



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département: Microbiologie**

**قسم: ميكروبيولوجي**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Ecologie Microbienne**

Intitulé :

---

**Caractérisation des bactéries isolées d'un sol destiné à la culture  
céréalière**

**Approches phénotypique et Bioinformatique**

---

Présenté et soutenu par: **BOULEKZAZ WASSILA**  
**BOUDERBALA MERIEM**

**Le : 15/06/2015**

**Jury d'évaluation :**

<b>Présidente du jury :</b>	<b>Mme SAKHRI N.</b>	Maitre de Conférences B Université Frères Mentouri Constantine
<b>Examinatrice :</b>	<b>Mme GUERGUOURI I.</b>	Maitre Assistant A Université frères Mentouri Constantine
<b>Rapporteur :</b>	<b>HAMIDECHI M. A.</b>	Pr. Université Frères Mentouri Constantine

*Année universitaire*  
**2014 - 2015**

## Table des matières

<b>Dédicaces</b> .....	i
<b>Remerciements</b> .....	ii
<b>Listes des figures</b> .....	iii
<b>Liste des tableaux</b> .....	iii
<b>Liste des photos</b> .....	iv
<b>Liste des annexes</b> .....	v
<b>Liste des abréviations et acronymes</b> .....	vi
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>Introduction</b> .....	1
<b>1-LES BACTERIES DU SOL</b> .....	3
<b>2- ELEMENTS DE LA SYSTEMATIQUE BACTERIENNE</b> .....	4
2-1 Systématique à l'échelle phénétique .....	4
2-1-1 Analyse des caractères morphologiques .....	4
2-1-2 Analyses des caractéristiques biochimiques et métaboliques .....	5
2-1-3 Caractérisation physiologique .....	5
2-2 Systématique à l'échelle biomoléculaire (Données et outils) .....	6
2-2-1 Méthodes génotypiques .....	6
2-2-2 Les marqueurs moléculaires : Cas de l'ADN 16S .....	7
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	
<b>A- MATERIEL</b> .....	14
1- Description du site de prélèvement .....	14
2- Echantillonnage .....	14
3- Outils bioinformatiques .....	14
<b>B- METHODES</b> .....	15
1-1 Isolement et purification .....	15
1-2 Caractérisation présomptive des isolats bactériens .....	16
1-2-1 Etude des caractères morphologiques .....	16
1-2-2 Métabolisme glucidique .....	17
1-2-3 Etude des enzymes respiratoires terminales .....	17
1-2-4 Étude des voies fermentatives intermédiaires des acides complexes .....	18
1-2-5 Métabolisme protéique .....	18
2-Analyse bioinformatique des séquences 16S .....	19

2-1 Identification des isolats .....	19
2-2 Acquisition des séquences 16S via GenBank .....	19
2-3 Analyse thermodynamique de la structure secondaire des ARNr 16S .....	20
2-4 Analyse phylogénétique des isolats .....	21
<b>PARTIE RESULTATS</b>	
1- Analyse microbiologique du sol .....	22
1-1 Caractérisation présomptive des isolats bactériens .....	22
1-1-1 Aspects macro et microscopique .....	22
1-1-2 Les caractères biochimiques .....	25
1-1-3 Les caractères physiologiques .....	27
2-Analyse bioinformatique des séquences 16S des isolats .....	28
2-1 Identification et classification des isolats .....	28
2-2 Prédiction structurale secondaire et énergie libre des ARNr .....	29
2-3 Analyse phylogénétique des isolats .....	32
<b>DISCUSSION GENERALE</b> .....	34
<b>CONCLUSION</b> .....	36
<b>Références bibliographiques</b> .....	37
<b>Annexes</b>	
<b>Glossaire</b>	
<b>Résumés</b>	

## DEDICACES

Je dédie ce mémoire à :

**Mes chers parents** : qui ont œuvré pour ma réussite, de par leur amour, leur soutien, tous les sacrifices consentis et leurs précieux conseils, recevez à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

**Mes frères, Ma sœur MARWA et surtout de ma nièce NOURSINE** qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

**Mes enseignants** de la spécialité d'Ecologie Microbienne qu'ils trouvent dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.

*WASSILA*

## Dédicace

J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à :

Mes chers parent qui m'avez dirigé et suivi pondant toute mes étude, leurs conseils m'ont suivi permis d'atteindre le bous de chemin. Soient fiers de moi aujourd'hui

Amon cher et tendre époux SEIF EDDINE je noublierais jamais ta patience avec moi et ta grande générosité

**Mes frères et sœurs** qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

MA SŒUR : HANEN et son mari SABER et ses enfants :RAGHAD ET CHAHD

A mes beaux parent ,vers lesquels j'ai un grand respect

A mes belles sœurs ;et mon beau frère HAMZA

**Mes enseignants** de la spécialité d'Ecologie Microbienne qu'ils trouvent dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.

A tous mes camarades de promotion

Egalement je dédie ce travail à ma chère ILHEM et mes amies : IMEN, SAMIHA, BESMA

*MERIEM*

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer notre plus profonde reconnaissance à :

Notre encadreur **Pr HAMIDECHI M. A.** pour son aide et sa précieuse attention,

**Mme SAKHRI N.** pour avoir accepté de présider notre jury et consacré de son temps à la lecture de notre mémoire pour y apporter les meilleurs perfectionnements

**Mme GUERGOURI I.** pour sa contribution à ce jury et pour avoir donné son appréciation sur le contenu de ce travail

A vous tous nous adressons la plus forte expression de respect et d'hommage, car vous avez tous été nos enseignants un jour

Un remerciement particulier est adressé à **Mlle BOUYOUCEF Lilia**, Doctorante en Ecologie Microbienne, pour nous avoir assisté durant toute la période de réalisation de ce travail.

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Structure du ribosome procaryote et ses sous-unités.....	8
<b>Figure 2 :</b> Organisation de l'opéron de l'ADNr observé chez les procaryotes (El Hilali, 2006).....	8
<b>Figure 3 :</b> Représentation schématique de la structure secondaire d'un ARN.....	9
<b>Figure 4 :</b> Photographie satellitaire du site de prélèvement.....	13
<b>Figure 5 :</b> Phylogramme des cinq souches réalisé par la méthode NJ.....	32

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Les amorces les plus fréquemment utilisées et leurs séquences.....	12
<b>Tableau 2 :</b> Résultats des caractères phénotypiques des cinq isolats.....	22
<b>Tableau 3 :</b> Aspects macro et microscopique des isolats.....	23
<b>Tableau 4 :</b> Classification des souches identifiées.....	28
<b>Tableau 5 :</b> Structures secondaires d'ARNr 16S et l'énergie libre des souches identifiées.....	29
<b>Tableau 6 :</b> Matrice des thermodynamiques des séquences rRNA 16S.....	31
<b>Tableau 7 :</b> Matrice des distances (%) après alignement multiple des séquences 16S rRNA....	31

## Liste des photos

<b>Photo 1</b> : Séchage du sol à température ambiante .....	14
<b>Photo 2</b> : Tamisage du sol à 2 mm.....	14
<b>Photo 3</b> : Aspects des différentes dilutions du sol ( $10^{-1} - 10^{-6}$ ).....	15
<b>Photo 4</b> : Interface du Classeur Excel d'identification bactérienne.....	18
<b>Photo 5</b> : Interface de la base de données Nucleotide de NCBI montrant les résultats des séquences 16S.....	19
<b>Photo 6</b> : Interface du site Internet de RNA Fold web server.....	19
<b>Photo 7</b> : Interface principale du Portail Mobylye.....	20
<b>Photo 8</b> : Interface de Mega 5.2.....	20
<b>Photo 9</b> : Exemple de l'aspect du milieu Mannitol-Mobilité de l'isolat S4.....	24
<b>Photo 10</b> : Résultat obtenu de la culture de S5 sur milieu TSI.....	24
<b>Photo 11</b> : Présence des LDC, ODC et ADH chez l'isolat S1.....	25
<b>Photo 12</b> : $RM^+$ et $VP^-$ chez l'isolat S1 .....	25
<b>Photo 13</b> : $RM^-$ et $VP^+$ chez l'isolat S5.....	25
<b>Photo 14</b> : Présence de la nitrate réductase chez l'isolat S2.....	26
<b>Photo 15</b> : Présence de l'uréase chez S3.....	26
<b>Photo 16</b> : Absence de l'indole chez S3.....	26
<b>Photo 17</b> : Réaction positive au test de l'oxydase chez S1.....	27

## Liste des annexes

**Annexe 1 :** Séquence 16S de *Salmonella sp.*

**Annexe 2 :** Séquence 16s de *Chromobacterium violaceum*

**Annexe 3 :** Séquence 16S de *Pseudomonas fluorescens*

**Annexe 4 :** Séquence 16S de *Enterobacter aerogenes*

**Annexe 5 :** Séquence 16S de *Enterobacter intermedius*

**Annexe 6 :** Structure secondaire 2D 16S de *Salmonella sp*

**Annexe 7 :** Structure secondaire 2D 16S *Chromobacterium violaceum*

**Annexe 8 :** Structure secondaire 2D 16S de *Pseudomonas fluorescens*

**Annexe 9 :** Structure secondaire 2D 16S *Enterobacter aerogenes*

**Annexe 10 :** Structure secondaire 2D 16S *Enterobacter intermedius*

**Annexe 11 :** Diagramme de l'énergie libre de *salmonella sp*

**Annexe 12 :** Diagramme de l'énergie libre de *Chromobacterium violaceum*

**Annexe 13 :** Diagramme de l'énergie libre de *Pseudomonas fluorescens*

**Annexe 14 :** Diagramme de l'énergie libre de *Enterobacter aerogenes*

**Annexe 15 :** Diagramme de l'énergie libre de *Enterobacter intermedius*

**Annexe 16 :** Diagramme de l'énergie libre de *Salmonella sp.* prédit par GenMark

**Annexe 17 :** Diagramme de l'énergie libre de *Chromobacterium violaceum* prédit par GenMark

**Annexe 18 :** Diagramme de l'énergie libre de *Pseudomonas fluorescens* prédit par GenMark

**Annexe 19 :** Diagramme de l'énergie libre de *Enterobacter aerogenes* prédit par GenMark

**Annexe 20 :** Diagramme de l'énergie libre de *Enterobacter intermedius* prédit par GenMark

**Annexe 21 :** Structure 2D consensus des cinq séquences ARNr 16S

## Liste des abréviations et acronymes

ADH: Arginine DiHydrolase

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

dct: *Dicarboxylate transport gene*

EMBL: *European Molecular Biology Laboratory*

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Eau Oxygénée

H<sub>2</sub>S : sulfure d'hydrogène

ITS: *Internal Transcribed Spacer*

Kb: Kilobit

KNO<sub>3</sub>: Potassium nitrate

LDC: *lysine décarboxylase*

MEVAG : Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides

NaCl : chlorure de sodium

NCBI: National Centre for Biotechnology Information

nt: nucleotide

ONPG: Orthonitrophényl-β-galactoside

PCR: polymerase Chain Reaction

RDP: Ribosomal Database Project

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RM: Rouge de Méthyle

rrs: *ribosomal RNA small subunit*

rrl: *ribosomal RNA large subunit*

S: Svedberg

TDA: tryptophane désaminase

UniPro: Universal Protein Resource

VP: Voges-Proskauer

## INTRODUCTION

Le sol est considéré, par excellence, le support de toute la biosphère continentale. Il permet aux microorganismes d'effectuer toutes les formes métaboliques et physiologiques vitales afin de préserver, à la fin, une chaîne alimentaire équilibrée qui va du microorganisme au prédateur.

Certaines interactions sont importantes à signaler entre les différentes communautés du sol, principalement, celles observées entre la bactérie et les racines des plantes : la symbiose. D'autres fonctions peuvent également être attribuées au microbiote tellurique à savoir la décomposition de la matière organique morte et le recyclage des éléments minéraux tels que le phosphore et l'azote.

C'est cet intérêt d'ordre agronomique qui a orienté la communauté scientifique (ici, les microbiologistes) à isoler et identifier le microbiote du sol pour pouvoir utiliser les compétences de celui-ci pour des rendements et des productions meilleurs.

Mais, les microbiologistes, particulièrement les systématiciens, se heurtent à des difficultés insupportables du fait que l'identification formelle d'un tel ou tel isolat, n'est pas aussi facile ni évidente face aux particularités spécifiques des différentes classes bactériennes et surtout que, seulement une faible partie de cet ensemble bactérien (10%) est cultivable sur milieux de croissance dans les laboratoires de microbiologie. De plus, les besoins nutritifs et les conditions environnementales ne sont pas identiques entre les individus bactériens : On arrive à bien isoler les bactéries organotrophes mais moins les lithotrophes.

Les méthodes d'identification sont bien nombreuses et regroupent plusieurs interfaces : phénotypique, biomoléculaire, chimique, etc. et leur emploi requiert des connaissances approfondies ; ce qui n'est pas évident au sein des utilisateurs de ces techniques.

C'est dans cette même perspective que nous avons tracé un plan de travail pratique afin de proposer une approche, à la fois microbiologique classique (tests phénotypiques) et analytique *in silico* (analyse bioinformatique des séquences d'ARNr 16S).

Les objectifs de ce travail se résument donc comme suit :

- Caractériser phénotypiquement les germes isolés à partir d'un sol de culture céréalière
- Confirmer les liens de parenté, à l'échelle de la systématique, entre les isolats bactériens par une approche bioinformatique : comparaison des structures primaires des séquences 16S et prédiction de leurs structures 2D.

Ce travail entre dans le cadre d'un projet de recherche CNEPRU (enregistré au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique sous le code *F00920140056*) et est réalisé au laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire intitulé : *Biologie moléculaire et Phylogénie des microorganismes*.

Notons, enfin, que les séquences 16S de nos propres isolats devaient être fournies par l'institut Pasteur de Paris (France) ; mais à défaut, nous avons utilisées celles de GenBank.

## 1- LES BACTERIES DU SOL

La majorité des bactéries du sol sont hétérotrophes vis à vis du carbone et montrent une large diversité quant aux rôles et fonctions exercés au sein de cet environnement. En effet, les bactéries du sol, en dehors de leurs multiples interactions, vont réagir avec d'autres organismes tels que les végétaux pour assurer des bénéfices réciproques représentés principalement par un métabolisme énergétique qui va favoriser la multiplication du microbiote tellurique. Les végétaux, en sécrétant dans le milieu extérieur des exsudats racinaires (molécules organiques, qui représentent, selon les espèces, entre 5 et 40% du la carbone photo synthétisé !), vont 'réveiller' les bactéries qui vont croître et atteindre de fortes populations dans la zone rhizosphérique (jusqu'à  $10^{10}$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme de sol : entre 10 milliards et 1000 milliards !), bien plus que dans le sol environnant. Cette sécrétion des produits synthétisés par la plante dans le sol par les racines porte le nom de rhizodéposition. Sous le terme exsudats racinaires sont englobés diverses molécules organiques qui diffèrent selon les espèces de plantes.

On peut classer en trois grandes catégories les bactéries stimulées par la rhizodéposition :

- Les bactéries symbiotiques : c'est le cas des bactéries des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Azorhizobium*. Elles vont permettre la nutrition azotée des végétaux de la famille des Fabacées en fixant l'azote atmosphérique ( $N_2$ ).

Les fonctionnements de l'échange de stimuli qui précède la constitution de la nodosité sont connus : les rhizobiums exercent une action stimulante sur la plante en synthétisant des flavanones et chalcones à proximité des racines. Suite à l'accroche des bactéries en limite de zone d'élongation de la racine. Puis elles 'infectent' les poils racinaires après qu'ils se soient recourbés en prenant une forme de crosse, qui évoluera vers la nodosité. La plante répond aux stimuli des bactéries en synthétisant des nodulines, précédant et accompagnant l'infection. Plusieurs gènes vont être impliqués pour accompagner la symbiose, sur plusieurs actions :

- Déformation des poils racinaires,
- formation du cordon d'infection,
- morphogénèse de la nodosité,
- formation de la membrane enveloppante,
- alimentation énergétique des bactéries,

- transport d'oxygène,
- assimilation de l'azote.

On peut aussi citer dans ce groupe une autre espèce fixatrice d'azote, chez les monocotylédones : *Azospirillum brasilense*.

- la seconde, regroupe les bactéries qui vont stimuler la plante de manière indirecte :
  - Soit en minéralisant des composés organiques, ces minéraux devenant absorbables par les poils absorbants.
  - Soit en rendant disponibles des éléments qui l'étaient peu, en sécrétant des acides organiques (ex : solubilisation des phosphates calciques).
  - Soit en contrôlant le développement de pathogènes (par production d'antibiotiques, par parasitisme, ou par appauvrissement du milieu en éléments nutritifs).
- la troisième catégorie : regroupe des microorganismes stimulant la croissance du végétal, en émettant des phytohormones (gibbérellines, cytokinines, acide indolacétique...), des vitamines et certains acides aminés.

## 2- ELEMENTS DE LA SYSTEMATIQUE BACTERIENNE

### 2-1 Systématique à l'échelle phénétique

L'analyse préliminaire dans l'identification microbienne se fait souvent avec une ou plusieurs méthodes phénotypiques. Les méthodes phénotypiques conviennent aux microorganismes qui sont cultivables et qui ont des paramètres de croissance, ainsi qu'un profil physiologique et biochimique bien établis.

#### 2-1-1 Analyse des caractères morphologiques

Ces méthodes utilisent les colonies et la morphologie des cellules afin d'obtenir une identification initiale du microorganisme. On y parvient en isolant simplement le microorganisme, en le cultivant et par la suite en l'observant visuellement à l'aide d'un microscope. Les propriétés morphologiques comprennent :

- La forme,
- la taille,

- la pigmentation,
- les caractéristiques des parois cellulaires (coloration de Gram),
- les caractéristiques de sporulation,
- la motilité,
- les inclusions cellulaires et les caractéristiques ultrastructurales.

### 2-1-2 Analyses des caractéristiques biochimiques et métaboliques

Les méthodes d'identification phénotypiques comprennent l'étude du profil biochimique et des propriétés métaboliques d'un microorganisme.

Les tests biochimiques utilisent des milieux de croissance, des éléments nutritifs et des produits chimiques pour provoquer une réponse biochimique observable et mesurable chez le microorganisme ; ce qui permet son identification et sa caractérisation. Ces tests comprennent :

- L'utilisation de sources de carbone et d'azote,
- la production d'intermédiaires de la fermentation,
- la production d'enzymes,
- la production de composés antimicrobiens.
- les tests d'oxydation / fermentation,
- les tests de Rouge de Méthyle (RM),
- les tests de Voges-Proskauer (VP),
- la réduction des nitrates,
- l'hydrolyse du tryptophane,
- la voie d'attaque des glucides test MEVAG (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides).

Plusieurs systèmes commerciaux miniaturisés et automatisés sont actuellement offerts et permettent l'identification rapide des microorganismes.

