

Evaluation de l'efficacité de trois méthodes d'extraction d'ADN de la biomasse microbienne totale du compost

Ben Ayed L., Hassen A., Gtari M., Jedidi N., Saidi N., Jaoua L., Murano F.

Institut national de la recherche scientifique et technique
BP 95-2050, Hammam Lif, Tunisie

Pour toute correspondance : benayedlayla@yahoo.fr

Résumé

L'extraction des acides nucléiques à partir du compost permet de détecter des microorganismes non détectables par les méthodes classiques. En effet, nous avons essayé trois méthodes différentes et nous avons remarqué l'importance d'une bonne lyse cellulaire pour la libération de l'ADN (8 cycles de congélation-décongélation). L'utilisation du mélange CTAB-PVPP a été remarquable puisque ce dernier a permis d'éliminer des impuretés, ce qui s'est traduit par un éclaircissement des échantillons bruns originels. La méthode de purification la plus efficace est celle qui utilise le mélange PEG-NaCl

Abstract

DNA extraction from compost make easy the detection of microorganisms non discernable by classic and usual methods. In fact, we have examined three different methods and try to perform them. So, we found an important level of cell lysis by the freezing thawing cycles, we found also the important elimination of impurities by CTAB-PVPP, it is shown by a clarification of the samples. The mix PEG-NaCl made a good purification of the DNA.

Introduction

Le compostage est un processus aérobie de dégradation des matières fermentescibles par une myriade de microorganismes. L'extraction des acides nucléiques à partir des échantillons de l'environnement (compost, sol, etc.) est devenu un outil utile (Chandler et al., 2000). En effet, cette extraction permet de détecter des microorganismes non décelables par les méthodes classiques (Liesack et Stackebrandt, 1992 ; Lee et al., 1996), permettant ainsi une meilleure estimation de la diversité microbienne (Steffan et Atlas, 1988). De plus, l'isolement de l'ADN permet aussi de révéler l'évolution de cette biodiversité (Torsvik et al., 1990) ou celle des gènes libérés dans l'environnement (Giddings, 1998). Dans le compost, l'analyse de la structure des communautés microbiennes exige des procédures d'extraction d'ADN adéquates.

Ainsi, la présence d'acides humiques et d'autres polluants complique l'amplification d'ADN par PCR, en inhibant la Taq DNA polymérase (La Montagne et al., 2002 ; Gabor et al., 2003). Cette coextraction peut aussi interférer avec les enzymes de restriction, réduisant alors l'efficacité de l'amplification (Tebbe et Vahjen, 1993). Etant donné que les substances humiques sont difficiles à séparer, la purification de l'ADN apparaît comme une étape critique dans le but d'obtenir de l'ADN d'une pureté satisfaisante (Zhou et al., 1996).

L'objectif de ce travail est de comparer l'efficacité de trois méthodes d'extraction d'ADN de la biomasse totale du compost pour essayer d'en choisir une qui diminue au maximum les impuretés, ce qui aura pour conséquence une bonne amplification par PCR.

Matériel et Méthodes

Description de l'unité pilote de Béja

Le processus de compostage a été entrepris dans la station de compostage des ordures ménagères de Béja. Cette station a été créée dans le cadre d'un projet de coopération entre l'Allemagne (GTZ) et la Tunisie (ANPE) pour étudier à l'échelle pilote les conditions de fonctionnement optimal du processus de compostage des rejets urbains du gouvernorat de Béja. Cette unité de compostage a une capacité de 1 000 tonnes/an (Ferchichi, 2002).

A leur entrée dans la station de compostage, les ordures ménagères sont mises en andains sans aucun traitement préalable. C'est la première phase du processus qui dure environ 2 mois. Par la suite, les ordures ménagères subissent un traitement physique qui consiste en un tri manuel afin d'enlever les éléments grossiers du compost, et en un broyage et un criblage par un tamis d'une maille de 40 mm dans le but de diminuer l'hétérogénéité des ordures ménagères. La matière organique fermentescible issue de ces traitements est remise en andains. La deuxième phase du compostage dure alors environ 3 mois. Le produit fini est criblé avec des mailles plus fines de 10 mm.

Au cours de cette expérimentation, nous avons réalisé deux andains. Leurs dimensions sont $3,0 \times 2,5 \times 1,5^3$ et correspondent à une masse de 6 tonnes environ. Un suivi quotidien de la température est réalisé à l'aide d'un thermocouple (iron-constantan type J). Neuf mesures sont effectuées dont trois à mi-hauteur, trois à 30 cm du bas et trois à 30 cm du haut. La température de l'andain est la valeur moyenne des températures recueillies dans les différents points de mesure. Lorsque la température dépasse 65°C , l'andain est retourné et arrosé. Les retournements permettent d'homogénéiser progressivement un déchet hétérogène au départ, et l'arrosage permet de maintenir une humidité élevée aux alentours de 50 %.

