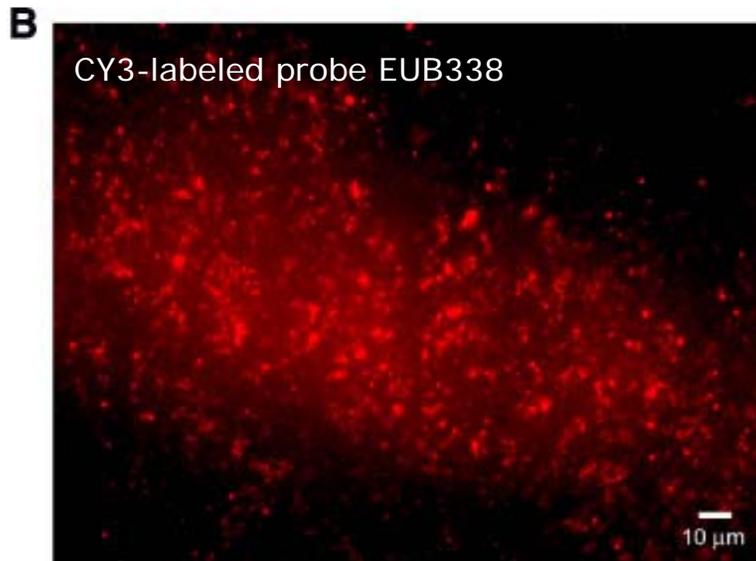
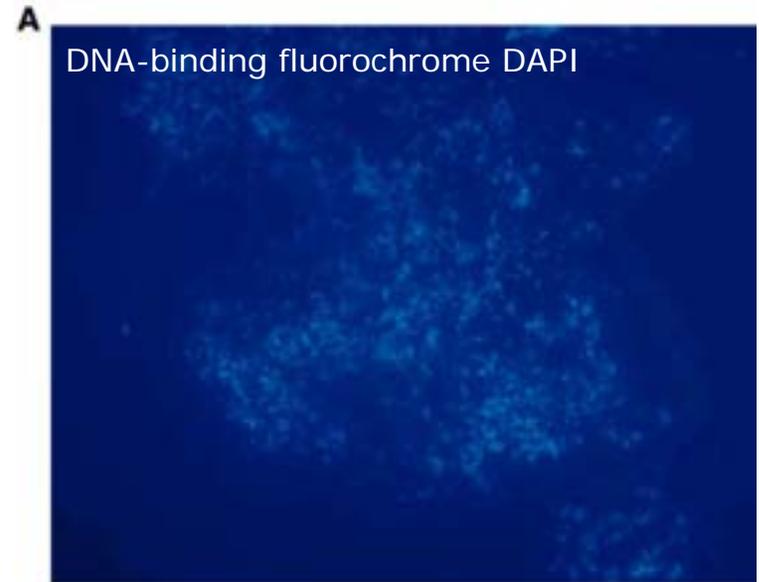
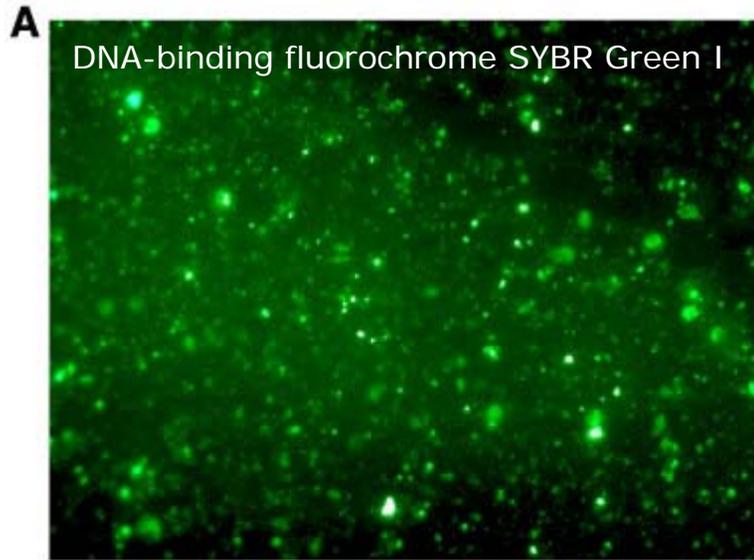


✓ Fluorophores

molécules avec noyaux aromatiques polycycliques fluorescents



Hybridation fluorescente in situ (FISH)



⇒ Permet l'identification de cellules individuelles