### 2-1-3 Caractérisation physiologique

Basée sur l'étude du comportement des bactéries vis-à-vis des conditions naturelles ou contrôlées du milieu dans lequel elles vivent, cette caractérisation peut être réalisée par :

- L'étude de l'influence des facteurs abiotiques sur la croissance bactérienne

Certains facteurs abiotiques peuvent influencer et intervenir, de façon primordiale, dans la croissance des bactéries et par conséquent dans l'obtention d'une culture optimale. Parmi ces facteurs on trouve :

- La température de croissance (afin de déterminer l'intervalle de température dans lequel les bactéries peuvent croître en plus de la température optimale),
- le pH (capacité de croissance à des pH acides et basiques),
- la pression osmotique (capacité de croître à différentes concentrations de NaCl),
- la pression partielle d'oxygène (détermination du mode respiratoire aérobie stricte/aéro-anaérobie facultative /micro-aérophile /anaérobie stricte/ anaérobie aéro-tolérant).

#### - La recherche d'enzymes d'intérêt

Certaines enzymes ont une grande importance lors de l'établissement des critères de l'identification des bactéries telles que :

- La catalase dont la principale fonction est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ),
- L'oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes et qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur final d'électrons,
- La nitrate-réductase dont le rôle est la réduction des nitrates en nitrites,
- Recherche de la  $\beta$ -lactamase (résistance aux antibiotiques  $\beta$ -lactames),
- Résistance aux métaux lourds : Des mécanismes de résistance aux métaux lourds tels que la biominéralisation diffèrent de véritables résistances aux métaux lourds. Ces mécanismes sont liés à la présence de gènes portés par les plasmides.

## 2-2 Systématique à l'échelle biomoléculaire (Données et outils)

La mise au point de méthodes moléculaires a grandement amélioré la capacité de déceler, d'identifier et de classer les microorganismes rapidement et d'établir la relation taxonomique entre les genres et les espèces étroitement apparentées. L'identification à l'aide de méthodes moléculaires repose sur la comparaison de séquences d'acides nucléiques (ADN, ARN) ou des protéines d'un microorganisme avec les données documentées d'organismes connus (bases et banques de données).

### 2-2-1 Méthodes génotypiques

Il s'agit des méthodes telles que l'hybridation d'acide nucléique et les technologies basées sur la PCR et le séquençage. L'identification repose également sur des comparaisons de séquences (Blasting et alignements) de régions génomiques hautement conservées telles que l'ARNr 16S ou l'ARNr 18S, ou sur des RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ou pourcentage GC dans l'ADN, avec les données correspondantes sur les organismes connus.

Une identification génotypique fiable nécessite des bases de données dotées d'informations exactes et complètes sur des séquences obtenues auprès d'un grand nombre de taxons. Parmi les bases de données de séquences de gènes couramment utilisées, on compte :

- GenBank,
- Ribosomal Database Project (RDP),
- *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL),
- Universal Protein Resource (UniProt).

### 2-2-2 Les marqueurs moléculaires : Cas de l'ADNr 16S

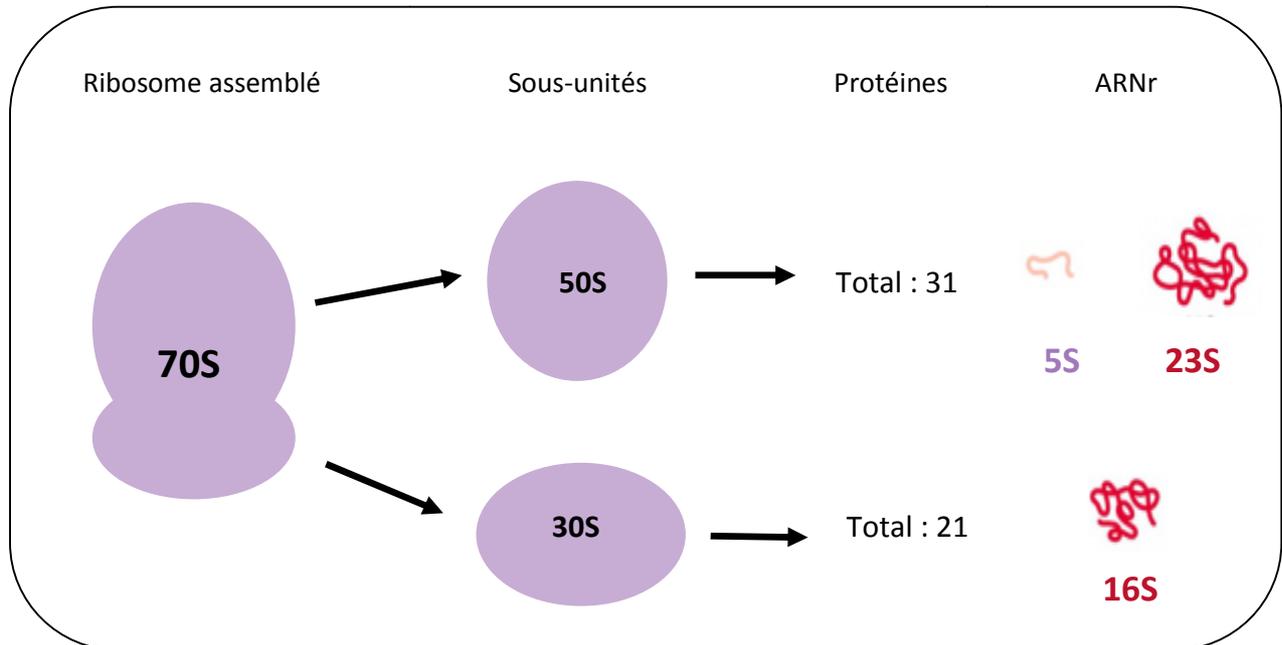
Un marqueur biochimique et moléculaire est une protéine, une enzyme (isoenzyme) ou une séquence d'ADN résultant d'un polymorphisme, facilement détectable et transmissible génétiquement, dont l'expression est indépendante de l'environnement et peut être utilisé pour caractériser les espèces bactériennes et évaluer leur diversité génétique aux niveaux intra- et inter-populations. Parmi ces marqueurs on trouve :

Les gènes ribosomiques, plus particulièrement les gènes 16S et 23S, ont fait leur preuve en tant que marqueurs moléculaires dans les études systématiques et phylogénétiques de différents microorganismes en raison de leur universalité, leur abondance, leur taille convenable aux analyses comparatives (Ludwig et Schleifer, 1999). Les ADNr contiennent par ailleurs des régions de séquences hautement conservées, très utiles pour la désignation des amorces (Hillis et Dixon, 1991 ; Stahl et Amman, 1991) et d'autres régions de séquences suffisamment variables pour servir comme un excellent moyen taxonomique (Bouvert et Grimont, 1986).

Chez les procaryotes, le ribosome est formé de deux sous-unités:

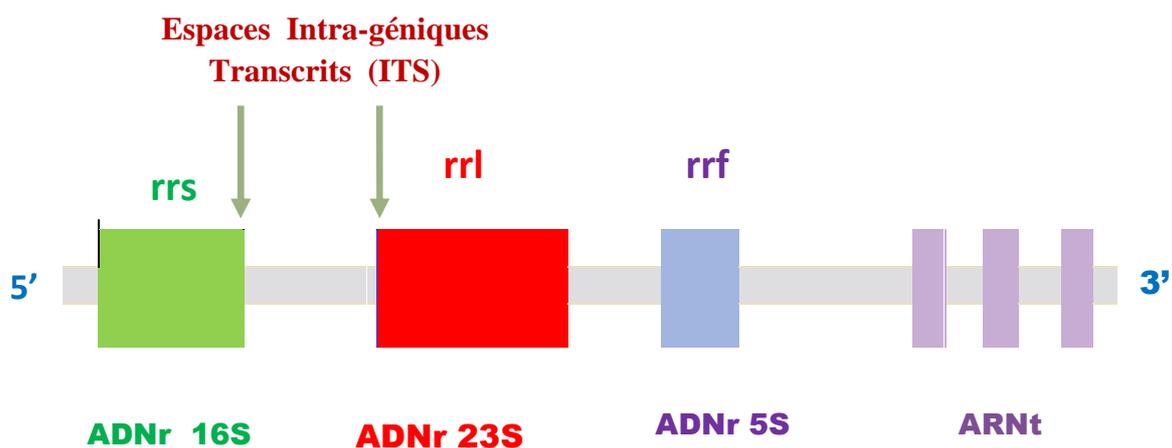
- La petite sous-unité (30S) contient l'ARNr 16S et 21 protéines,

- la grande sous-unité (50S) contient respectivement deux ARNr différents (le 23S et le 5S) et 31 protéines (Mears *et al.*, 2002) (figure 1).



**Figure 1 :** Structure du ribosome procaryote et ses sous-unités.

Les gènes codant pour ces trois ARNr sont organisés en opérons qui contiennent également des espaces intra-géniques ainsi que d'autres gènes codant pour les ARNt (figure 2).

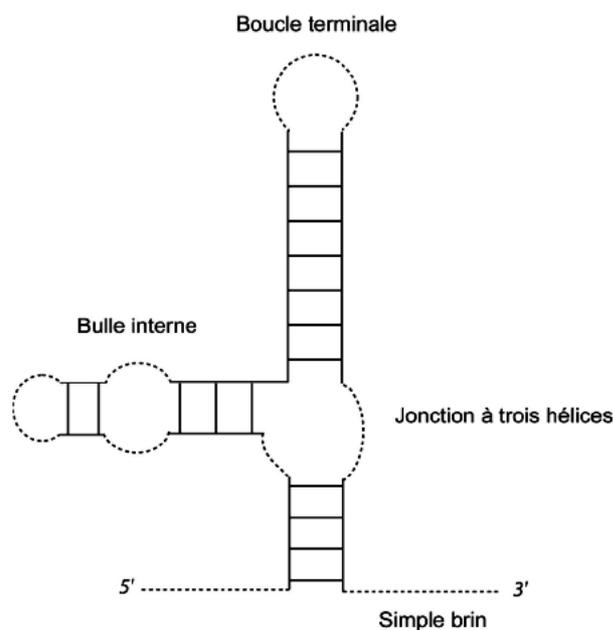


**Figure 2 :** Organisation de l'opéron de l'ADNr observé chez les procaryotes (El Hilali, 2006)

L'ADNr 5S est très peu utilisé dans les études de diversité vu sa petite taille d'environ 120 nucléotides. Contrairement à ce dernier, l'ADNr 16S codant pour la petite sous unité ribosomique d'environ 1500 pb (opéron *rrs*) et l'ADNr 23S codant pour la grande sous unité d'environ 2500 à

3000 pb (opéron *rrl*) (Gürtler et Stanisich, 1996) sont très utilisés. L'espace entre les deux opérons *rrs* et *rrl* est transcriptionnel d'où la désignation ITS (Normand *et al.*, 1996). Il est aussi utilisé dans les études phylogénétiques. Toutefois, depuis que Woese (1987) a montré que le gène de l'ADNr 16S est présent chez toutes les bactéries (universalité), qu'il a la même fonction et que sa structure est conservée, plusieurs chercheurs l'ont préférentiellement utilisé comme une approche rapide pour évaluer la variabilité génétique entre les souches de *Rhizobia* (Laguerre *et al.*, 1994 ; Nour *et al.*, 1994b).

La structure secondaire de l'ARNr 16S est prédite à la suite d'un alignement multiple des séquences. Elle est bien conservée et riche en segments hélicoïdaux (tiges) séparés par des boucles contenant des bases non appariées (Reginald *et al.*, 2000) (figure 3).



**Figure 3 :** Représentation schématique de la structure secondaire d'un ARN.

Seule les paires Watson-Crick sont représentées (lignes pleines). Les nucléotides non impliqués dans ces paires (en pointillés) appartiennent aux boucles terminales, aux bulles internes (symétriques ou asymétriques), aux brins qui lient les différentes hélices d'une jonction ou aux simples brins.

L'ARNr 16S possède de nombreuses fonctions parmi lesquelles on compte :

- Rôle structural : définissant les positions des protéines ribosomales,
- l'extrémité 3' contient une séquence "anti-Shine-Dalgarno" (AGGAGG) qui se lie en amont du codon AUG (start codon) de l'ARNm. L'extrémité 3' de l'ARNr 16S se lie aux protéines S1 et S21 connues pour être impliquées dans l'initiation de la synthèse des protéines,
- interagit avec le 23S, contribuant ainsi à la liaison des deux sous-unités ribosomiques (30S et 50S),
- stabilise l'appariement codon-anticodon sur le site A du ribosome par l'intermédiaire de la formation d'une liaison hydrogène entre l'atome N1 des résidus Adénine 1492 et 1493 et le groupe 2'OH de l'épine de l'ARNm.

Carl Woese et George E. Fox (1977) ont été les premiers à avoir utilisé l'ARNr 16S en phylogénie. Cependant, son utilisation à des fins taxinomiques présente des limites. En effet, malgré sa structure composée d'une alternance de régions variables et très conservées, le nombre de substitutions nucléotidiques est trop faible pour permettre une analyse phylogénétique entre des espèces très proches (Garcia-Martinez *et al.*, 1999 ; Kolbert et Persing, 1999).

Pour pallier cette insuffisance, en plus de l'analyse du gène ADNr 16S, il existe d'autres marqueurs phylogénétiques tels que les régions ITS, présentant une grande variabilité tant du point de vue taille que séquence ; ce qui permet une distinction entre des espèces phylogénétiquement très proches (Gurtler et Stanisich, 1996), ainsi que les "gènes de ménage".

L'amplification des gènes 16S, pour les analyses phylogénétiques et taxonomiques passe par leur amplification (PCR). Les amorces (oligonucléotides d'ADN monocaténares) utilisées lors des PCR servent à borner l'amplicon. Elles sont synthétisées par une primase. Ces amorces peuvent être droite ou gauches (sens et anti-sens). Lors du séquençage, on n'utilise qu'une seule des deux amorces du produit PCR. Il ne faut jamais faire passer les deux séquences "sens" et "anti-sens" ensemble dans le séquenceur.

Le choix des amorces est sans doute le paramètre le plus important pour le succès de la PCR. En effet, plusieurs variables doivent être prises en considération. En voici quelques-unes des plus importantes:

- D'une façon générale, les amorces utilisées doivent avoir une longueur de 17–30 nucléotides (Coutouly *et al.*, 2006), ce qui autorise une température d'hybridation raisonnablement élevée.
- Le couple d'amorces doit être riche en G et C (l'idéal entre 55 et 65%)
- Les amorces doivent être exemptes de suites de séquences de polybases (poly-dG, par exemple) ou de motifs répétitifs, ceux-ci pouvant s'hybrider de manière inadéquate avec la matrice.
- Il convient d'éviter les séquences répétées inversées afin d'empêcher la formation de structures secondaires dans l'amorce (formation d'épines ou de boucles), ce qui empêcherait l'hybridation avec la matrice.
- Les séquences complémentaires d'autres amorces utilisées dans la PCR devraient également être évitées afin d'empêcher l'hybridation entre amorces ou la formation de dimères d'amorce (particulièrement important pour l'extrémité 3' de l'amorce).
- Si possible, l'extrémité 3' de l'amorce devrait être riche en bases de G et C pour une meilleure hybridation de l'extrémité qui sera étendue.
- La distance entre les amorces devrait être inférieure à 10 Kb.

La séquence d'amorce renseigne sur plusieurs propriétés, telles que la position et la longueur du produit, sa température de fusion et finalement le rendement (Innis et Gelfand, 1994). Une amorce mal conçue peut empêcher le fonctionnement de la réaction PCR, conduire à une production faible, voire nulle, en raison d'une amplification non spécifique et/ou à la formation de dimères d'amorces, qui peuvent devenir suffisamment compétitifs pour inhiber la formation de produit.

La paire d'amorces la plus courante, nommée 27F et 1492R, a été initialement utilisée par Weisburg *et al.* en 1991 (tableau 1). Souvent, la 8F est utilisée plutôt que la 27F puisque les deux amorces sont pratiquement identiques, mais cette dernière contient un M à la place d'un C dans la 8F.

**Tableau 1 :** Les amorces les plus fréquemment utilisées et leurs séquences.

Amorces	Séquences (5'-3')	Références
8F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Eden P.A. <i>et al.</i> (1991)
U1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	
928F	TAA AAC TYA AAK GAA TTG ACG GG	Weidner S. <i>et al.</i> (1996)
336R	ACT GCT GCS YCC CGT AGG AGT CT	
1100F	YAA CGA GCG CAA CCC	
1100R	GGG TTG CGC TCG TTG	
337F	GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG	
907R	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	
785F	GGA TTA GAT ACC CTG GTA	
805R	GAC TAC CAG GGT ATC TAA TC	
533F	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A	
518R	GTA TTA CCG CGG CTG CTG G	
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Jiang, H. <i>et al.</i> (2006)
1492R	CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT	

R (PuRines) = A,G ; Y (pYrimidines) = T,C ; K (Keto) = T,G ; M (aMino) = A,C ; S (Strong) = G,C ; W (Weak) = A,T.

Les séquences types de l'ARNr 16S de la plupart des souches bactériennes et Archaea sont disponibles sur les bases de données publiques telles que NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Cependant, la qualité de ces séquences n'est pas validée pour la plupart d'entre elles. Par conséquent, les bases de données spécifiques qui recueillent seulement les séquences d'ARNr 16S, sont plus fiables. Les bases de données les plus fréquemment utilisées sont :

- EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>),
- RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>),
- SILVA ([www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de)),
- Greengenes (<http://greengenes.secondgenome.com>).

## A- MATERIEL

### 1- Description du site de prélèvement

L'échantillon du sol utilisé pour cette analyse a été prélevé au mois d'avril 2015 à Constantine, à partir d'un champ destiné à la culture céréalière (*Triticum durum* et *T. aestivum*). Le site de prélèvement (figure 4) est situé sur les terres agricoles sises entre Ain Smara (36,27° N latitude ; 6,5° E longitude) et Ali Mendjeli (36,15° N latitude ; 6,35° E longitude) de la Daira du Khroub (Wilaya de Constantine).



**Figure 4 :** Photographie satellitaire du site de prélèvement

### 2- Echantillonnage

Le prélèvement des échantillons a été effectué aléatoirement et au milieu du champ de culture afin d'éviter les bordures car plus exposées aux contraintes de l'environnement et la densité céréalière n'est pas significative ; ce qui influe sur la qualité bactériologique des prélèvements.

### 3- Outils bioinformatiques

Le matériel bioinformatique retenu pour cette analyse se compose principalement de :

- Logiciel d'identification bactérienne : Classeur Excel d'identification (<http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/spip.php?article58>)
- Portails bioinformatique NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) et Mobyly ([www.Mobyly.Pasteur.fr](http://www.Mobyly.Pasteur.fr))
- Logiciels de prédiction des structures secondaires des ARN : RNAFold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) et GenMark (<http://exon.gatech.edu/GenMark/>)
- Logiciel de phylogénie moléculaire et alignement multiple : MEGA 5.2

## B- METHODES

### 1- Analyse microbiologique du sol

1-1 Isolement et purification : L'échantillon a été transporté au laboratoire de Zoologie (Faculté SNV, Université Frères Mentouri Constantine) où il a été séché à température ambiante pendant 24h (photo 1), puis tamisé à 2 mm (photo 2).



**Photo 1 :** Séchage du sol à température ambiante      **Photo 2 :** Tamisage du sol à 2 mm

La réalisation des dilutions, à partir de l'échantillon, a été faite géométriquement à raison de dix (Bastide *et al.*, 1986).