Avant chaque prélèvement d'échantillons, les andains sont retournés dans le but d'avoir un échantillon bien homogénéisé et représentatif. Les retournements ont été réalisés 10 fois. Un apport de déchets verts et de sciures de bois est ajouté le 60e jour pour amplifier l'activité microbienne en procurant un rapport C/N adéquat.

Echantillonnage

L'hétérogénéité des résidus urbains constitue une difficulté majeure pour réaliser un échantillonnage représentatif et reproductible. A chaque retournement des andains, un échantillon de 5 kg est prélevé à partir de différents points du tas selon la méthode de galette décrite par Gillet (1986). Ce même échantillon est brassé pour prélever trois exemplaires réduits. Le poids de chacun est de 1 kg. Le premier échantillon est congelé dans le but de fournir une collection d'échantillons, le deuxième est destiné aux analyses physico-chimiques et enfin le troisième servira aux analyses microbiologiques.

Mise au point d'une technique d'extraction de l'ADN de la communauté microbienne du compost

Le principe de l'extraction de l'ADN se base sur :

- (i) une désagrégation des colloïdes du compost par des dispersions dans des tampons,
- (ii) une lyse des cellules pour la libération de l'ADN par des traitements physiques, chimiques ou enzymatiques afin de lyser toutes les membranes microbiennes et notamment celles des formes de résistance (les spores),
- (iii) une extraction proprement dite de l'ADN,
- et enfin (iv) une purification de l'ADN des autres contaminants comme les acides humiques, les composés phénoliques et les polysaccharides qui partagent souvent les mêmes caractéristiques physico-chimiques des acides nucléiques et qui peuvent interférer avec la Taq DNA polymérase et son cofacteur (Mg^{2+}).

Trois protocoles différents ont été testés pour mettre au point une technique efficace et à bon rendement pour la détection de l'ADN de la communauté microbienne totale vivant au sein du compost.

Le premier protocole d'extraction d'ADN est décrit par Holben et al. (1994) :

— L'expérience est menée sur 5 g de compost broyé additionné de 16 ml d'une solution d'acide ascorbique et de 1,5 g de Polyvinylpyrrolidone PVP (Mercks, 7443). Ce polymère se complexe avec les acides humiques et phénoliques permettant ainsi leur élimination.

— Après une centrifugation à 3 000 rpm pendant 10 min (centrifugeuse Heraeus Christ, Labofuge A), le culot est récupéré et lavé avec 1 ml de Tris (Qbiogene, 0500) EDTA (Fluka AG, 03685) (33 mM de Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8). Cette suspension permet la dispersion des colloïdes du compost, favorisant ainsi la désagrégation des cellules microbiennes.

— Par la suite, 250 μl de NaCl à 5 M et 10 μl de Sodium Dodécyl Sulfate SDS (Qbiogene, 00500) à 20 % sont ajoutés au culot dans le but de rompre la membrane microbienne pour faciliter la libération de l'ADN.

— Le mélange est incubé à la température ambiante pendant 10 min et centrifugé à une vitesse de 12 000 rpm pendant 10 min (centrifugeuse Hettich, micro 20), un volume de 25 μl de lysozyme (Qbiogene, 0005) à 40 mg/ml est ajouté et les préparations obtenues seront incubées à 37°C pendant 30 min.

— 25 μl de protéinase K (Appligene, I30202) à 10 mg/ml sont ajoutés, suivis d'une incubation à 65°C pendant 10 min. Le lysozyme et la protéinase K contribuent également à la lyse des membranes microbiennes.

— L'étape suivante consiste à ajouter de nouveau 15 μl de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) à 20 % et à incuber la préparation à 65°C pendant 40 min.

— Les préparations sont transférées dans de la glace pendant 30 min. Le surnageant obtenu, après une centrifugation à 12 000 rpm pendant 10 min, est transféré dans un autre tube eppendorf préalablement rempli volume à volume d'isopropanol.

— Les tubes sont de nouveau centrifugés pendant 5 min à 12 000 rpm. Le culot obtenu est asséché en essuyant les parois des tubes avec du papier absorbant, puis lavé 2 fois avec 1 ml d'éthanol froid à 70 % tout en l'asséchant.

— 200 μl de RNase (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sont ajoutés au culot obtenu pour enlever toute trace d'ARN, et le tout est porté à 37°C pendant une heure.

Le deuxième protocole d'extraction d'ADN est décrit par Ausubel et al. (1997) :

— L'expérience est menée sur 5 g de compost broyé ajouté de 20 ml de Tris-HCl (10 mM). La suspension obtenue est placée dans la glace et agitée mécaniquement pendant 1 heure à 300 rpm, afin de libérer le maximum de cellules microbiennes.

— Après une centrifugation à 3 000 rpm pendant 10 min, on récupère le culot et on lui ajoute 400 μl de Tris Sucrose EDTA (50 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA, 0,75 M de sucrose [Prolabo, 27480.294]). Ce complexe permet une dispersion des particules du compost.

— Après une incubation à 37°C pendant 30 min, 10 μl de Lysozyme (10 mg/ml) est additionné à ce mélange pour lyser la membrane cellulaire. Après une deuxième incubation à 37°C pendant 5 min, 50 μl de Tris-EDTA (TE) (0,025 mM

EDTA, 50 mM Tris HCl pH 8) sont ajoutés pour protéger l'ADN contre l'activité des nucléases, suivis de 30 µl de la solution de SDS (SDS 20 %, 20 mM EDTA, 50 mM Tris HCl). Cette préparation après avoir été placée à 37°C pendant 10 min, est additionnée de 30 µl de NaOH 3 N, de 50 µl de Tris HCl 2 M pH 7 et finalement de 80 µl de NaCl 5 M. Le tout est mélangé doucement par inversion des tubes durant quelques minutes.

— Après une centrifugation à 8 000 rpm pendant 10 min, le mélange Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique à 25 :24 :1 (Carlo Erba, 600412) est ajouté volume à volume dans les tubes eppendorfs.

— Les tubes sont, par la suite, centrifugés à 12 000 rpm pendant 10 min. La phase supérieure est lavée à deux reprises avec le mélange Chloroforme-Alcool isoamylique (24 :1). Le surnageant obtenu, après une centrifugation à 12 000 rpm pendant 10 min, est additionné d'acétate de sodium (2,5 M, pH 6,5 ; 1/10 volume) et d'éthanol absolu (2 volumes) et les tubes sont conservés pendant une nuit au congélateur à -20 °C.

— Après cette précipitation de l'ADN, une centrifugation est réalisée à 12 000 rpm durant 30 min. Le culot obtenu est lavé avec de l'alcool froid à 70 % puis séché pendant une heure à l'étuve à 37 °C. Finalement, on ajoute 50 µl de Tris EDTA RNase (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, RNase [Qbiogene, S0500] 20 µg/ml) et on laisse les échantillons en incubation à 37 °C pendant 1 heure.

Le troisième protocole d'extraction d'ADN est décrit par Rouvier et al. (1996) modifié par Gtari (2003) :

— Il est mené sur 1 g de compost broyé auquel on ajoute 3 ml d'une solution de TENCPP (Tris HCl 1 M pH 8, EDTA 0,5 M, CTAB 2 %, PVP 0,5 %, PVPP Polyvinylpolypyrrolidone à 0,5 %). La suspension obtenue est portée à incubation à 65 °C pendant une heure au bain-marie. Le surnageant obtenu, après une centrifugation à 6 000 rpm pendant 10 min, est conservé. C'est l'ADN libre dans le compost.

— Le culot est réadditionné de 3 ml de TENCPP et il est traité par 8 cycles de congélation à -80 °C et de décongélation à +80 °C. Le surnageant obtenu après une centrifugation à 6 000 rpm pendant 10 min représente l'ADN cellulaire.

— Pour compléter la lyse, 10 µl de protéinase K (20 mg/ml) sont ajoutés au surnageant et les tubes sont placés à 37 °C pendant 30 min. Ce temps écoulé, on réalise trois lavages successifs avec le mélange CTAB (1 %) - PVPP Polyvinylpolypyrrolidone à 0,5 % et on incube à 65 °C pendant 1 heure après chaque lavage. Ces deux composés se complexent aux contaminants humiques et phénoliques, assurant ainsi leur élimination.

— La phase supérieure est récupérée après une centrifugation à 8 000 rpm pendant 5 min. Puis, le mélange Chloroforme-Alcool isoamylique (24 :1) est ajouté volume à volume aux phases supérieures. Après une nouvelle centrifugation à 12 000 rpm pendant 10 min, la phase aqueuse contenant les acides nucléiques est récupérée et la phase inférieure protéique est éliminée. L'ADN est précipité en présence d'acétate de sodium (Merck, 6267) (3 M, pH 6,5 ; 1/10 volume) et d'éthanol absolu froid (2 volumes).

Les suspensions ainsi préparées sont placées à -20 °C pendant une nuit.

— Le culot obtenu, après une centrifugation à 12 000 rpm pendant 30 min est additionné de 50 µl de TE (Tris HCl, 10 mM pH 8, EDTA 0,1 mM pH 8), et de PEG-NaCl (20 % du PEG PM 8000, 2,5 M NaCl) volume à volume et les suspensions sont incubées à 37 °C pendant 15 min. Ensuite, on centrifuge 30 min à 12 000 rpm, et de l'éthanol froid à 70 % est ajouté volume à volume aux culots obtenus.