- Peser 1g de sol tamisé dans un tube stérile contenant 9ml d'eau physiologique (solution mère à  $10^{-1}$ ).
- Mélanger pendant 5 min à l'aide d'un vortex pour obtenir une solution homogénéisée et détacher les cellules bactériennes des particules du sol.
- Effectuer des dilutions géométriques successives jusqu'à obtention de la dilution  $10^{-6}$  (photo3).



**Photo 3 :** Aspects des différentes dilutions du sol ( $10^{-1}$  –  $10^{-6}$ )

La mise en culture s'est effectuée par étalement, à l'aide d'un râteau, de 0,1ml prélevé des trois dernières dilutions ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$ ), sur boîtes de Pétri contenant de la GN.

Après incubation de 18 à 24h à  $37^{\circ}\text{C}$ , les colonies développées ont été repiquées sur GN dans un but de purification.

### 1-2 Caractérisation présomptive des isolats bactériens

Des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques ont été utilisés pour une caractérisation des isolats.

#### 1-2-1 Etude des caractères morphologiques

Cette étude a été basée sur des observations macroscopiques et microscopiques (x100) pour différencier l'aspect des colonies sur boîtes de Pétri, le type de Gram, la forme cellulaire ainsi que la disposition et la mobilité des cellules bactériennes (isolées ou regroupées).

- **Examen macroscopique :** L'observation de l'aspect macroscopique des colonies sur GN a concerné les éléments suivants (Thomas *et al.* (2002) :

- La forme des colonies : circulaires, avec contours régulier ou irrégulier,

- La couleur de la colonie,
- L'élévation : convexes, concaves, plates, à centre élevé,
- L'opacité : opaque, translucide ou transparente,
- La surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée.

- Aspect microscopique : Observation des bactéries sous microscope après coloration de Gram selon le protocole de Nicolle (1895):

- Préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec Bunsen,
- Recouvrir au violet de Gentiane pendant 1 à 5 min. Eliminer l'excès par l'eau courante,
- Ajouter du Lugol : deux bains de 4 à 6 secondes, Laver l'excès par l'eau courante,
- Traiter au mélange alcool/acétone (3/1), puis rinçage à l'eau,
- Recolorer à la Fuchsine pendant 20 secondes, puis rinçage à l'eau, et en fin, séchage.
- L'observation à l'huile à immersion.

### 1-2-2 Métabolisme glucidique

- Utilisation du Mannitol

Ensemencement au fil droit d'une anse de platine, par piqûre centrale du milieu jusqu'au fond du tube, à partir de la suspension bactérienne à tester. Incubation à 37°C pendant 18-24h.

- Fermentation du lactose, saccharose et production de gaz

Le milieu TSI a été ensemencé en réalisant une piqûre centrale dans le culot et des stries serrés sur la pente. Remettre le bouchon du tube sans le revisser complètement pour permettre un dégagement suffisant du H<sub>2</sub>S afin d'éviter un noircissement du milieu. Incubation à 37°C pendant 18-24h.

### 1-2-3 Etude des enzymes respiratoires terminales

- Recherche de l'oxydase

Sur une boîte de Pétri stérile vide, déposer un disque d'oxydase imprégné de diméthyl-para-phénylènediamine. À l'aide d'une anse de platine stérile prendre une colonie (culture pure de 18-24heures) et la déposer sur le disque. L'apparition d'une coloration violette immédiate signifie que la bactérie est oxydase positive.

#### - Recherche de la catalase

Une colonie bactérienne a été déposée sur lame stérile, puis dépôt d'une goutte d'eau oxygénée (à 10 volumes) sur cette colonie. L'effervescence est signe d'une réaction positive (la bactérie est dite catalase positive).

#### - Recherche de la nitrate réductase

Bouillon nitrate à 1‰  $\text{KNO}_3$  ensemencé à partir de la suspension bactérienne. Après une incubation 18-24h à 37°C, deux réactifs (Acide Sulfanilique : NR1 et  $\alpha$ -naphtylamine : NR2) ont été ajoutés au milieu. La lecture s'est faite après une simple agitation. Une pincée de poudre de Zinc est ajoutée dans le cas où le milieu reste incolore.

### 1-2-4 Étude des voies fermentatives intermédiaires des acides complexes

- Réaction au rouge de méthyle
- Réaction de Voges-Proskauer (Production d'acétoïne)

Une colonie de chaque isolat a été ensemencée sur le milieu Clark et Lubs puis incubée à 37°C/18-24h. Après culture, le bouillon a été partagé dans deux tubes stériles.

- Dans le premier tube trois gouttes de RM ont été ajoutées avec une légère agitation. La lecture a été faite immédiatement.
- Quant au deuxième tube, trois gouttes d'alpha naphthol (VP1) et de KOH (VP2) ont été ajoutées. Le tube a été incliné pour permettre une bonne oxygénation et la lecture a été faite après quelques minutes.

### 1-2-5 Métabolisme protéique

#### - Milieu Urée-Indole

La recherche de l'uréase : Ensemencement du milieu par quelques gouttes de la suspension bactérienne. Incubation à 37°C durant 24h.

La production d'indole: addition du réactif de Kovacs (trois gouttes) au milieu Urée-Indole précédemment ensemencé.

## - Recherche des décarboxylases : LDC, ODC et ADH

Le test a été réalisé sur le milieu Moeller réparti dans des tubes à hémolyse. Ces derniers ont été ensemencés à partir de la suspension bactérienne à tester, puis 1ml de vaseline stérile a été ajouté dans chaque tube pour favoriser l'anaérobiose. Incubation à 37°C pendant 18-24h.

## 2- Analyse bioinformatique des séquences 16S

### 2-1 Identification des isolats

Nous avons identifié les cinq souches par l'utilisation d'un classeur probabiliste Excel d'identification (photo 4). Ce dernier permet l'identification d'une souche microbienne à partir de son profil obtenu sur une minigalerie d'identification. Les dix tests retenus pour l'identification proposés par ce programme sont :

1. ONPG
2. ADH
3. LDC
4. ODC
5. CIT
6. H<sub>2</sub>S
7. UREE
8. TDA
9. INDOLE
10. VP

API 20E+ (version 4.1)											Proba	typicité	Incompa.	Test sur proba	Test sur typicité	BUG : pb si dans le cla		
1																		
2																		
3	1	Enterobacter intermedius									0,124	0,00	0	mauvaise identif	mauvaise typicité	.		
4	2	Salmonella paratyphi A									0,119	0,00	0	mauvaise identif	mauvaise typicité	.		
5	3	Shigella sonnei									0,119	0,00	0	mauvaise identif	mauvaise typicité	.		
6	4	Butiauxella agrestis									0,106	0,03	0	mauvaise identif	mauvaise typicité	.		
7	5	Citrobacter freundii 90									0,095	0,04	0	mauvaise identif	mauvaise typicité	.		
8																		
9	API 10 E	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	classement	P(taxon/ profil)	P(taxon/ profil)	P(plus typique)	T	taxons	
10	profil	?	-	-	+	?	-	-	?	-	-					####		
11	Butiauxella agrestis	100	0	3	85	66	0	0	0	0	0	4	#####	#####	#####	0,03	0	Butiauxella agrestis

**Photo 4 :** Interface du Classeur Excel d'identification bactérienne

### 2-2 Acquisition des séquences 16S via GenBank

Les séquences ont été téléchargées à partir de la base de données GenBank du portail informatique NCBI. La procédure de téléchargement des séquences pour *Salmonella sp.* (la S1 pour notre cas) est la suivante :

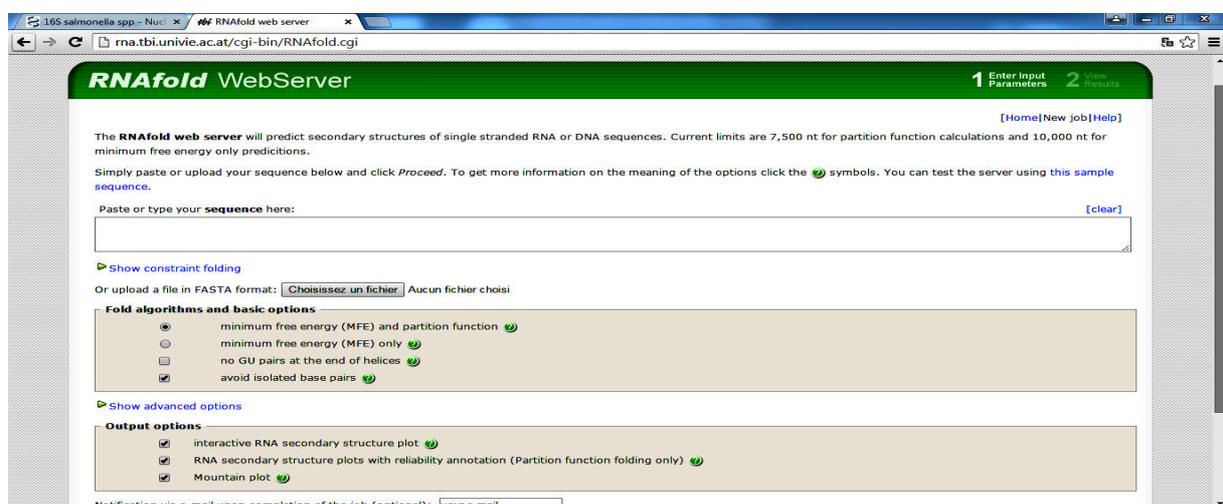
1. Télécharger la page web du portail NCBI (National Centre for Biotechnology Information),
2. Sélectionner dans le menu "All Databases" la banque "Nucleotide",
3. Taper dans la zone de texte les mots clés pour la recherche des séquences : "*16S rRNA AND Salmonella sp*". Cliquer sur le boutons "Search". GenBank va proposer plusieurs séquences 16S de *Salmonella sp*. Choisir celle dont la séquence est complète (aux environs de 1400 pb)
4. Télécharger la séquence au format Fasta (photo 5)
5. Répéter l'opération (étapes 1 à 4) pour les autres isolats.



**Photo 5 :** Interface de la base de données Nucleotide de NCBI montrant les résultats des séquences 16S

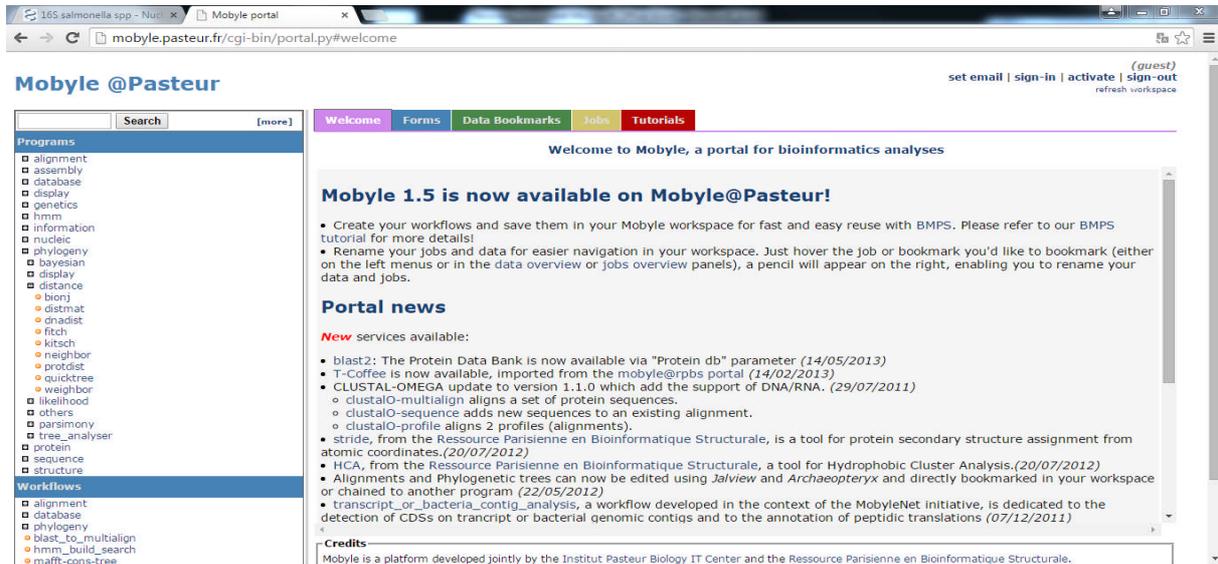
### 2-3 Analyse thermodynamique de la structure secondaire des ARNr 16S

La structure secondaire de l'ARNr 16S et l'énergie libre ont été prédites par logiciel *RNAFold* dont l'interface est représentée sur la photo 6.



**Photo 6 :** Interface du site Internet de RNA Fold web server

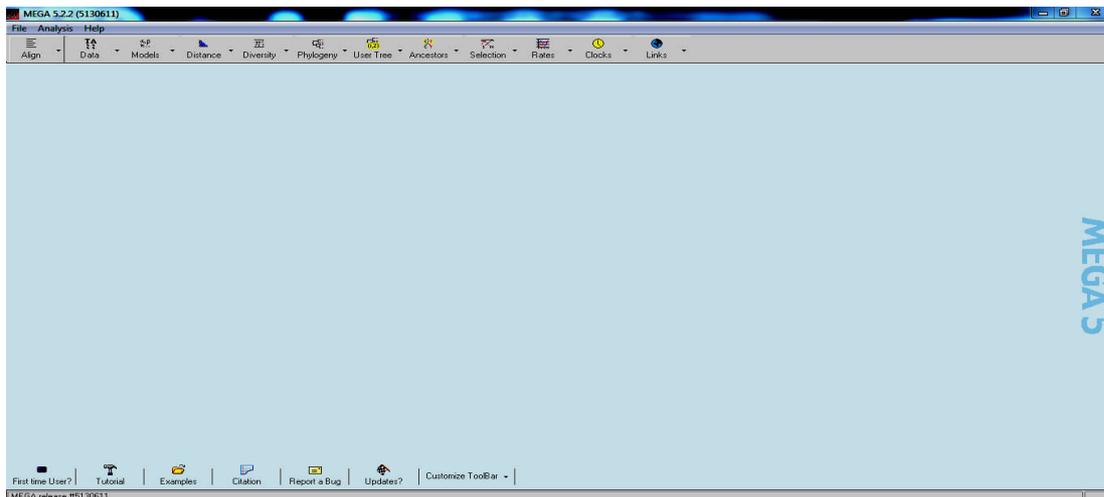
- Matrice thermodynamique des différences des énergies libres : a été calculée sur le portail Mobylye (Photo 7).



**Photo 7 :** Interface principale du Portail Mobylye

## 2-4 Analyse phylogénétique des isolats

Le phylogramme des cinq souches a été construit par la méthode des distances Neighbor Joining en utilisant le logiciel Mega 5.2 (Photo 8).



**Photo 8 :** Interface de Mega 5.2

## 1- Analyse microbiologique du sol

### 1-1 Caractérisation présomptive des isolats bactériens

Les résultats de l'analyse des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques sont portés sur le tableau 2. Ces derniers ont permis une identification présomptive de cinq isolats (S1, S2, S3, S4 et S5).

#### 1-1-1 Aspects macro et microscopique

Ces aspects diffèrent d'un isolat à un autre. En effet, les colonies des isolats S1, S2, S3 et S5 ont une forme circulaire avec un contour régulier, convexe, une couleur beige translucide et une surface lisse. Quant l'isolat S4, nous avons relevé une forme circulaire avec un contour irrégulier, plate, une couleur blanchâtre opaque et une surface sèche (tableau 3).

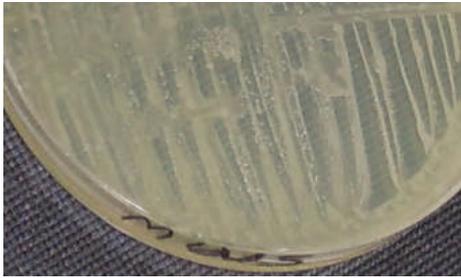
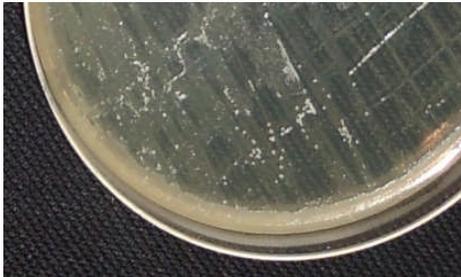
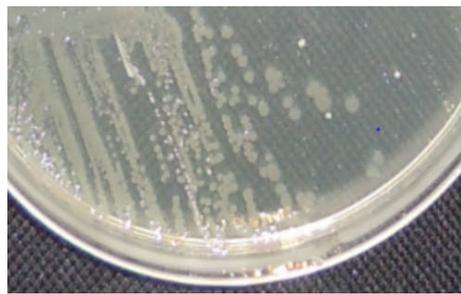
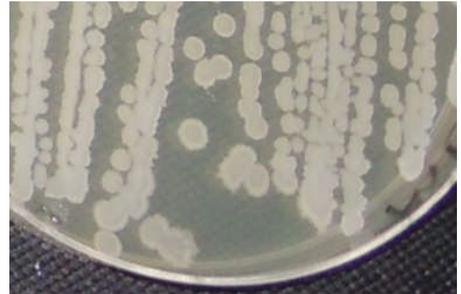
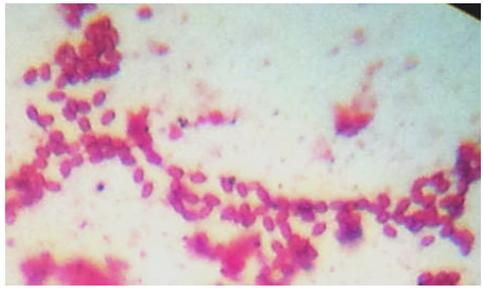
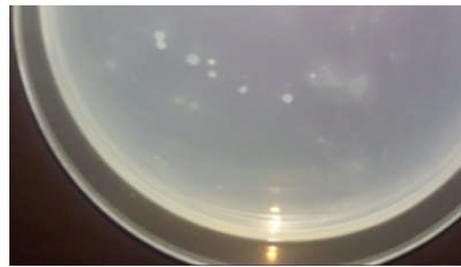
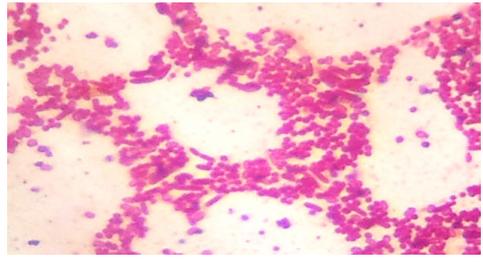
La coloration de Gram est négative pour tous les isolats. Cependant, ceux-ci possédant des formes cellulaires différentes : bacille (S3 et S5), streptobacille (S2) et cocobacille (S1 et S4) (tableau 3).