— Finalement, les culots sont séchés à 37 °C pendant une heure et la dernière étape de l'extraction consiste à ajouter aux culots asséchés un mélange Tris-EDTA-RNase (TER) (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, RNase 20 µg/ml) et à les placer à 37 °C pendant une heure.

Migration électrophorétique

Une fois extrait, l'ADN est analysé par électrophorèse sur un gel horizontal d'agarose à 1 %. Les gels sont préparés avec une solution de tampon TBE 0,5X, additionnée de 0,5 µl de BET (20 mg/ml). Par la suite, la migration est effectuée dans le même tampon sous un voltage constant de 80V et les gels sont visualisés sous UV.

Dosage de l'ADN

Un dosage par spectrophotométrie (spectrophotomètre à UV visible Philips PU 8620 séries) permettra l'estimation de la concentration d'ADN double brin par une absorbance à 260 nm. A cette longueur d'onde, une unité de DO est équivalente à une concentration de 50 µg d'ADN par ml. La pureté de l'extrait est évaluée par le rapport DO260 / DO280.

Amplification de l'ADN par PCR

L'amplification par PCR des échantillons de compost est réalisée selon le protocole décrit dans le Tableau 1.

Tableau 1. Conditions de l'amplification par l'ITS - PCR

	Concentration stock	Concentration / réaction (50 µl)	Volume / réaction (µl)
Tampon PCR + MgCl ₂	10 X	1X	5
dNTP (mM)	20	0,1	0,25
Amorce ITS-F (µM)	50	0,5	0,5
Amorce ITS-R (µM)	50	0,5	0,5
Taq polymérase (U)	5	1,5	0,2
ADN (µl)			1
qsp H ₂ O (µl)			50

Au cours des réactions PCR, deux couples d'amorces universelles ont été utilisées, ciblant les séquences ITS 16S - 23S de l'opéron ribosomique bactérien (Tableau 2).

Tableau 2. Séquences et positions des amorces utilisées

ADN bactérien	Amorces	Séquences	Références
ITS 16S-23S	S-D-Bact-1494-a-S-20	5'-GTCGTAACAAGGTAGCCTA-3'	Wheeler et al.(1996)
ITS 16S-23S	S-D-Bact-0035-a-A-15	5'-CAAGGCATCCACCGT-3'	Wheeler et al.(1996)

Les amplifications par PCR ont été effectuées sur un thermocycleur automatique Biometra UNO II (Biometra, France).

Des dilutions de 10 et 100 fois sont parfois nécessaires pour réussir l'amplification de l'extrait d'ADN obtenu. Le programme d'amplification des ITS-PCR est résumé dans le Tableau 3.

Tableau 3. Programme des ITS – PCR

	Dénaturati on initiale	Dénaturati on	Hybridatio n	Elongatio n	Elongati on finale
Température (°C)	94	94	45	72	72
Temps	4 min	30 s	30 s	45 s	7 min
Nombre de cycles	1	40	40	40	1

Analyses électrophorétiques des produits de la réaction PCR. Après une amplification de l'ADN extrait, les produits de la PCR sont analysés successivement sur un gel d'agarose et sur un gel de polyacrylamide.

Les gels d'agarose préparés sont à 2 %. La migration est effectuée dans le tampon TBE 0,5X sous un voltage constant de 80V. Les gels obtenus sont visualisés sous UV.

Les gels verticaux de polyacrylamide à 6 % sont préparés pour l'analyse des produits ITS-PCR. Les gels de polyacrylamide améliorent la séparation des structures conformationnelles (hétéroduplexes) des fragments PCR. La migration est effectuée dans le tampon de TBE 1X sous un voltage constant de 80V. Les gels obtenus sont colorés avec une solution de BET (0,5 mg/ml) pendant 3 min et visualisés sous UV.

Résultats et Discussion

Choix de la méthode d'extraction de l'ADN de la communauté microbienne du compost