**Tableau 2** : Résultats des caractères phénotypiques des cinq isolats

		Isolats	S1	S2	S3	S4	S5
		Tests					
Morphologiques	forme des colonies	Circulaire Contour régulier Convexe	Circulaire Contour régulier Convexe	Circulaire Contour régulier Convexe	Circulaire Contour régulier Convexe	Circulaire Contour irrégulier Plate	Circulaire Contour régulier Convexe
	Couleur des colonies	Beige Translucide	Beige Translucide	Beige Translucide	Beige Translucide	Blanchâtre Opaque	Beige Translucide
	Surface des colonies	Lisse Brillante	Lisse Brillante	Lisse Brillante	Lisse Brillante	Sèche	Lisse Brillante
	Forme cellulaire	Coccobacille	Streptobacilles	Bacille	Coccobacille	Bacille	
	Gram	-	-	-	-	-	-
	Mobilité	-	+	+	+	+	+
Biochimiques	Mannitol	-	+	+	+	+	+
	Lactose	-	-	+	+	+	+
	Saccharose	+	+	+	+	+	+
	Gaz en Glucose	-	-	-	+	+	
	H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-
	LDC	+	+	-	+	-	
	ODC	+	-	-	+	+	
	ADH	+	+	+	-	-	
	VP	-	-	-	-	+	
RM	+	+	+	+	-		
Physiologiques	Indole	-	-	-	-	-	
	NR	+	+	+	+	+	
	Uréase	-	-	+	-	-	
	Catalase	+	+	-	+	+	
	Oxydase	+	-	-	-	-	

(+) : présence du caractère étudié ; (-) : absence du caractère étudié

**Tableau 3 :** Aspects macro et microscopique des isolats

	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
S1		
S2		
S3		
S4		
S5		

## 1-1-2 Les caractères biochimiques

### - Milieu Mannitol-Mobilité

Tous les isolats, mis à part S1, ont fermenté le mannitol en l'utilisant comme source de carbone, ce qui explique le virage de la couleur de l'indicateur de pH du milieu du rouge au jaune-orangé (photo 9).

La mobilité se traduit par une diffusion du voile ou du trouble au-delà de la piqûre centrale de l'ensemencement. Seul l'isolat S1 est immobile.



**Photo 9** : Exemple de l'aspect du milieu Mannitol-Mobilité de l'isolat S4

### - Milieu TSI

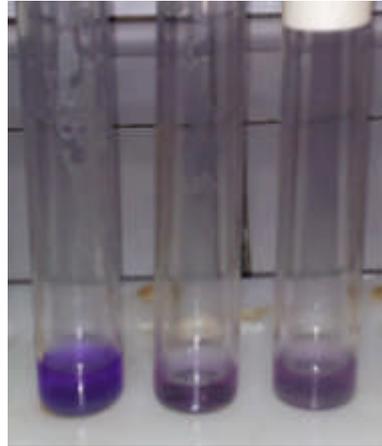
Les trois isolats S3, S4 et S5 ont fermenté les deux sucres (lactose et saccharose) contrairement à S1 et S2. Aucun résultat positif dans le cas de la production de l' $H_2S$  n'a été observé. En revanche, la production de gaz en glucose est observée chez la S4 et la S5 par la présence de bulles d'air (photo 10).



**Photo 10** : Résultat obtenu de la culture de S5 sur milieu TSI

### - Production de LDC, ODC et ADH

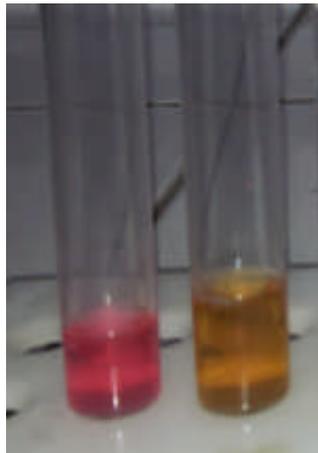
L'isolat S1 présente un résultat positif pour chacune des trois enzymes testés (photo 11) se traduisant par une ré-alcalinisation du milieu (milieu violacé). Les autres isolats ont exprimé des résultats différents d'un acide aminé à l'autre.



**Photo 11** : Présence des LDC, ODC et ADH chez l'isolat S1

### - Test VP/RM

Les quatre isolats S1, S2, S3 et S4 ont montré des résultats similaires par obtention d'une coloration rose pour un RM positif et une absence de coloration pour un VP négatif (photo 12). L'isolat S5 est RM négatif et VP positif (photo 13).



**Photo 12** : RM<sup>+</sup> et VP<sup>-</sup> chez l'isolat S1



**Photo 13** : RM<sup>-</sup> et VP<sup>+</sup> chez l'isolat S5

### 1-1-3 Les caractères physiologiques

- La nitrate réductase : Les cinq isolats ont montré un test positif.



**Photo 14** : Présence de la nitrate réductase chez l'isolat S2

- Milieu Urée-Indole

Tous les isolats sont uréase négative sauf S3. Mais le test de l'indole a montré que toutes les souches sont négatives.



**Photo 15** : Présence de l'uréase chez S3



**Photo 16** : Absence de l'indole chez S3

- Production de la catalase : Seul, l'isolat S3 est catalase négative.
- Production de l'oxydase : Seul l'isolat S1 a donné un résultat positif (photo 17).



**Photo 17** : Réaction positive au test de l'oxydase chez S1

## 2- Analyse bioinformatique des séquences 16S des isolats

### 2-1 Identification et classification des isolats

Les isolats identifiés par le classeur probabiliste Excel d'identification (classification tableau 4) sont :

S1 : *Salmonella sp*

S2 : *Chromobacterium violaceum*

S3 : *Pseudomonas fluorescens*

S4 : *Enterobacter aerogenes*

S5 : *Enterobacter intermedium*

**Tableau 4 :** Classification des souches identifiées

Domaine	<i>Bacteria</i>				
Phylum	<i>Proteobacteria</i>				
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Neisseriales</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Salmonella</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>
Espèce	<i>Salmonella sp</i>	<i>C. violaceum</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. intermedius</i>
Isolat	S1	S2	S3	S4	S5

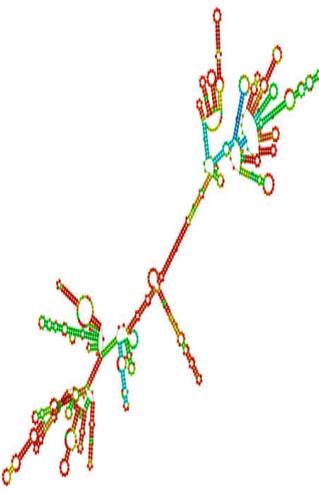
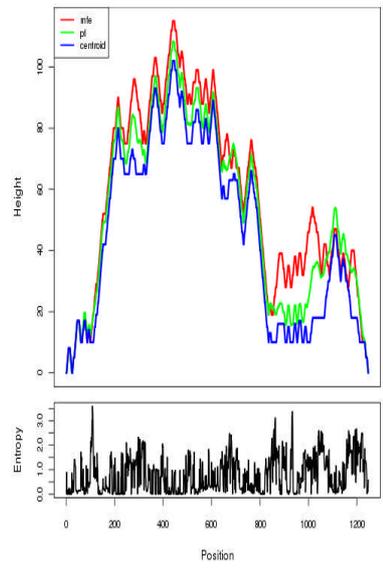
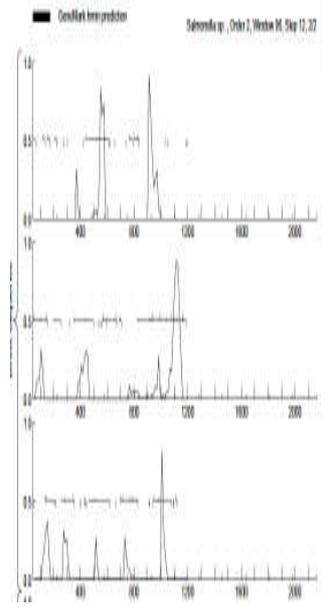
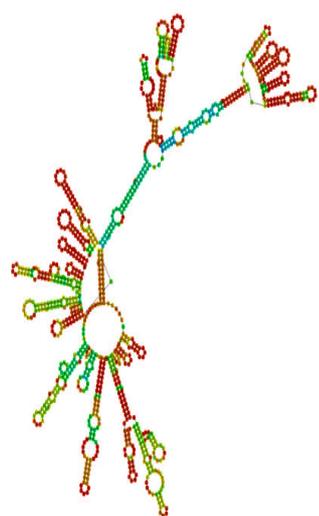
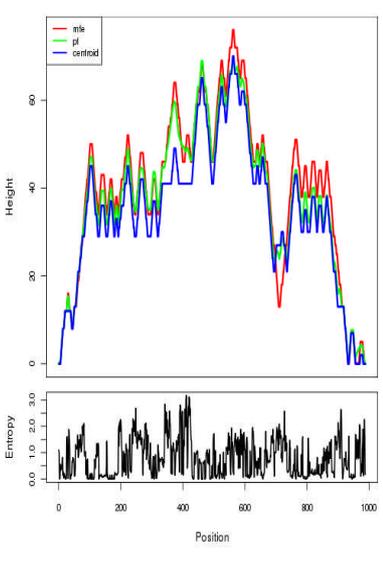
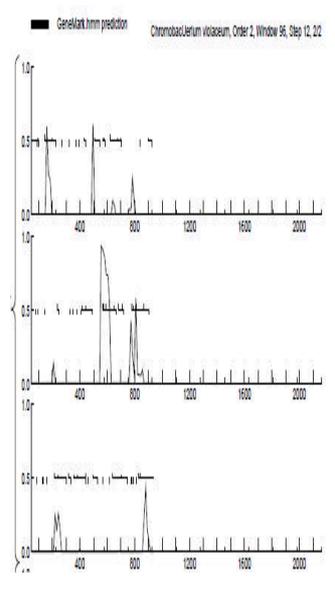
## 2-2 Prédiction structurale secondaire et énergie libre des ARNr 16S

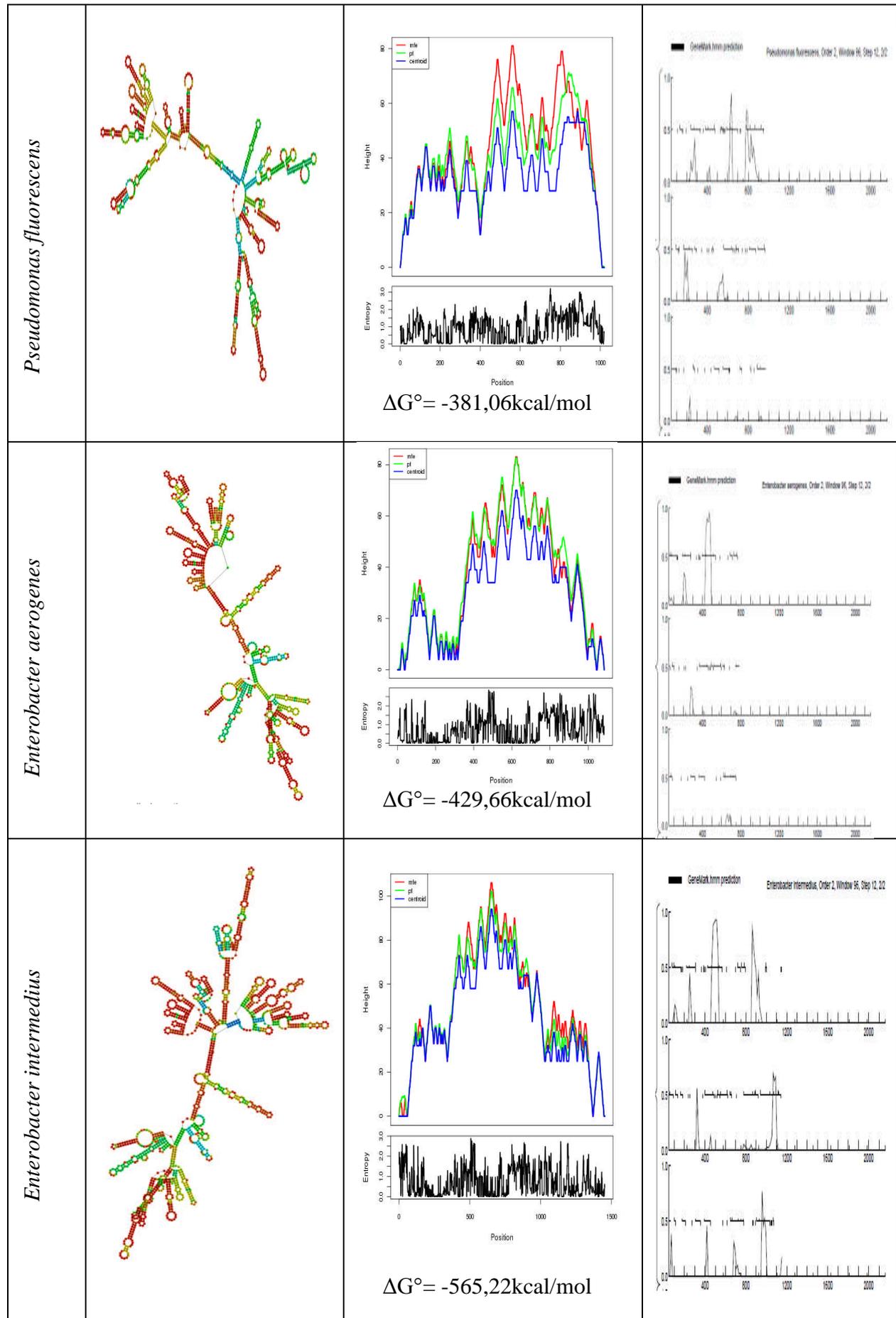
Après récupération des séquences d'ARNr 16S au format Fasta, sur le portail du NCBI, la structure secondaire des ARNr 16S ainsi que les énergies libres ont été prédites. Les résultats sont portés sur le tableau 5.

Il ressort que l'architecture 2D des molécules 16S diffère chez les cinq isolats ; cependant, il est à noter que les isolats S4 (*E. aerogenes*) et S5 (*E. intermedius*) ont montré des topologies similaires du fait de leur appartenance au même genre. L'isolat S1 (*Salmonella sp.*), une *Enterobacteriaceae*, présente un profil largement similaire à celui de S4 et S5. L'isolat S2 (*Chromobacterium violaceum*) a exprimé une différence nette dans l'architecture 2D par rapport à l'ensemble des isolats. *Pseudomonas fluorescens* (*Gammaproteobacteria*) présente un profil 2D plus proche de S1, S4 et S5 que S2 (*Betaproteobacteria*).

Ces résultats 2D sont corroborés par les diagrammes des énergies libres standards ( $\Delta G^\circ$  : Kcal/mol). En effet, les mesures des différentes  $\Delta G^\circ$  ont révélées des valeurs plus proches pour S4 et S5 (-429,66Kcal/mol et -565,22Kcal/mol respectivement). Par contre, la S3 a exprimé une énergie libre significativement différente (-381,06Kcal/mol).

**Tableau 5 :** Structures secondaires d'ARNr 16S et l'énergie libre des souches identifiées

	Structure secondaire de l'ARNr 16S	Energie libre	
<i>Salmonella spp</i>		 <p><math>\Delta G^\circ = -491,43 \text{kcal/mol}</math></p>	 <p>ConsMap prediction Salmonella spp, Order 2, Window 90, Step 12, 27</p>
<i>Chromobacterium violaceum</i>		 <p><math>\Delta G^\circ = -376,97 \text{kcal/mol}</math></p>	 <p>ConsMap prediction Chromobacterium violaceum, Order 2, Window 96, Step 12, 22</p>



Les différences des énergies libres entre les paires de séquences des rRNA 16S (tableau 6) ont montré des écarts d'énergie significatifs expliqués par la divergence de leurs structures primaires.

**Tableau 6 :** Matrice des thermodynamiques des séquences rRNA 16S

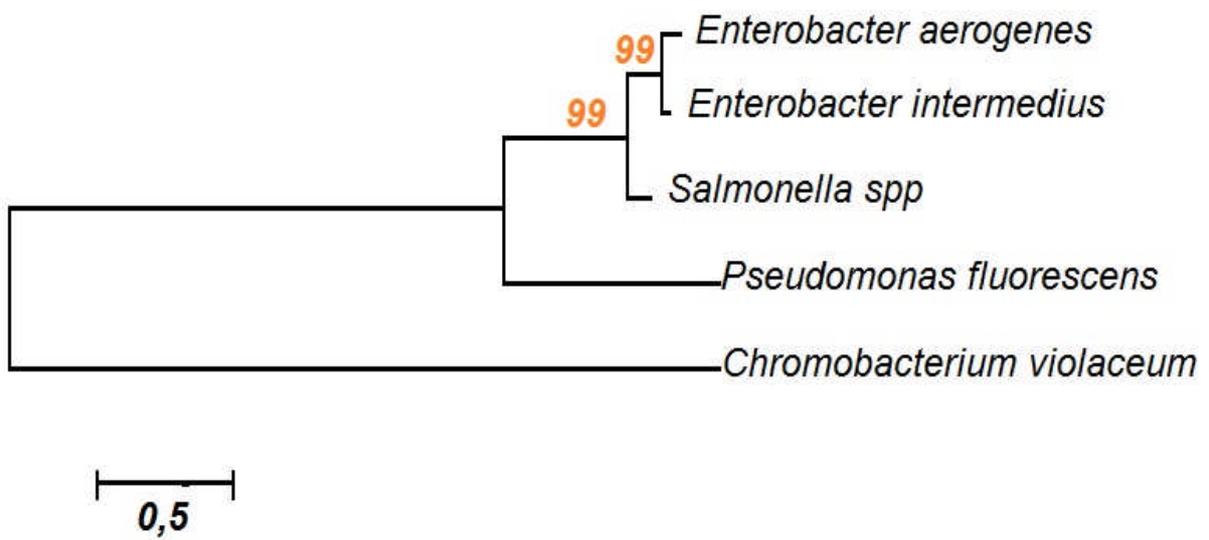
	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	597 ,089			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	620,812	481,675		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	462,967	448,901	385,523	
<i>Enterobacter intermedius</i>	242,246	555,395	561,251	418,63

### 2-3 Analyse phylogénétique des isolats

Le phylogramme (figure 5) a été réalisé à l'aide de la matrice de distance (tableau 7) obtenue suite à l'alignement multiple des séquences d'ARNr 16S des cinq isolats sur le logiciel Mega 5.2.

**Tableau 7 :** Matrice des distances (%) après alignement multiple des séquences 16S rRNA

	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	0,494			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,132	0,519		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0 ,030	0,508	0,143	
<i>Enterobacter intermedius</i>	0,025	0,498	0,142	0,009



**Figure 5 :** Phylogramme des cinq souches réalisé par la méthode NJ

## DISCUSSION GENERALE

Les cinq souches isolées durant notre travail, ont été identifiées sur la base de leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Ces tests ne sont pas suffisants pour prétendre une identification définitive et formelle (Holt *et al.*, 1994 ; Prescott *et al.*, 2003 ; Joffin *et al.*, 2006). Certains caractères, tels que la production ou non d'indole ont été corroborés par des études de plusieurs auteurs (Alves *et al.*, 2006 ; Zarei *et al.*, 2010 ; Nkang *et al.*, 2009). Le caractère de l'uréase de nos isolats est confirmé par les travaux de Dhayanithi *et al.*, (2010) ; Xian *et al.*, (2011). Cependant, les résultats négatifs sont supporté par ceux de Keri *et al.*, (2002) ; Prischmann *et al.*, (2008).