Des trois techniques adoptées, seule la troisième a donné des résultats satisfaisants. Deux techniques d'extraction de l'ADN sont couramment utilisées, les méthodes de lyse directe et les méthodes de fractionnement indirectes. Les techniques de lyse directe procurent une bonne qualité d'ADN représentative de la diversité de la communauté microbienne (Steffan et Atlas, 1988 ; Leff et al., 1995). Cependant, il y a une coextraction des contaminants humiques et phénoliques, inhibiteurs de la Taq DNA polymérase et de son cofacteur Mg²⁺ (Tebbe et Vahjen, 1993). Cette méthode présente un autre inconvénient représenté par une surestimation de la communauté microbienne puisqu'elle permet aussi la récupération de l'ADN extracellulaire (Frostegard et al., 1999). Dans ce travail, on a opté pour l'utilisation des méthodes indirectes d'extraction de l'ADN comme il a été préconisé par Jacobsen et Rasmussen (1992) et Leff et al. (1995) pour permettre une désagrégation maximale des particules du compost, tout en évitant une importante coextraction avec les contaminants humiques et phénoliques. Dans le but de détecter la distribution des microorganismes dans le compost, on a essayé d'adopter une approche moléculaire par extraction d'ADN. Le principe de cette méthode implique une séparation des cellules de la communauté microbienne à partir des colloïdes du compost, après des dispersions dans un tampon adéquat TENCPP (Tris, EDTA, NaCl, CTAB, PVPP, PVP) à pH 8. Ce tampon contient du Na⁺. Ce cation se substitue aux cations Mg²⁺ et Ca²⁺ qui assurent la cohésion des agrégats, permettant ainsi la libération des cellules piégées (Bickley et al., 1996).

De plus, selon une étude de Frostegard et al. (1999), la quantité d'ADN extraite augmente avec l'augmentation du pH, sachant que la séparation des composés humiques de l'ADN varie en fonction du pH. Par la suite, une lyse physique par 8 cycles de congélation (- 80 °C) et de décongélation (+ 80 °C) est réalisée. Plus le nombre de cycles de congélation et de décongélation est important, meilleure est la lyse. Ainsi, il y a une lyse membranaire importante des membranes microbiennes et notamment de celles des spores (Kuske et al., 1998). Ensuite, le mélange Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)-Cétyl triméthyl ammonium bromide (CTAB) a été utilisé dans le but d'éliminer les contaminants humiques, phénoliques et les polysaccharides potentiellement présents. Ce mélange a été perçu très efficace à travers les essais de Zhou et al. (1996). Dans ce contexte, Tebbe et Vahjen (1993) ont trouvé, lors de l'extraction de l'ADN à partir du sol, une coextraction d'autres composés du sol procurant à l'échantillon une couleur foncée. Lors de la migration sur des gels d'agarose, les composés colorés migrent ensemble. Ils ont conclu que la couleur foncée était le résultat de la présence d'acides humiques. Un lavage avec un mélange Chloroforme-Alcool isoamylique est effectué dans l'étape suivante sans une application au préalable du mélange Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique ; ce traitement est généralement suffisant pour éliminer les protéines et les autres contaminants (Bloom et al., 1989). Une autre caractéristique de ce protocole est l'application du PEG-NaCl pour précipiter l'ADN. Cette technique représente une sorte de purification. En effet, le PEG se caractérise par des propriétés agglutinantes et combiné à NaCl, il favorise l'agrégation des contaminants restants dans la phase supérieure et le dépôt de l'ADN au fond du tube.

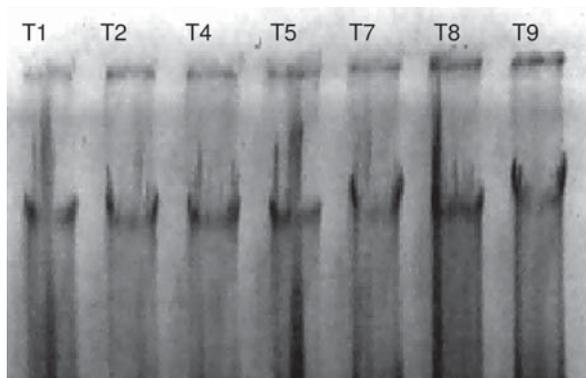
Extraction de l'ADN microbien à partir du compost

Le compost représente un substrat très complexe montrant un assemblage très particulier d'une matrice minérale et d'une matrice organique. Le compost abrite une biodiversité éminente mais dont uniquement un faible pourcentage est cultivable (Steffan et Atlas, 1988). Ces particularités ont largement limité l'application des techniques moléculaires pour la détection directe des microorganismes dans le compost. D'une part, l'extraction de l'ADN à partir du compost nécessite une dispersion totale des microorganismes afin de libérer toutes les cellules microbiennes pour pouvoir les lyser. Ce protocole entraîne systématiquement une dégradation de l'ADN (Gtari, 2003). Toutefois, la purification de l'extrait d'ADN est souvent limitée par la présence de composés humiques et organiques qui partagent le plus souvent les propriétés physico-chimiques de l'ADN (Tsai et Olsen, 1991 ; Tsai et Olsen, 1992).

La purification peut être aussi limitée par la présence de fortes concentrations d'ADN hétérologues provenant des tissus végétaux (Goldsteyn et al., 1991). D'autre part, la mise au point de sondes moléculaires utilisées en PCR est une tâche particulièrement délicate (Piccard et al., 1992).