Les résultats obtenus pour le test d'utilisation du mannitol sont en parfait accord avec ceux décrits par Phibbs *et al.*, 1978. Concernant *Salmonella sp* (S1), un résultat négatif (isolat S1) a été observé, comme signalé par Matsen *et al.*, 1972 ; Nkang *et al.*, 2009 qui ont travaillé sur des salmonelles.

Le test de mobilité pour les souches S2, S3, S4, S5 est positif. Ces résultats sont corroborés par les études de Dhayanithi *et al.*, 2010 ; Zarei *et al.*, (2010) ; Catherine *et al.*, (1999). Nous avons obtenu un résultat négatif avec la souche S1 comme celui rapporté par Alves *et al.*, (2006).

Les isolats S2, S3, S4, S5 sont tous oxydases négatives comme exprimés dans les travaux de Le Minor *et al.*, (1989) ; Dhayanithi *et al.*, (2010) qui ont testé les mêmes souches.

Toutes les souches, excepté S3, ont présenté un caractère positif de la catalase comme indiqué dans les travaux de Khan *et al.*, (2011). Par contre l'espèce *Pseudomonas fluorescens* (S3) donne une réponse négative au test identiquement au signalement de Dhayanithi *et al.*, (2010).

Les résultats du métabolisme des acides aminés sont confirmés par ceux de Matsen *et al.*, (1972), Le Minor *et al.*, (1989), Prischmann *et al.*, (2008), Zarei *et al.*, (2010).

### - Analyse bioinformatique

La prédiction des structures secondaires 2D des ARNr 16S d'une part, et le calcul de l'énergie libre de ces structures prédites pour nos cinq isolats, montre que *Salmonella sp*, *E. aerogenes* et *E. intermedius* sont proches voire apparentées par rapport à *P. fluorescens* et *C. violaceum*. Nous notons à ce stade une très forte similarité 2D entre les deux isolats du genre *Enterobacter* (S4 et S5). Ces observations sont expliquées par les similitudes et les divergences présentes entre les différentes structures secondaires des ARNr 16S et les courbes d'énergie libre de nos cinq isolats.

En effet, les profils énergétiques des cinq isolats ont fait ressortir des niveaux d'énergie libre avec des pics différents ; ce qui explique la différence dans la structure primaire entre les différents isolats.

La topologie de l'arbre phylogénique a révélé trois familles différentes : *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* et *Neisseriaceae*. Le clade regroupant *E. aerogenes* et *E. intermedius* est plus apparenté à *Salmonella sp.* (car *Enterobacteriaceae*) et à un degré moindre de *P. fluorescens* (*Gammaproteobacteria*). L'individu *C. violaceum* est le groupe le plus éloigné génétiquement ; il peut être considéré comme un out group (*Betaproteobacteria*).

## CONCLUSION

Le microbiote tellurique est une communauté complexe par ses exigences nutritionnelles et par ses interactions intra et interspécifiques.

Son identification reste sujette à discussion au sein du monde microbiologiste. Les chercheurs proposent diverses techniques d'identification du fait de l'avancement technologique et de la disponibilité de l'information via Internet.

Notre travail constitue une approche nouvelle adoptée par plusieurs laboratoires de microbiologie, qui repose sur le principe de l'identification polyphasique. En effet, deux phases d'identification ont été proposées dans ce travail : Phénotypique et Bioinformatique.

Les résultats obtenus pour les deux phases sont en parfait accord et se complètent entre eux. La caractérisation phénotypique a révélé des taxons appartenant à trois familles différentes : *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* et *Neisseriaceae*. Les profils 2D des ARNr 16S et le calcul des énergies libres ont confirmé cette classification en offrant des profils et des topologies des diagrammes énergétiques différents.

En fin, nous considérons que notre approche phéno-bioinformatique est justifiée mais doit être vérifiée sur des effectifs d'isolats plus importants que le nôtre et doit être supportée par d'autres analyses bioinformatiques plus approfondies telles que la prédiction des structures 3D des séquences 16S, l'application des techniques biomoléculaire de type spectrométrie de masse afin d'enrichir la procédure d'identification bactérienne.

## Références Bibliographiques

- Alves M.S., Rubens C.S.D., De Castro A.C.D., Riley L.W., Moreira B.M. (2006). Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. *J. clinic. microbiol.* **44** (10) : 3640-3646.
- Bastide A., De Meo M., Andriantsoa M., Laget M., Duménil G. (1986). *Isolement et sélection de souches d'actinomycète productrice des substances antifongiques de structure non-polyénique.* *Mircen.J.* **2** : 453-466.
- Bouvet PJM, Grimont PAD. *Int J Syst Bacteriol* (1986);**36**:228-40.
- Catherine A.M., Robert B. (1999). Genomic rearrangements in the flagellin genes of *Proteus mirabilis*. *Mol. Microbiol.* **31** (2) : 679–690.
- Dhayanithi N.B., Ajith Kumar T.T., Kathiresan K. (2010). Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. *J. Environ Biol.* **31** : 409-412.
- Eden P.A., Schmidt T.M., Blakemore R.P., Pace N.R. (1991). Phylogenetic Analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* Using Polymerase Chain Reaction-Amplified 16S rRNA-Specific DNA. *Int J Syst Bacteriol.* **41** (2): 324–325.
- Garcia-Martínez, J., Acinas, S. G., Antón, A. I. et Rodriguez-Valera, F. (1999). Use of the 16S 23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Methods* **36**: 55-64.
- Gürtler, V. et Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol.*, **142**: 3-16.
- Hillis DM, Dixon MT (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, **66**, 410–453.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., et al. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology.* Williams & Wilkins. Baltimore. 787 p.
- Innis, M.A., and Gelfand, D.H. (1994). Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (Eds.) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications.* London: CRC Press, pp. 5–11.

- Jiang, H.; Dong, H.; Zhang, G.; Yu, B.; Chapman, L. R.; Fields, M. W. (2006). Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (6): 3832–3845.
- Joffin J.N., Leyrol G. (2006). Microbiologie technique. Tome1. *Dictionnaire des techniques*. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. 363 p.
- Keri L.B., Amy E.W., John R.W., Sookie S.B. (2002). Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *J. Biotechnol.* **93** (2) : 171-181.
- Kolbert, C. P. et Persing, D. H. (1999). Ribosomal DNA sequencing as tool for identification of bacterial pathogens. *Microbiol.* **2**: 299-305.
- Laguerre, G., M. R. Allard, F. Revoy, and N. Amarger. (1994). Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR- amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 56-63.
- LE Minor L., Veron N. (1989). *Bactériologie Médicale. Flam Med. Science.* pp : 773-823.
- Matsen J.M., Blazevic D.J., Ryan J.A., Ewing W.H. (1972). Characterization of Indole-Positive *Proteus mirabilis*. *Appl. Microbiol.* **23** (3) : 592-594.
- Ludwig, W. and Schleifer , K.H. (1999) Phylogeny of Bacteria. In: Evolution and Infection. (Göbel, U.B. and Ruf, B.R. eds.) Einhorn-Press Verlag, Reinbeck.
- Mears, A.M., Schabel, M.C., Wentz, F.J., Santer, B.D., and Govindasamy, B., (2002). Correcting the MSU middle tropospheric temperature for diurnal drifts. Proc. Int. Geophysics and Remote Sensing Symp., Vol 3, Toronto, ON, Canada, IEEE, pp. 1839-1841.
- Nkang A.O., Okonko O.I., Fowotade A., Udeze A.O., Ogunnusi T.A., Fajobi E.A., *et al.* (2009). Antibiotics susceptibility profiles of bacteria from clinical samples in Calabar, Nigeria. *J. Bacteriol. Res.* **1** (8) : 89-96.
- Normand, P.; Orso, S.; Cournoyer, B.; Jeannin, P.; Chapelon, C; Dawson, J.; Evtushenko, L.; Misra, A. K. (1996) : Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of family Frankiaceae. *International journal of systematic bacteriology* **46**: 1-9.
- Nour, S.M., Fernandez, M., Normand, P. and Cleyet-Marel, J.,C.(1994b) *Rhizobium Ciceri* sp.nov., consisting of strains that nodulates chickpeas ( *cicer arieninum* L.,) . *Internationnal J. of systematic Bacteriology* **44**, 511-522.

- Phibbs P., McCowen S., Feary T., Blevins W. (1978). Mannitol and Fructose Catabolic Pathways of *Pseudomonas aeruginosa* Carbohydrate-Negative Mutants and Pleiotropic Effects of Certain Enzyme Deficiencies. *J. Bacteriol.* **133** (2) : 717–728.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., *et al.* (2003). *Microbiologie*. 2ème édition. Boeck Université. 1099 p.
- Prischmann A.D., Lehman R.M., Christie A.A., Dashiell K.E. (2008). Characterization of bacteria isolated from maize roots: Emphasis on *Serratia* and infestation with corn rootworms (Chrysomelidae: Diabrotica). *Appl. soil ecol.* **40** : 417-431.
- Reginald, H. Garrett, Charles M. Grisham. (2000). *Biochimie*. De Boeck Supérieur. pp: 389-390.
- STAHL, D. A. & AMMAN, R. I. (1991). Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 205-248. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester : John Wiley.
- Thomas, M.G., Burkart, M.D and Walsh C.T, (2002). Conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP during undecyl prodigiosin and pyolouteorin biosynthesis. *Chemistry and biology*. Vol **9** : 171-184.
- Weidner S., Arnold W., Pühler A. (1996). Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Env Microbiol* **62** (3): 766–71.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173** (2): 697–703.
- Woese, C. R., G. E. Fox. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74** (11): 5088–5090.
- Xian G., Lixia Z., Ganzhen D., Chang L., Chengye L., Changwei Q., *et al.* (2011). Aerobes and Levels of Estradiol and Progesterone in Cystic Endometrial Hyperplasia-Pyometra Complex Bitches. *J. Animal Vet. Ad.* ; **10** (8) : 965-971.
- Zarei M., Aminzadeh S., Zolgharnein H., Safahieh A., Ghoroghi A., Daliri M., *et al.* (2010). *Serratia marcescens* B4A chitinase product optimization using Taguchi approach. *J. biotechnol.* **8** (4) : 252-262.

[http://echangetv.levantin.free.fr/Cours/Agronomie/cours\\_agro/D.Chapitre\\_2\\_Biologie\\_Sol.pdf](http://echangetv.levantin.free.fr/Cours/Agronomie/cours_agro/D.Chapitre_2_Biologie_Sol.pdf)

<http://www.inspection.gc.ca/vegetaux/engrais/exigences-reglementaires/classification-taxonomique/fra/1346524491267/1346527009874>

## ANNEXES

### **Annexe 1:** Séquence 16S de *Salmonella sp.*

>gb|AF130955.1| *Salmonella sp.* 16S ribosomal RNA 1091bp

GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACC  
AGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT  
ATTGCACAATGGGCGCAAGCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG  
GTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGA  
CGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG  
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGT  
CGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCGAAACTGGCAGGCTTGAG  
TCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGG  
AATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCG  
TGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTT  
GGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGG  
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT  
GGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCAC  
AGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTGTGAGACAGGTGCTGCATGGC  
TGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAT  
CCTTTGTTGCCAGCGRTTMGGYCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGA  
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGC  
TACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGT  
GCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA  
ATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC  
ACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTAC  
CACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGT

**Annexe 2** : Séquence 16s de *Chromobacterium violaceum*

>gb|EU880917.1| *Chromobacterium violaceum* strain UCP1470 16S ribosomal RNA gene 988bp

GAAAGCCGGATTAATACCGCATACGCCCTGAGGGGGAAAGCGGGGGATCGAAAGACC  
TCGCGTTATACGAGCAGCCGACGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGAGCTCACCA  
AGGCGACGATCAGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACAC  
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTG  
ATCCAGCCATGCCGCGTGTCTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGGACTTTTGT CAGG  
GAGGAAATCCCGCTGGTTAATACCCGGCGGGGATGACAGTACCTGAAGAATAAGCACC  
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATT  
ACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTGTGCAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGGCTT  
AACCTGGGAACGGCATTGGGAGACTGCACAGCTAGAGTGCGTCAGAGTGGGGGAGTAC  
GGCCGCAAGGTTAAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGAT  
GTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTGCTCTTGACATGTACGGA ACTTG  
CCAGAGATGGCTTGGTGCCCGAAAGGGAGCCGTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT  
CAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAG  
TTGCCATCATT CAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT  
GGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGAGCAGGGCTTCACACGTCATACAATG  
GTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCAGAAAACCGATCGTA  
GTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGA  
TCAT

**Annexe3:** Séquence 16S de *Pseudomonas fluorescens*

>gb|KM198476.1| *Pseudomonas fluorescens* strain MP03 16S ribosomal RNA gene, 1020 bp

GCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGGAACGCTAATACCGCGTACGTCCTACGG  
GAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCT  
AGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGAT  
CAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA  
TATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC  
GGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCGTTTGGCTAATATCCAGGCGTTTT  
GACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGA  
AGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAA  
GTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAG  
AGTACGGTAGAGGGTGGTGGCATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAA  
GGAACACCAGTGGCGAAAGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAG  
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACT  
AGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGG  
GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAGAACTCACATGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGC  
GGTGGGAGCATGTGGTTTAATTTTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACA  
TGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAGCTCAGAACACAGGTGCTG  
CATGGCTGTCGTCAGCTCCTGTCGTTGAGATGCTGGGTAAAGTCCCCTAACGAAGCGC  
AACCTTCGTCCTTACTTACCAGCAACGTTATGGT

**Annexe 4:** Séquence 16S de *Enterobacter aerogenes*

>gb|KP896306.1| *Enterobacter aerogenes* strain BGMCC01 16S ribosomal RNA gene, 1084bp

TAACACAGAGAGCTTGCCCTCGGGTGACGAGCGGCAGACGGGTGAGTAATGTCTGGGA  
CACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCG  
CAAGACCAAATGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATT  
AGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA  
TGACCAGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG  
GGAATATTGCACAATAGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGC  
CTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCGTTAAGGTTAATAACCTTGGC  
GATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  
ACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTG  
TCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGG  
CTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC  
TGGAGGAATAACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCG  
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTC  
GACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCG  
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA  
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACAT  
CCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCA  
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  
TTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGTCGGGAACTCAAAGGA

**Annexe 5** : Séquence 16S de *Enterobacter intermedius*

>gb|AF310217.1| *Enterobacter intermedius* 16S ribosomal RNA gene, 1453 bp

CGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTTGGGTGAC  
GAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTAC  
TGGAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGC  
CTCACACCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACC  
TAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACAC  
GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG  
ATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAG  
GAGGAAGGCATTGTGGTTAATAACCGCAGTGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACC  
GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT  
ACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTC  
AACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATT  
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGC  
CCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
TACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG  
GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA  
CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGC  
AACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGTCTAGCAGAGATGCTTTGGT  
GCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATG  
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGG  
GAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC  
ATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAG  
CGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTG  
CAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGA  
ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAG  
AAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGAAATTCATGACTGTGAA  
ATGT