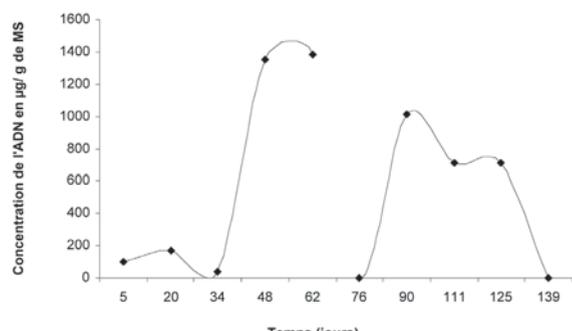
L'ADN de la communauté microbienne totale vivant dans le compost a été extrait. D'après la Figure 1, seulement 7 des 10 échantillons de compost testés ont donné des bandes d'ADN perceptibles sous UV. Ces échantillons de compost sont le T1 (5^e jour), T2 (20^e jour), T4 (48^e jour), T5 (62^e jour), T7 (90^e jour), T8 (111^e jour) et finalement le T9 (125^e jour du cycle de compostage) et ils représentent l'ordre d'échantillonnage effectué au cours du protocole de suivi.

Figure 1. Gel horizontal d'électrophorèse (1 % agarose) de l'ADN total extrait au cours du cycle de compostage des ordures ménagères



Les concentrations de l'ADN extrait ont été déterminées par une mesure de la DO à 260 nm. D'après la Figure 2, une fluctuation des concentrations d'ADN est enregistrée au cours du cycle de compostage. En effet, pendant la phase mésophile de la première phase, les teneurs d'ADN sont de l'ordre de 170 µg/g de MS. Ces résultats reflètent la présence d'une large diversité microbienne. Cependant, vers le 34^e jour, il n'y a pas eu de détection d'ADN. Ce dernier résultat peut s'expliquer par la présence de contaminants humiques et phénoliques qui entravent le protocole d'extraction de l'ADN. La large diversité des microorganismes du compost est mise en évidence au cours de la phase thermophile de la première phase vers le 48^e jour, où les températures sont alors de l'ordre de 50 °C.

Figure 2. Evolution des concentrations d'ADN microbien au cours du cycle de compostage



Légende : T1 : 5^e jour; T2 : 20^e jour; T4 : 48^e jour; T5 : 62^e jour; T7 : 90^e jour; T8 : 111^e jour; T9 : 125^e jour

Par ailleurs, les concentrations d'ADN augmentent et tendent à se stabiliser au cours de la phase de refroidissement de la deuxième phase. Elles sont alors de l'ordre de 700 µg/g de MS. Le compost, une fois arrivé à terme, est un produit très riche en composés humiques. Ce qui explique l'absence de détection d'ADN vers la fin de la phase de refroidissement.

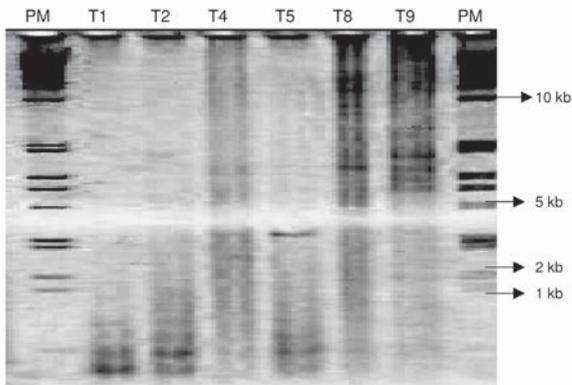
Le rapport DO_{260}/DO_{280} de l'extrait d'ADN indique le degré de pureté d'un échantillon donné de compost (Tableau 4). Plus ce rapport est proche de 2, moins il y a une contamination par les protéines (Bloom et al., 1989). Un ADN pur doit avoir généralement un rapport DO_{260}/DO_{280} compris entre 1,8 et 2. Pour tous les échantillons testés, le degré de pureté apparaît relativement faible, vraisemblablement suite à une forte contamination par les acides humiques, les composés phénoliques, une forte concentration en ADN hétérologues et par les protéines (La Montagne et al., 2002). Ce résultat met en évidence l'importance de l'étape de purification dans l'extraction de l'ADN de la communauté microbienne du compost (Howeler et al., 2003).