**Annexe 6 :** Structure secondaire 2D 16S de *Salmonella sp.*



Sequence display options

- Plain Sequence
- No Sequence

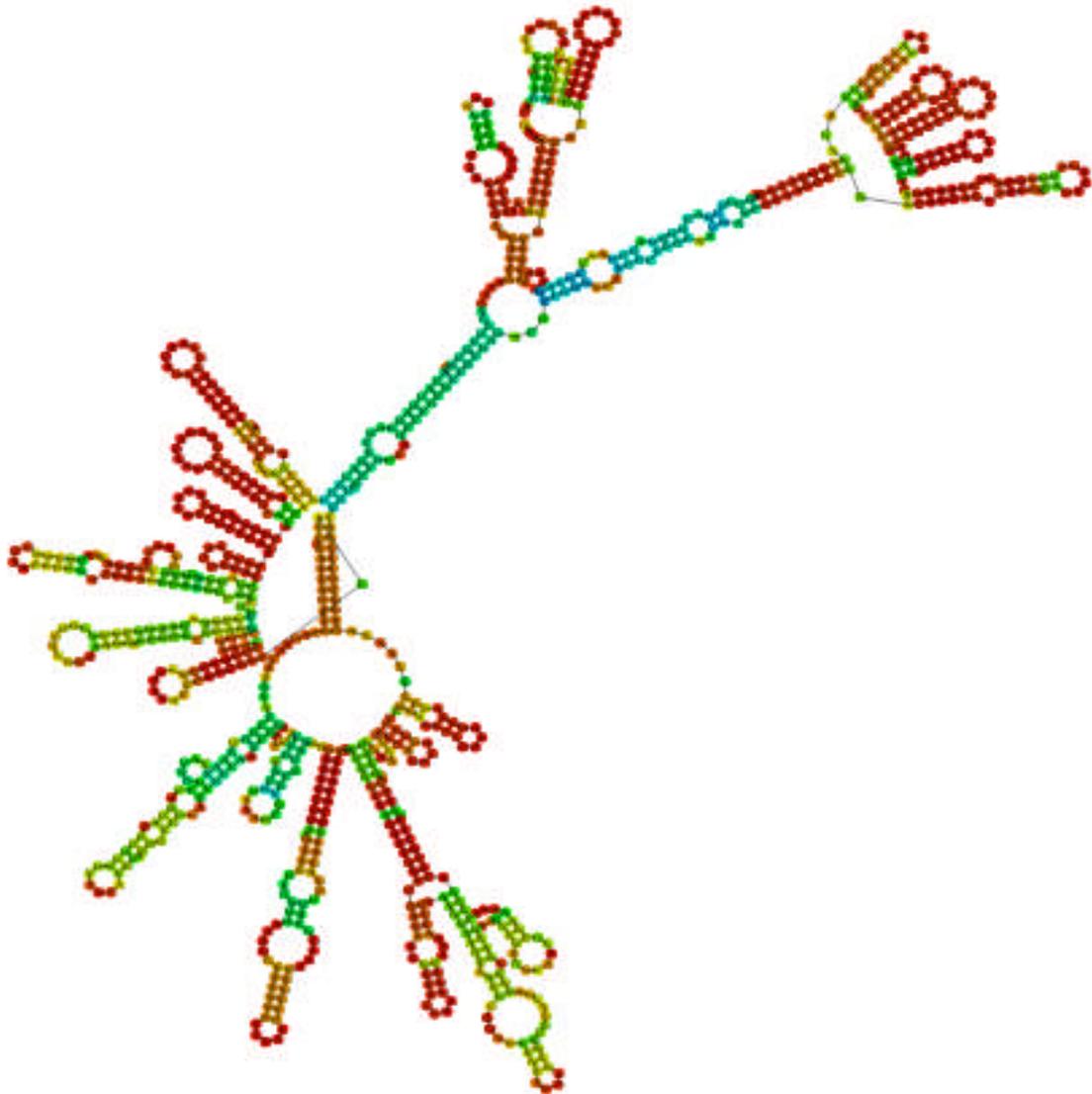
Other display options

- Base-pair probabilities
- Positional entropy
- None

MFE secondary structure



**Annexe 7:** Structure secondaire 2D 16S *Chromobacterium violaceum*



Sequence display options

- Plain Sequence
- No Sequence

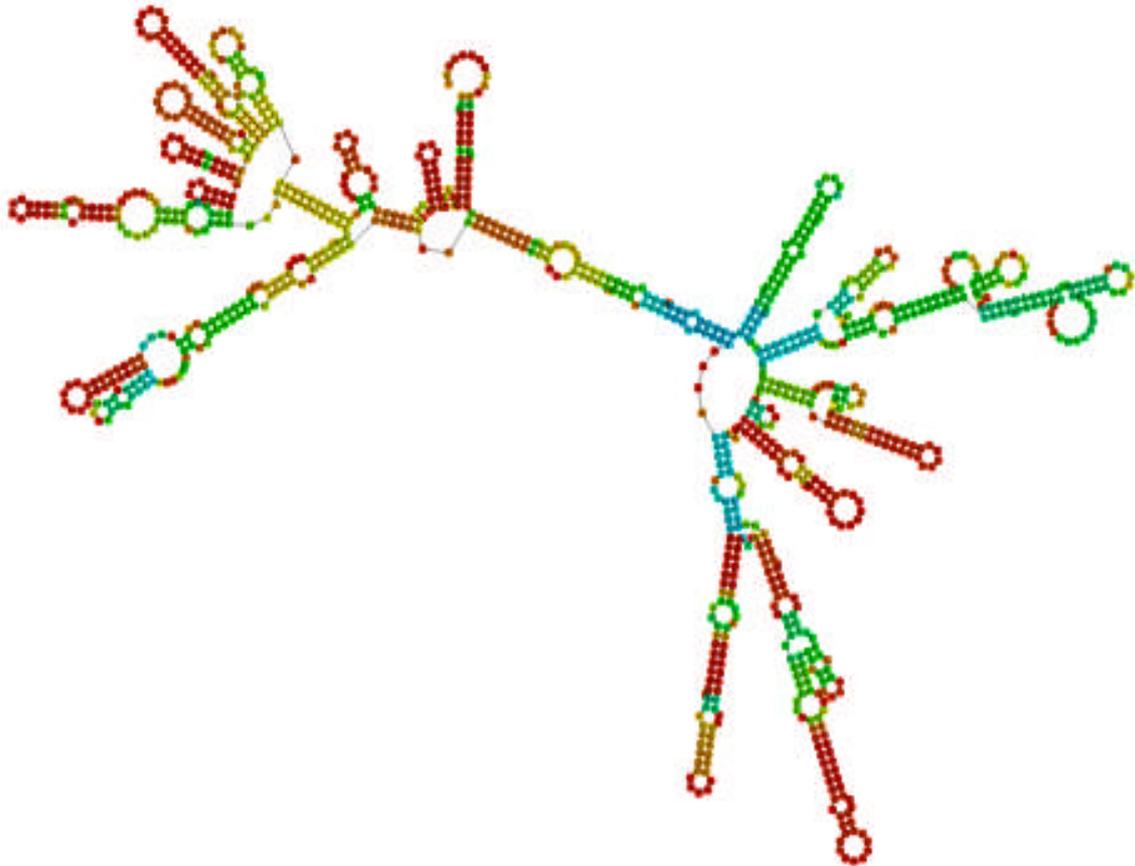
MFE secondary structure

Other display options

- Base-pair probabilities
- Positional entropy
- None



**Annexe 8 :** Structure secondaire 2D 16S de *Pseudomonas fluorescens*



**Sequence display options**

- Plain Sequence
- No Sequence

**Other display options**

- Base-pair probabilities
- Positional entropy
- None

**MFE secondary structure**



**Annexe 9 :** Structure secondaire 2D 16S *Enterobacter aerogenes*



**MFE secondary structure**

**Sequence display options**

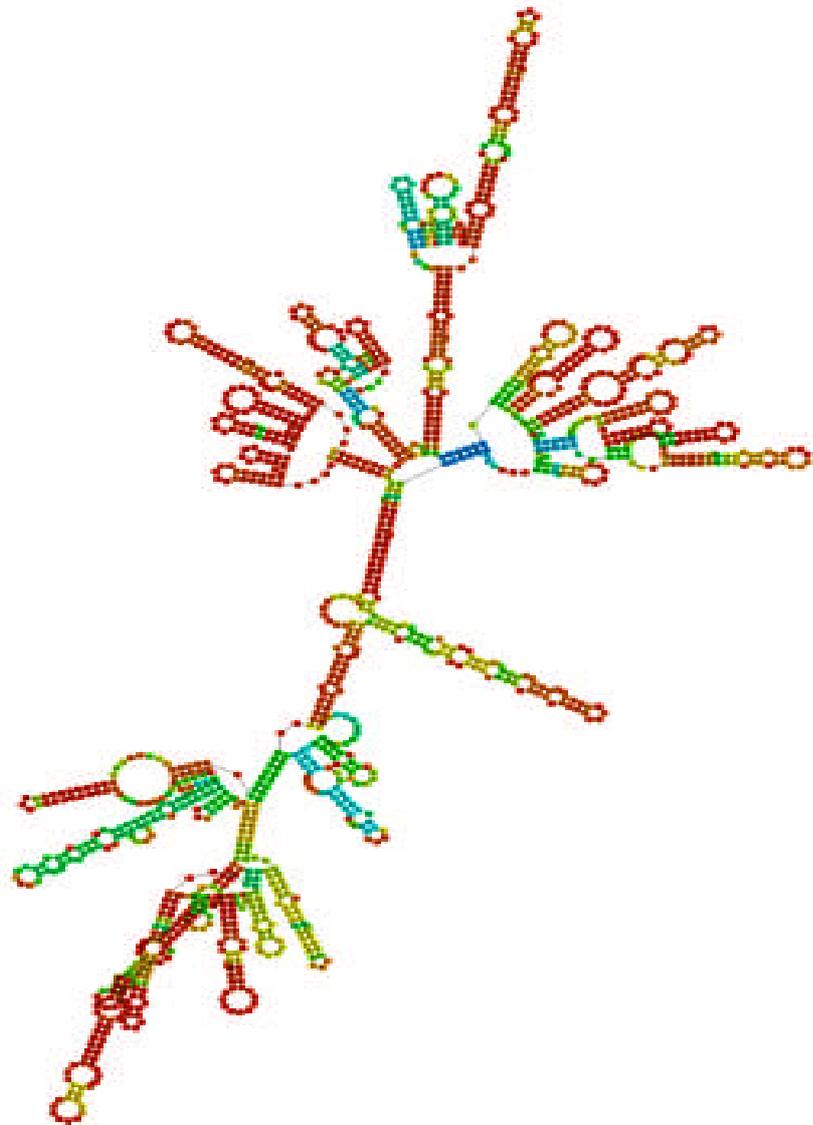
- Plain Sequence
- No Sequence

**Other display options**

- Base-pair probabilities
- Positional entropy
- None



**Annexe 10 :** Structure secondaire 2D 16S *Enterobacter intermedius*



**Sequence display options**

- Plain Sequence
- No Sequence

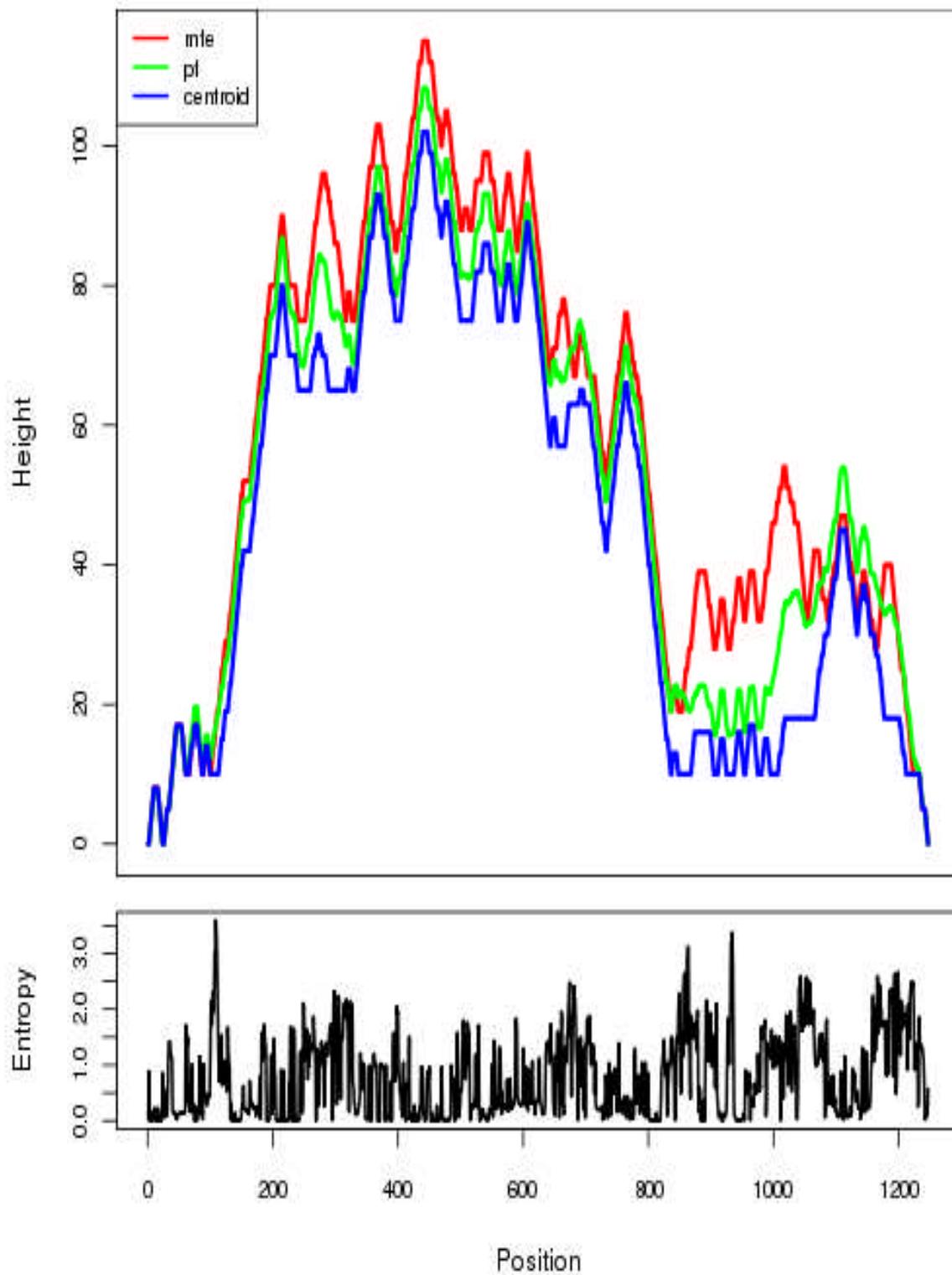
**MFE secondary structure**

**Other display options**

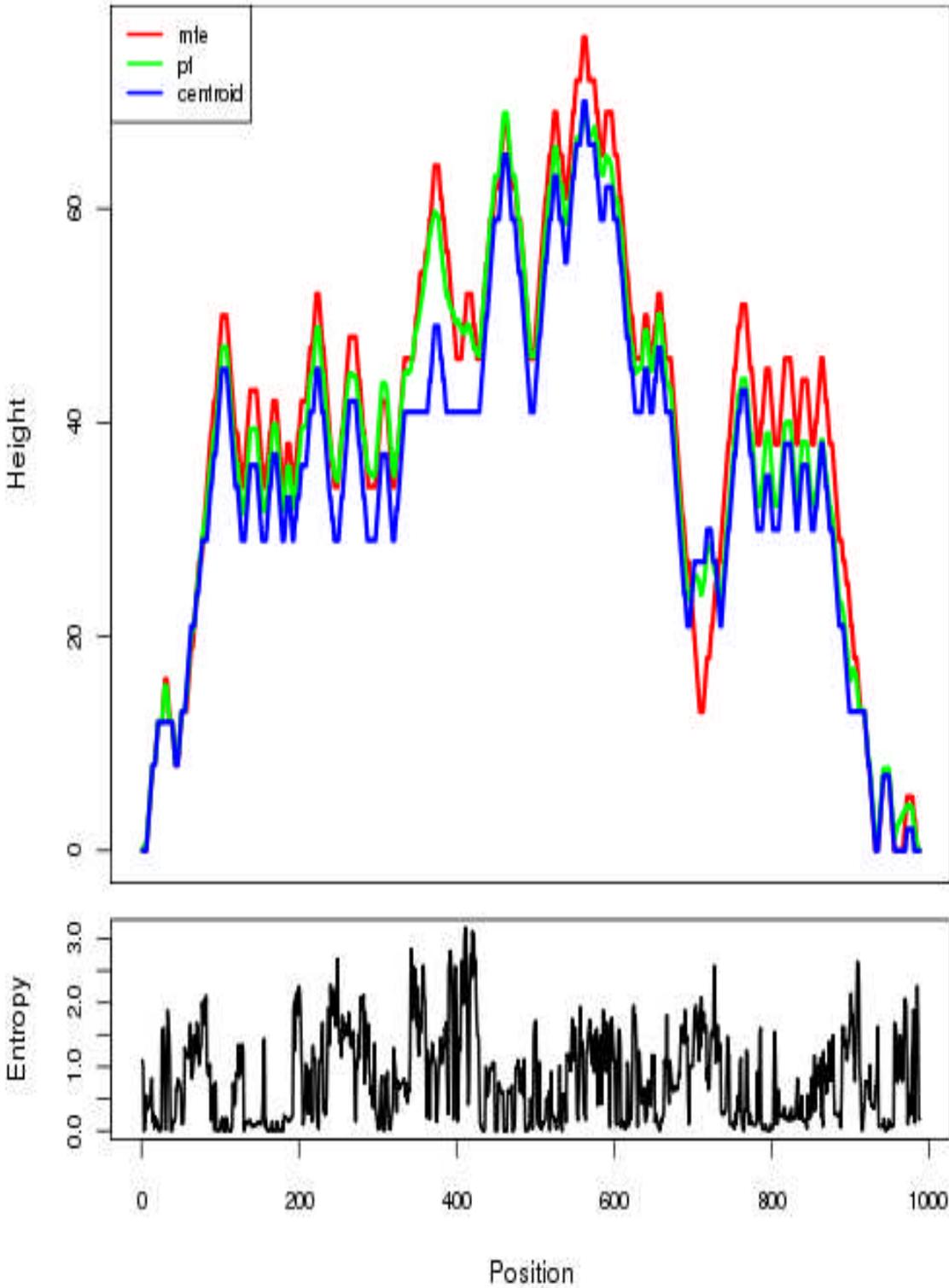
- Base-pair probabilities
- Positional entropy
- None



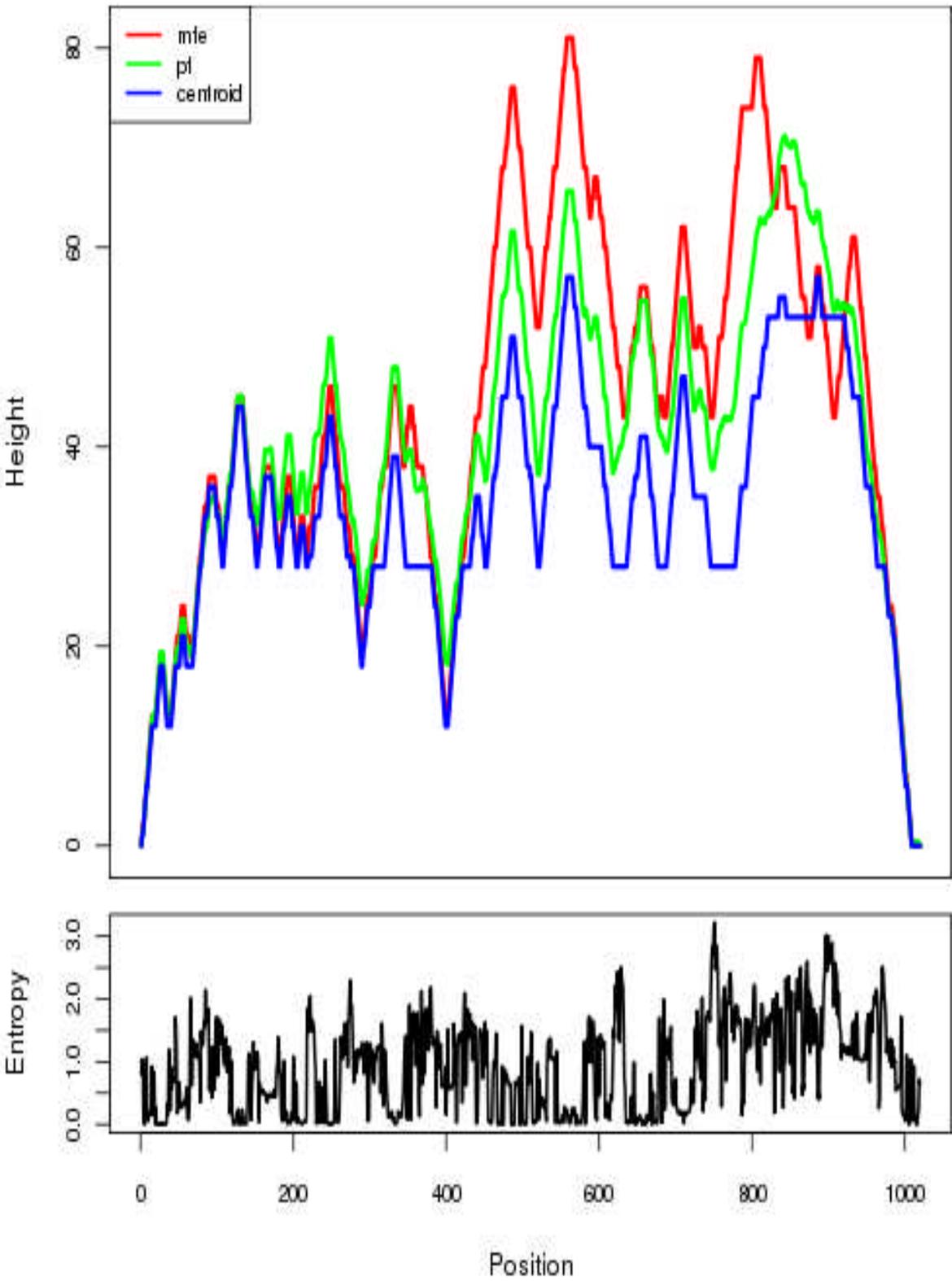
**Annexe 11 :** Diagramme de l'énergie libre de *Salmonella sp.* prédit par RNAfold



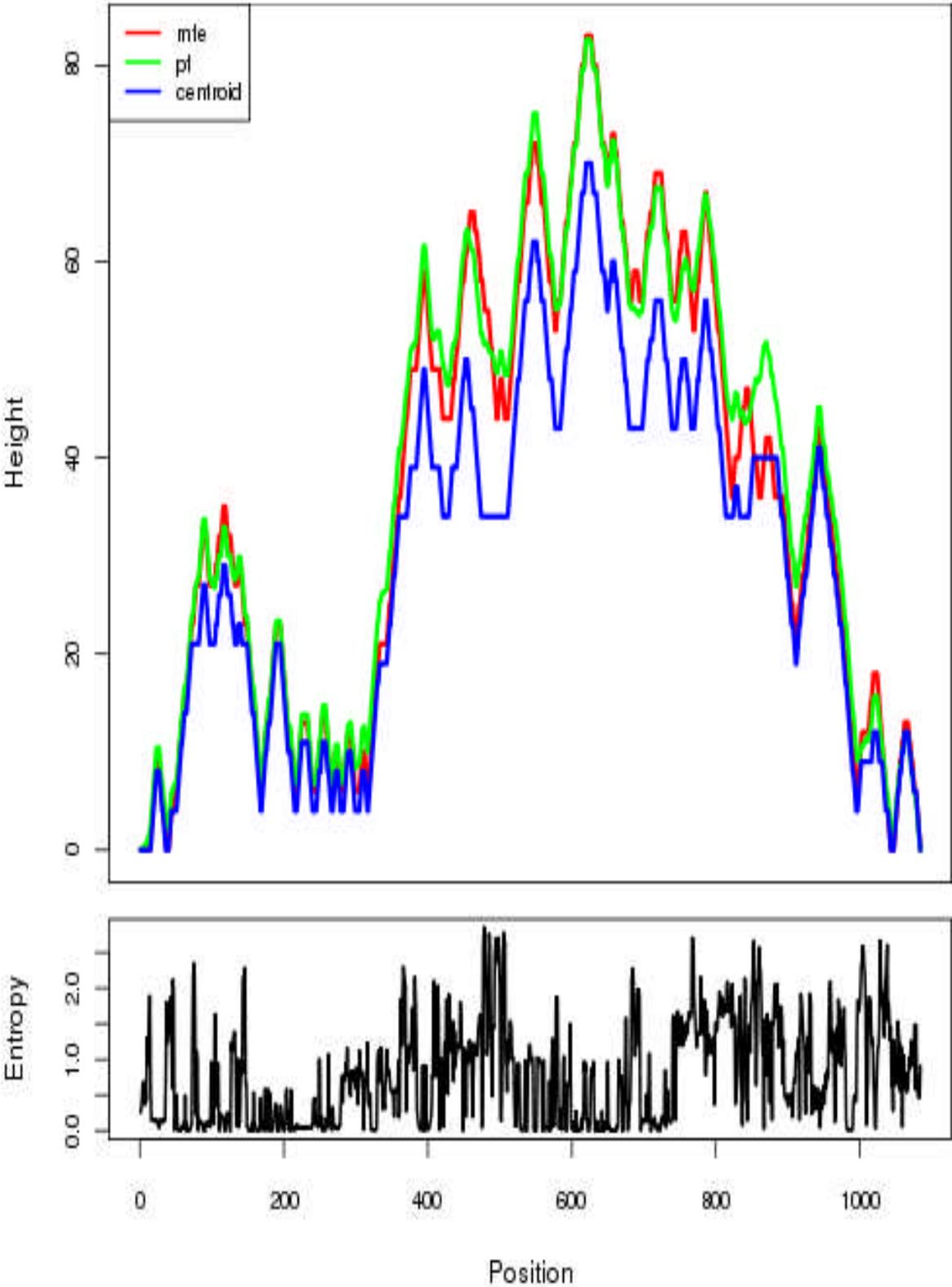
**Annexe 12 :** Diagramme de l'énergie libre de *Chromobacterium violaceum* prédit par RNAfold



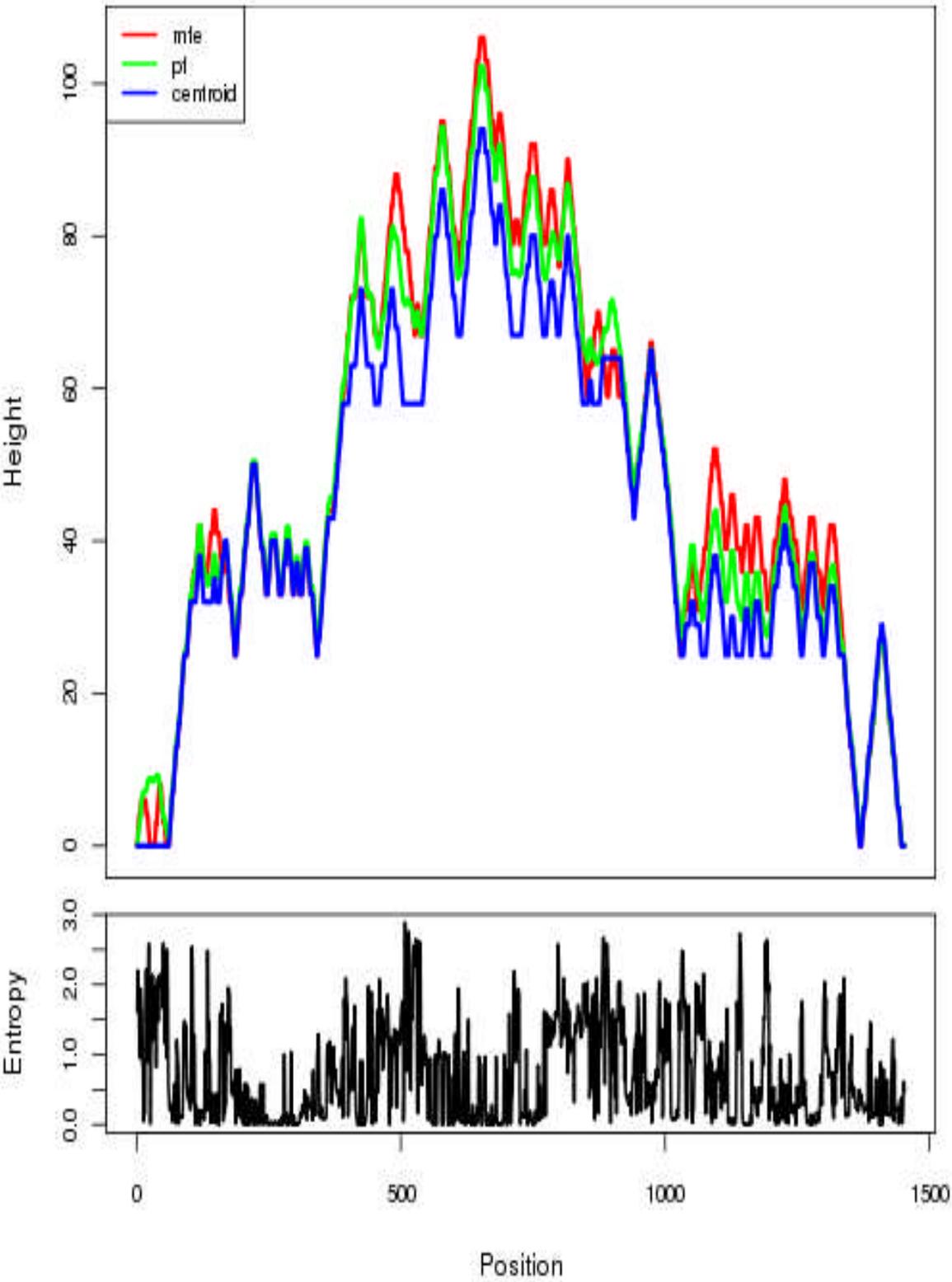
**Annexe 13 :** Diagramme de l'énergie libre de *Pseudomonas fluorescens* prédit par RNAfold



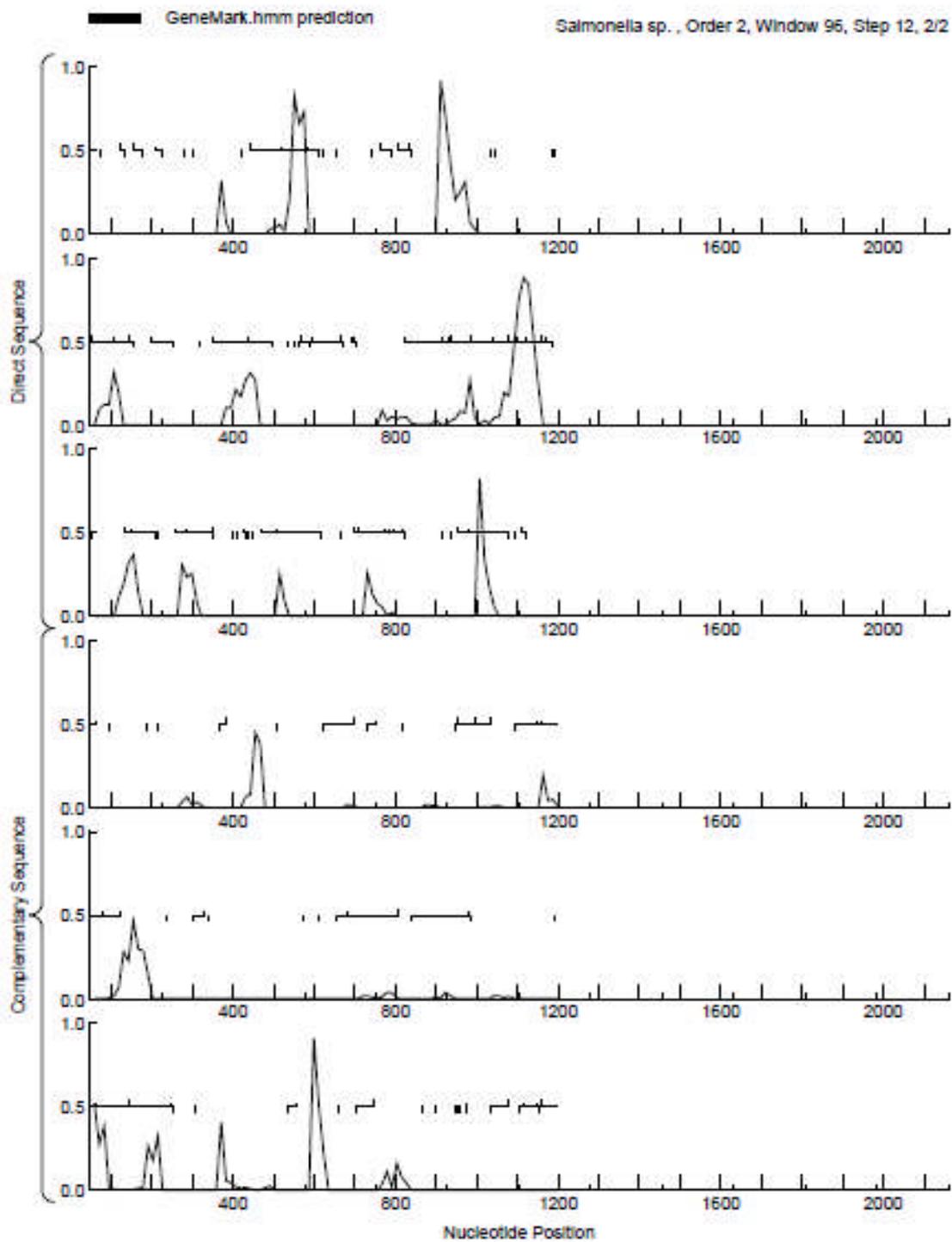
**Annexe14 :** Diagramme de l'énergie libre de *Enterobacter aerogenes* prédit par RNAfold



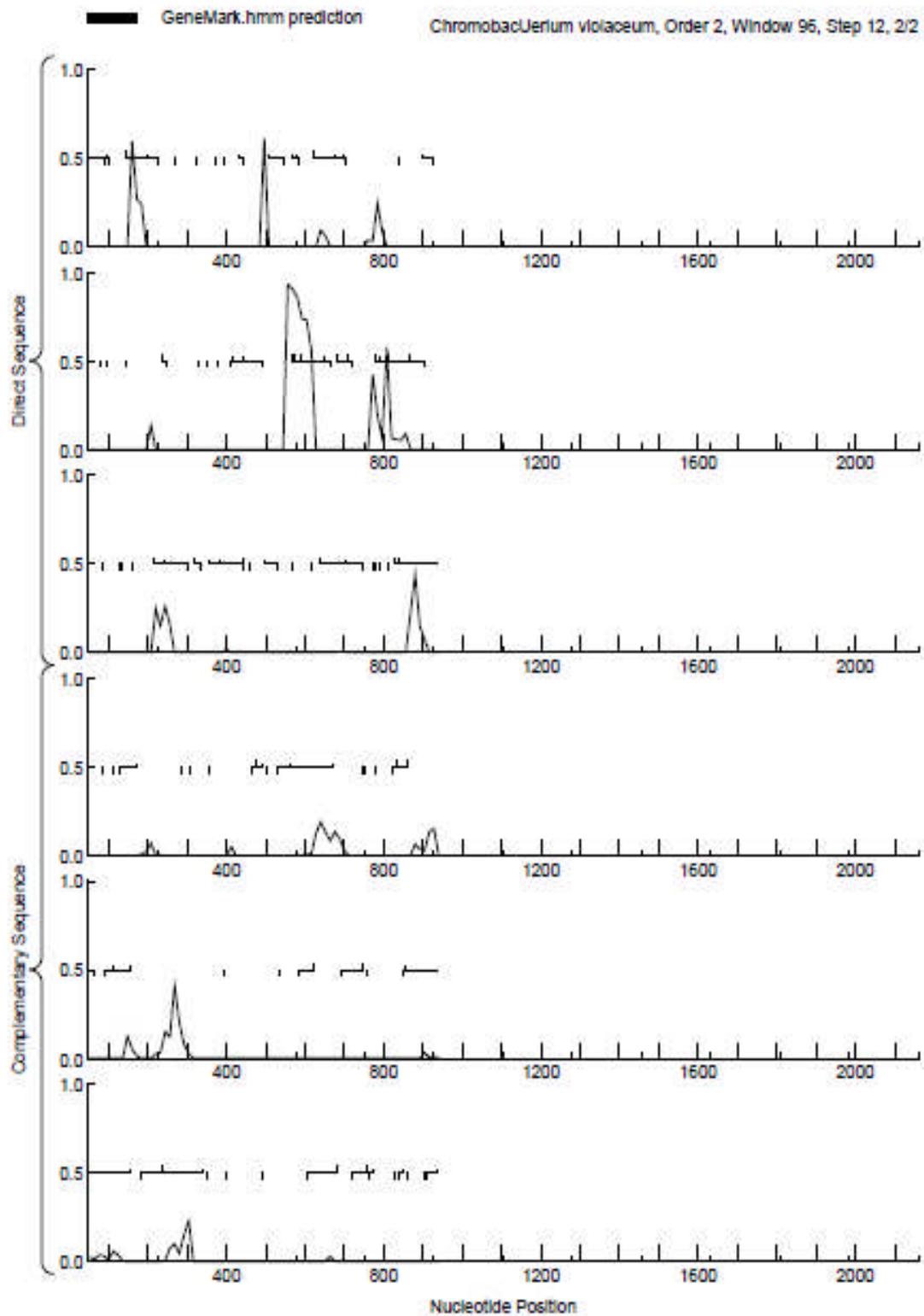
**Annexe 15 :** Diagramme de l'énergie libre de *Enterobacter intermedius* prédit par RNAfold



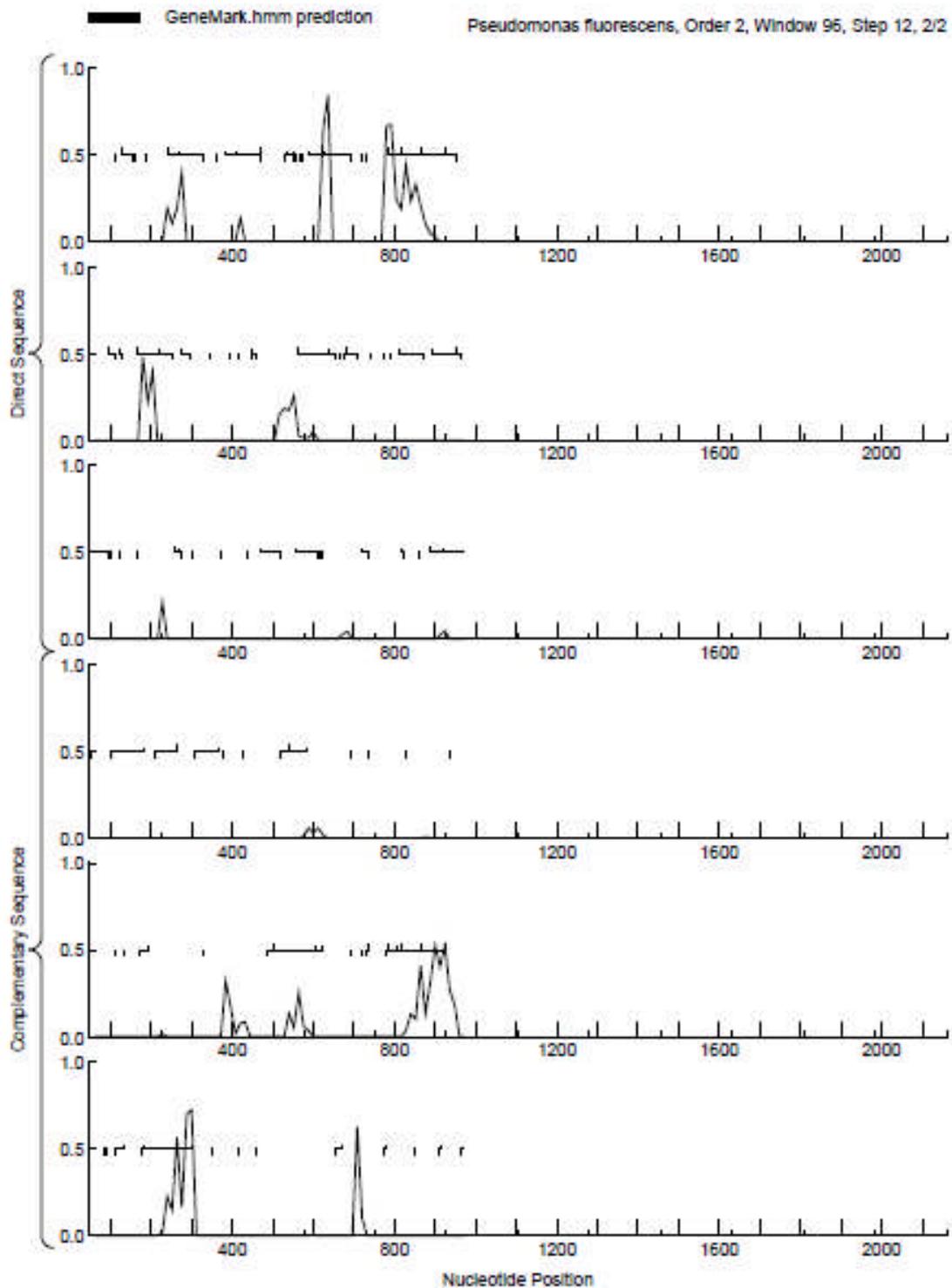
**Annexe 16 :** Diagramme de l'énergie libre de *Salmonella sp.* prédit par GenMark