Tableau 4. Rapport DO_{260}/DO_{280} de pureté de l'ADN

Echantillons	DO_{260}	DO_{280}	DO_{260}/DO_{280}
1	0,003	0,011	0,27
2	0,005	0,031	0,16
4	0,04	0,034	0,15
5	0,041	0,061	0,67
7	0,03	0,036	0,83
8	0,021	0,055	0,38
9	0,021	0,067	0,31

Par ailleurs, l'amplification de la région intergénique 16S-23S a été réalisée par un couple d'amorces universelles S-D-Bact-61494-a-S-20 et L-D-Bact-0035-a-A- (Wheeler et al., 1996). D'après la Figure 3, les produits ITS obtenus sont soit sous forme de traînée, soit ils se présentent sous forme d'une association de plusieurs bandes variant entre 200 et 700 pb. Ainsi, ce profil complexe consiste en une combinaison de divers produits en homoduplexes, provenant des différentes ITS des communautés microbiennes, auxquels s'ajoutent les structures en hétéroduplexes générées par les hybridations croisées des ITS. La présence des résidus d'acides humiques et de matières organiques — et probablement aussi de fortes concentrations d'ADN hétérologues — serait par conséquent à l'origine de l'inhibition de l'amplification de l'échantillon 7 par PCR.

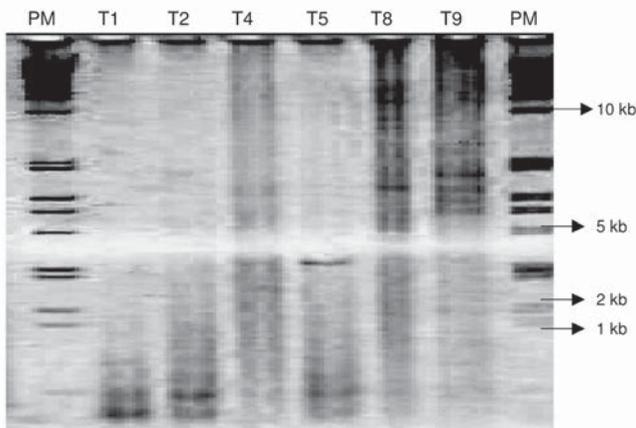
Figure 3. Gel horizontal d'électrophorèse (2 % agarose) des produits des ITS-PCR



Légende : T1 : 5^e jour; T2 : 20^e jour; T4 : 48^e jour; T5 : 62^e jour; T7 : 90^e jour; T8 : 111^e jour; T9 : 125^e jour.

La résolution des produits ITS-PCR a été par la suite examinée sur une autre matrice avec un meilleur pouvoir résolutif qui est la matrice de polyacrylamide pour confirmer les profils observés sur gel d'agarose, à savoir un grand polymorphisme de taille (Figure 4). Le profil des produits ITS-PCR obtenu sur gel de polyacrylamide montre des bandes d'amplification variant entre 1 et 11 kb. La configuration du gel de polyacrylamide permet une meilleure visualisation des homoduplexes et des hétéroduplexes qui sont plus ou moins individualisés (Daffonchio et al., 2000).

Figure 4. Gel vertical de polyacrylamide (6 %) des produits des ITS - PCR



Ainsi, à travers l'approche moléculaire et une amplification des copies d'ADN obtenues par PCR, il y a une augmentation de la possibilité de détecter des séquences d'ADN présentes en faibles quantités dans le compost.

Toutefois, l'extraction des acides nucléiques peut être confrontée à divers facteurs limitants. On cite alors des insuffisances au cours des étapes d'extraction, comme une lyse cellulaire incomplète ou encore une désagrégation minimale des microorganismes des colloïdes du compost. La coextraction des contaminants humiques, des composés phénoliques, et de fortes concentrations d'ADN hétérologues seraient aussi considérées comme un facteur limitant.

Finalement, à travers cette approche moléculaire, on a pu en premier lieu comparer trois méthodes pour l'extraction d'ADN de toute la communauté microbienne du compost, et en second lieu détecter la distribution de cette communauté pour mieux la connaître.

Références bibliographiques

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Siderman S.G., Struhl (Eds). (1997). *Current Protocols in Molecular Biology*. Struhl editions. John Wiley and Sons, New York.

Bickley J., Short J.K., Mc Dwell D.G., Parkes H.C. (1996). PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Diluted Milk and Reversal of PCR Inhibition Caused by Calcium Ions. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, p. 153-158.

Bloom R.A., Mullin B.C., Tate R.L. (1989). DNA Restriction Patterns and DNA-DNA Solution Hybridization Studies of *Frankia* Isolates from *Myrica pensylvanica* (Bayberry). *Appl. Environ. Microbiol.* 55, p. 2155 – 2160.

Chandler D.P., Stults J.R., Cebula S., Schuck B.L., Weaver D.W., Anderson K.K., Eghlom M., Brockman F.J. (2000). Affinity Purification Of DNA And RNA from Environmental Samples With Peptide Nucleic Acid Clamps. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, p. 3438-3445.