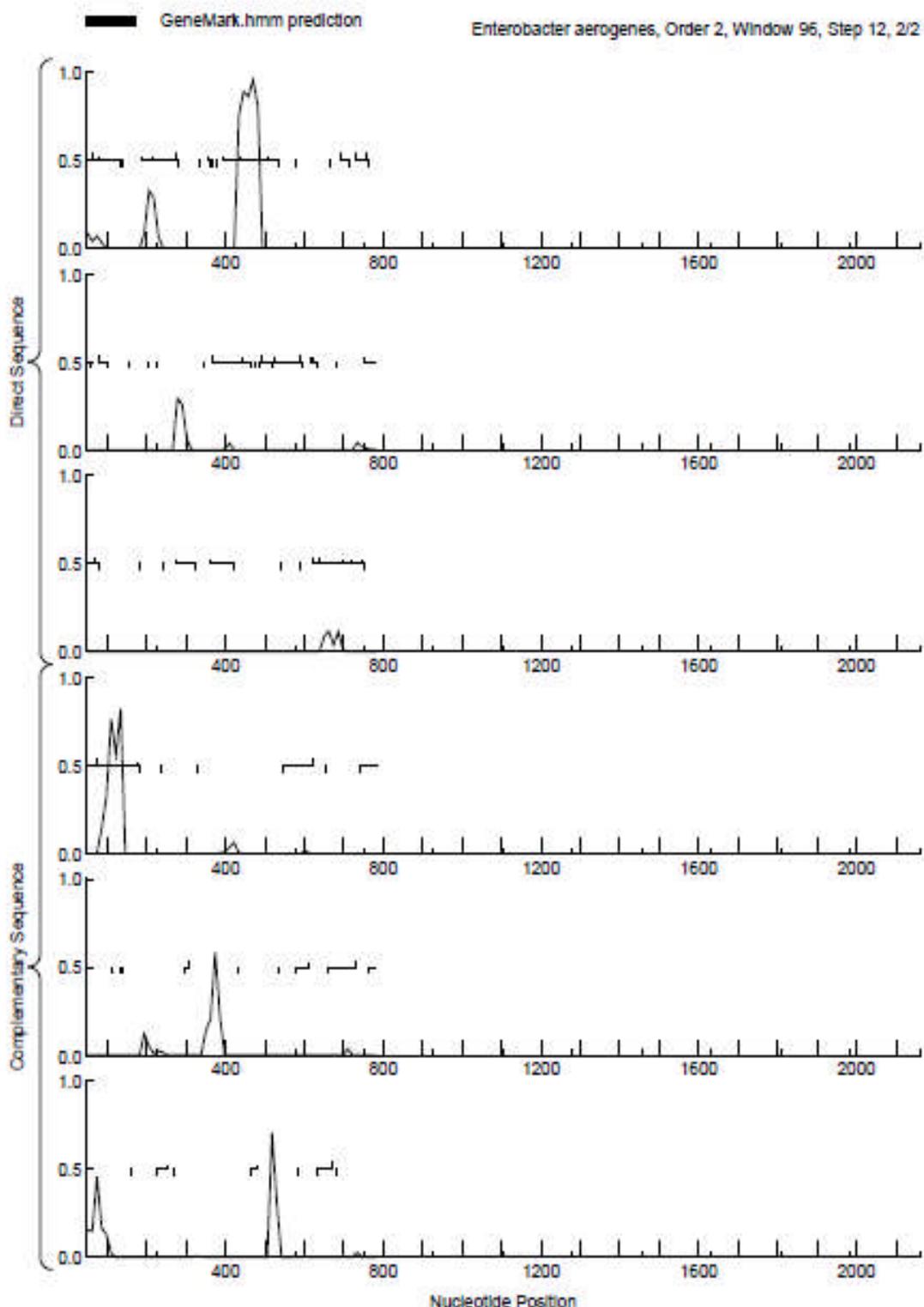
**Annexe 17 :** Diagramme de l'énergie libre de *Chromobacterium violaceum* prédit par GenMark



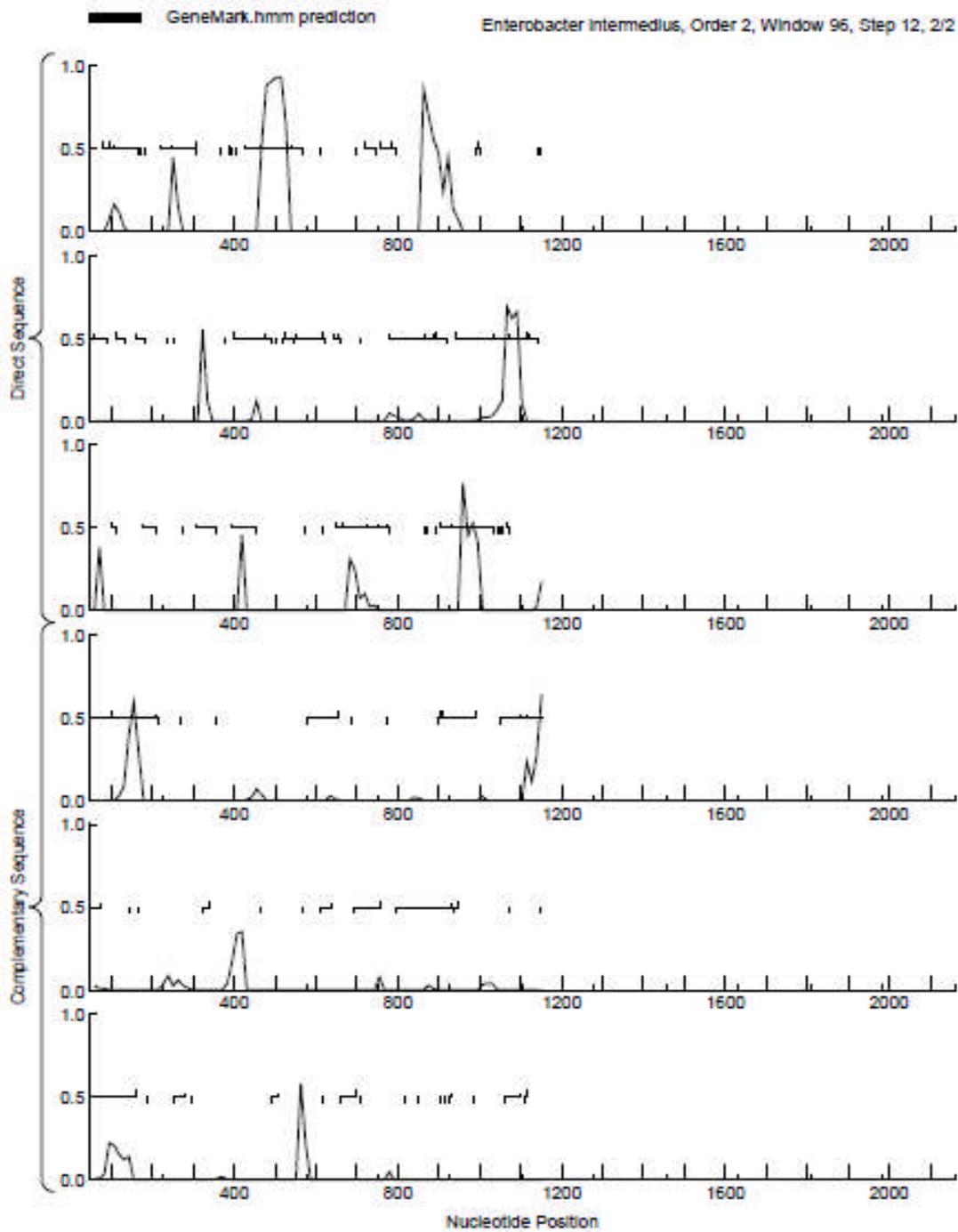
**Annexe 18 :** Diagramme de l'énergie libre de *Pseudomonas fluorescens* prédit par GenMark



**Annexe 19 :** Diagramme de l'énergie libre de *Enterobacter aerogenes* prédit par GenMark



**Annexe 20 :** Diagramme de l'énergie libre de *Enterobacter intermedius* prédit par GenMark



**Annexe 21** : Alignement multiple des cinq séquences ARNr 16S

...)))))..))...))..).....(((.....)))....(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....  
 Enterobacterinter AAACGGUAGCUAAUAACGCAUAACGUCGCAAGACCAAAGUGGGGGACCUUCGGGCCUCAC 178  
 Salmonella --ACGGGAGGCAGCAUUGG---GGAUAUUGCACAUAUGGGCGCAAGCU-----GAUGCAG 143  
 Pseudomonas AAAGCAAACGCUAAUAACGCGUACGUCCUACGGGAGAAAGCAGGGGACCUUCGGGCCUUGC 86  
 Enterobacteraero AAACGGUAGCUAAUAACGCAUAACGUCGCAAGACCAAUAUGGGGGACCUUCGGGCCUCAU 148  
 Chromobacteriumvioleceum AAAGACCUCCGG---UUAUACGA-GCAGCCGACGUCUGAU-----UAGCUAGUUGG-UGAG 101  
 .....130.....140.....150.....160.....170.....



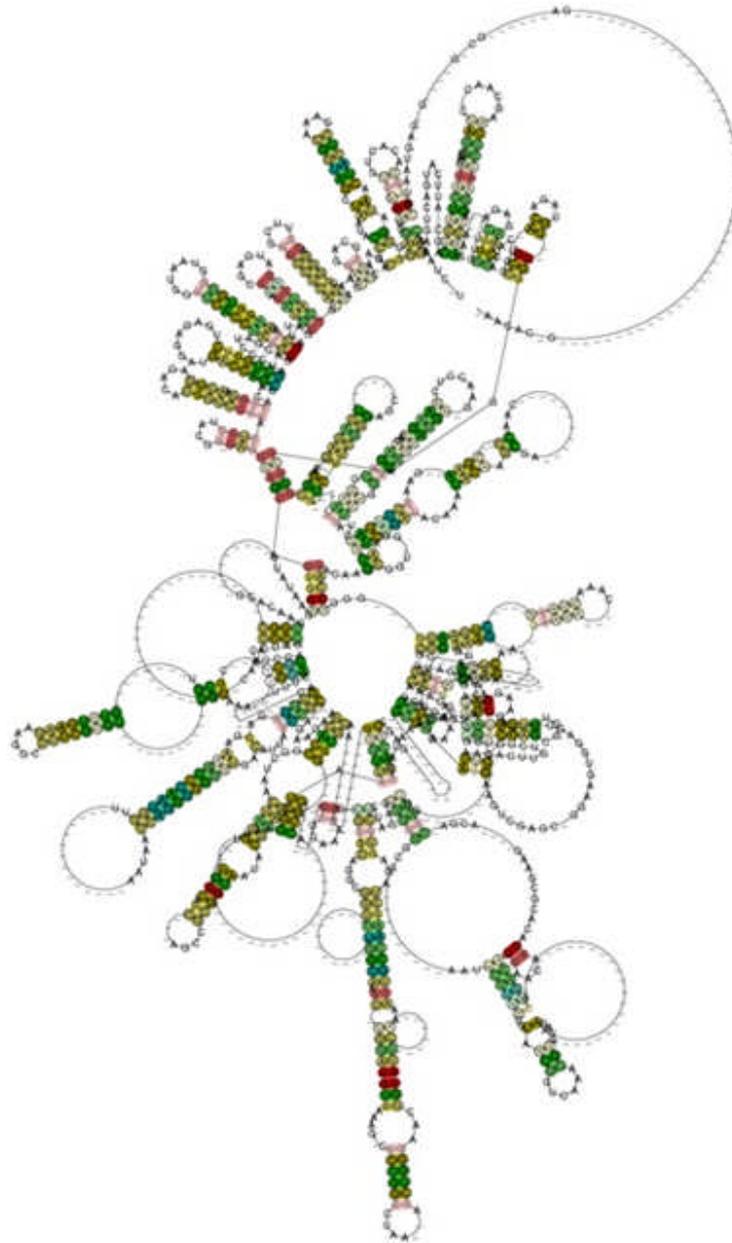
.(((((((.....))..)))....(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....  
 Enterobacterinter ACCAUCGGAUGUGCACAGAUGGGAUUAACUAGUAGGUGGGUUAUUGGCUCACCUAGGCGA 238  
 Salmonella CCAUGCCG-----CGUGUAUGAAGAACGCCUUCGGGU-UGUAAAG--UACUUUCAGCGG 194  
 Pseudomonas GCUAUCAGAUGAGCCUAGGUCGGAUUAACUAGUUGGUGAGGUAAUUGGCUCACCAAGGCGA 146  
 Enterobacteraero GCCAUCAGAUGUGCACAGAUGGGAUUAACUAGUAGGUGGGUUAUUGGCUCACCUAGGCGA 208  
 Chromobacteriumvioleceum G-UAAGAGCUCACCAAGGCCAGCAUCAAU--AGCGGGUCUGAGAGGAUGAUCGCCAC-- 156  
 .....190.....200.....210.....220.....230.....



.....(((((((.....))).....))).....(((.....))).....(((.....))).....  
 Enterobacterinter CGAUCCUAGCUGGUCUGAGAGGAUGACCAGCCACACUGGAACUGAGACACGGUCCAGAC 298  
 Salmonella GGAGGAAGGUGUUGUGGUUAAUAACCGCAGCAUUGACGUUACC CGCAGAAGAAGCACCG 254  
 Pseudomonas CGAUCCGUAACUGGUCUGAGAGGAUGAUCACUCACACUGGAACUGAGACACGGUCCAGAC 206  
 Enterobacteraero CGAUCCUAGCUGGUCUGAGAGGAUGACCAGCCACACUGGAACUGAGACACGGUCCAGAC 268  
 Chromobacteriumvioleceum -----ACUGGACUGAGA-CACGGCCAG-----ACUCC-UACGGGAGGCAG-- 196  
 .....250.....260.....270.....280.....290.....



**Annexe 22** : Structure 2D consensus des cinq séquences ARNr 16S



	C-G	G-C	A-U	U-A	G-U	U-G
0						
Paires Incompatible 1						
2						

---

## GLOSSAIRE

**Alignement multiple :** En bio-informatique, l'alignement de séquences (ou *alignement séquentiel*) est une manière de représenter deux ou plusieurs séquences de macromolécules biologiques (ADN, ARN ou protéines) les unes sous les autres, de manière à en faire ressortir les régions homologues ou similaires. L'objectif de l'alignement est de disposer les composants (nucléotides ou acides aminés) pour identifier les zones de concordance. Ces alignements sont réalisés par des programmes informatiques dont l'objectif est de maximiser le nombre de coïncidences entre nucléotides ou acides aminés dans les différentes séquences. Ceci nécessite en général l'introduction de "trous" à certaines positions dans les séquences, de manière à aligner les caractères communs sur des colonnes successives.

**Bactéries symbiotiques :** Les bactéries symbiotiques sont des bactéries vivant en symbiose avec un autre organisme. Les bactéries symbiotiques sont présentes chez les plantes et les animaux, par exemple au sein du système digestif elles aident à la digestion des aliments. Les bactéries symbiotiques peuvent également être associées avec d'autres bactéries

**BLAST :** BLAST (acronyme de *basic local alignment search tool*) est une méthode de recherche utilisée en bio-informatique permettant de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés et de réaliser un alignement de ces régions homologues. Ce programme permet de retrouver rapidement dans des bases de données, les séquences ayant des zones de similitude avec une séquence donnée

**Facteurs abiotiques :** les facteurs abiotiques représentent l'ensemble des facteurs physico-chimiques d'un écosystème influençant sur une biocénose donnée. C'est l'action du non-vivant sur le vivant. Opposables aux facteurs biotiques, ils constituent une partie des facteurs écologiques de cet écosystème. (températures, l'air, lumière, ...)

**Hétérotrophe :** Un organisme hétérotrophe est un organisme qui ne synthétise pas sa propre matière organique et qui, par conséquent, est amené à consommer des molécules organiques pour s'approvisionner en carbone. Il s'agit des organismes incapables de réaliser la photosynthèse.

**Hybridation :** L'hybridation de l'ADN est un principe de biologie moléculaire, fondé sur les propriétés d'appariement des bases complémentaires d'acides nucléiques. Ce principe est utilisé dans différentes techniques permettant la mise en évidence de la présence de molécules d'acides nucléiques particulières.

**Locus** : un locus est un emplacement physique précis et invariable sur un chromosome. Un locus peut être un endroit du chromosome où se situe un gène et plus.

**Marqueurs moléculaires**: Le marqueur génétique est un gène ou une séquence polymorphe d'ADN aisément détectable grâce à un emplacement connu sur un chromosome. Un marqueur génétique peut être une séquence d'ADN courte, comme une séquence autour d'une seule paire de bases, ou de séquences répétées.

**Taxon** : Un taxon correspond à une entité d'êtres vivants regroupés parce qu'ils possèdent des caractères en communs du fait de leur parenté, et permet ainsi de classifier le vivant à travers la systématique.

**Phylogénie** : La *phylogenèse* ou phylogénie est l'étude des relations de parenté entre êtres vivants (Entre individus, Entre populations, Entre espèces niveau *interspécifique*).

**Polymorphisme** : Le concept de polymorphisme génétique (du grec « *poly* » plusieurs et « *morphê* » forme) désigne la coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou locus donnés, dans une population bactérienne. Il explique qu'une espèce présente des individus aux caractères phénotypiques différents (appelés morphotypes) au sein d'une même population.

## Résumé

L'objectif de ce travail est de proposer une approche double phasique pour l'identification des bactéries isolées d'un sol destiné à la production céréalière.

Ces deux phases sont la caractérisation phénotypique classique (morphologie, biochimie et physiologie des isolats) et l'analyse bioinformatique des séquences 16S par la prédiction des structures 2D des ARNr 16S et la détermination des liens phylogénétiques.

Les résultats des deux méthodes sont en accord. Les souches isolées sont : *Salmonella sp.*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes* et *Enterobacter intermedius*.

Mots clés : Sol agricole, ARNr 16S, Prédiction Structure 2D, Phylogénie

## Abstract

The aim of this work is to propose a dual phasic approach for the identification of bacteria isolated from a soil for grain production.

These two phases are classical phenotypic characterization (morphology, biochemistry and physiology of isolates) and bioinformatic prediction of 2D structures of 16S rRNA and determination of phylogenetic relationships.

The results of the two methods are in agreement. The isolated strains: *Salmonella sp*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*, and *Enterobacter intermedius*.

**Keywords** : Agricultural Soil, rRNA 16S, 2D Structure Prediction, Phylogeny.

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو اقتراح نهج مزدوج لتصنيف البكتيريا المعزولة من التربة حقل لزراعة القمح الصلب. ها تان المرحتان تصفان النمط الظاهري ( الشكل، الكيمياء الحيوية وفزيولوجيا العزلات )، والتحليل المعلوماتي الحيوي للتنبؤ لاشكال ثنائية الابعاد وتحديد العلاقات لدراسة الروابط الوراثية .

نتائج الطريقتين المتحصل عليها متماثلة فيما بينها. السلالات المعزولة : *Salmonella sp, Chromobacterium violaceum, Pseudomonas fluorescens, Enterobacter aerogenes, Enterobacter intermedius*

الكلمات المفتاحية: ارض فلاحية، تنبؤ بالبنية ثنائية الابعاد، دراسة الروابط الوراثية.