Daffonchio D., Cherif A., Borin S. (2000). Homoduplex and Heteroduplex Polymorphisms of the Amplified Ribosomal 16S-23S Internal Transcribed Spacers Describe Genetic Relationships in the *Bacillus cereus* Group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, p. 5460-5468.

Ferhichi M. (2002). Solid Waste Management in Tunisia. *Proceedings of International Symposium on Environmental Pollution Control and Waste Management, Tunisia*, p. 748-754.

Frostegard A., Courtois S., Ramisse V., Clerc S., Bernillon D., Le Gall F., Jeannin P., Nesme X., Simonet P. (1999). Quantification of Bias Related to the Extraction of DNA directly from Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, p. 5409-5420.

Gabor E.M., De Vries E.J., Janssen D.B. (2003). Efficient Recovery of Environmental DNA for Expression Cloning by Indirect Extraction Methods. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*. Published by Elsevier B.V. 44, p. 153-163.

Giddings G. (1998). The Release of Genetically Engineered Microorganisms and Viruses into the Environment. *New Phytol* 140, p. 173-184.

Gillet R. (1986). *Traité de gestion des déchets solides et son application aux pays en voie de développement. Vol. 2: les traitements industriels des ordures ménagères et des déchets assimilés. Organisation et gestion d'un service*, 538p.

Goldsteyn T.E.J., King R.K., Burchak J., Gannon V.P.J. (1991). Sensitive and Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Ground Beef with the Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, p. 2576-2580.

Gtari M. (2003). Occurrence et phylogénie de nouvelles souches de *Frankia* endémiques à partir du sol tunisien. Thèse Doctorat en Sciences Biologiques, Option Microbiologie. Faculté des Sciences de Tunis, 140p.

Holben W.E., Jansson J.K., Chelm K., Tiedje J.M. (1994). DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the soil Bacterial Community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, p. 703-711.

Howeler M., Ghiorse W.C., Walker L.P. (2003). A Quantitative Analysis of DNA Extraction and Purification from Compost. *J. Microbiol. Methods* 54, p. 37-45.

Kuske C.R., Bantou K.L., Adorada D.L., Stark P.C., Hill K.K., Jackson P.J. (1998). Small Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of Microbial Cells and Spores in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, p. 2463-2472.

Jacobsen C.S., Rasmussen O.F. (1992). Development and Application of a New Method to Extract DNA from Soil Based on Separation of Bacteria from Soil with Cation – Exchange Resin. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, p. 2458-2462.

La Montagne M.G., Michel F.C. Jr, Holden P.A., Reddy C.A. (2002). Evaluation of Extraction and Purification Methods for Obtaining PCR-Amplifiable DNA from Compost for Microbial Community Analysis. *J. Microbiol. Methods* 49, p. 255-264.

Lee S.Y., Bollinger J., Bezdicsek D., Ogram A. (1996). Estimation of the Abundance of Uncultured Soil Bacterial Strain by a Competitive Quantitative PCR Method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, p. 3787-3793.

Leff L.G., Dana J.R., McArthur J.V., Shimkets L.J. (1995). Comparison of Methods of DNA Extraction from Stream Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, p. 1141-1143.

Liesack W., Stackebrandt E. (1992). Occurrence of Novel Groups of the Domain Bacteria as Revealed by Analysis of Genetic Material Isolated from an Australian Terrestrial Environment. *J. Bacteriol.* 174, p. 5072-5078.

Piccard C., Ponsonnet C., Paget E., Nesme Y., Simonet P. (1992). Detection and Enumeration of Bacteria in Soil by Direct DNA Extraction and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, p. 2717-2722.

Rouvier C., Prin Y., Redell P., Normand P., Simonet P. (1996). Genetic Diversity among Frankia Strains Nodulating Members of the Family Casuarinaceae in Australia Revealed by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis with Crushed Root Nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, p. 979-985.

Steffan R.J., Atlas R.M. (1988). DNA Amplification to Enhance Detection of Genetically Engineered Bacteria in Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, p. 2185-2191.

Tebbe C.C., Vahjen W. (1993). Interference of Humic Acids and DNA Extracted directly from Soils in Detection and Transformation of Recombinant DNA from Bacteria and Yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, p. 2657-2665.

Tsai Y.L., Olsen B.J. (1991). Rapid Method for Direct Extraction of DNA from Soil and Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, p. 1070-1074.

Tsai Y.L., Olsen B.J. (1992). Rapid Method for Separation of DNA from Humic Substances in Sediments for PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, p. 2292-2295.

Torsvik V., Goksoyr J., Daae F.L. (1990). High Diversity in DNA of Soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, p. 782-787.

Wheeler A.E., Oerther D.B., Larsen N., Stahl D.A., Raskin L. (1996). The Oligonucleotide Probe Database. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, p. 3557-3559

Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M. (1996). DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, p. 316-322.