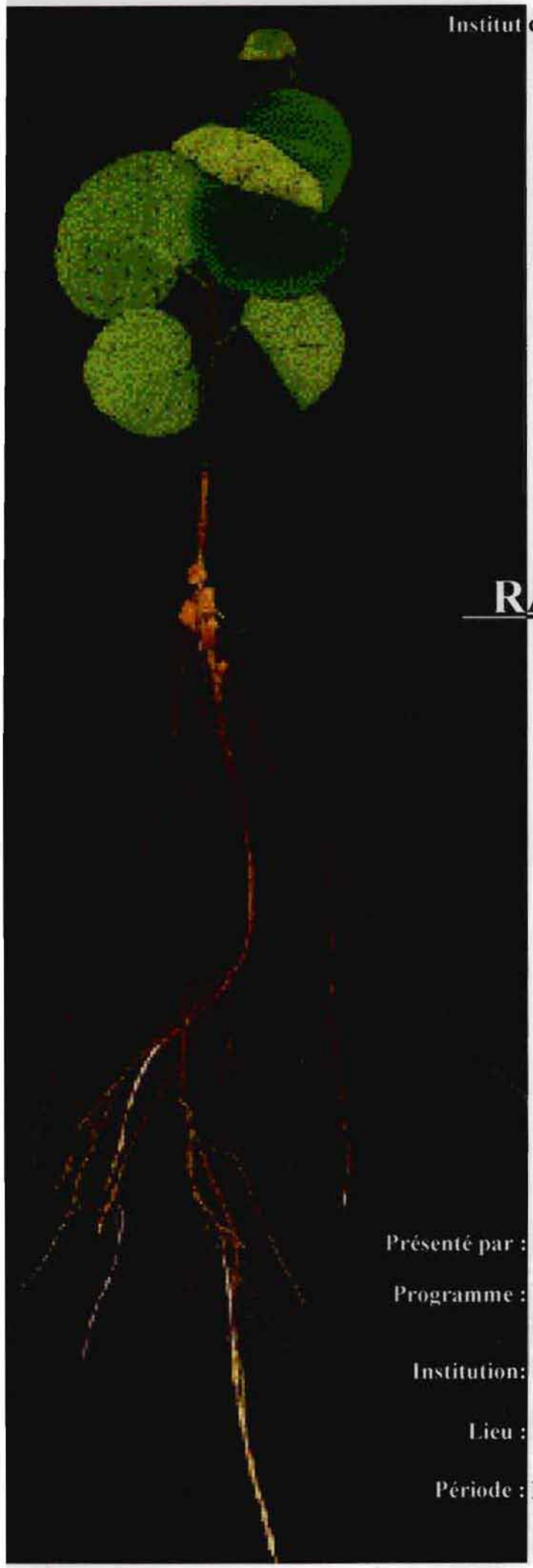
Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D.)
209 - 213, rue La Fayette 75480 - Paris Cedex
10, France



RAPPORT DE STAGE

Séjour scientifique haut niveau

Présenté par : **El. Samba Ndao Sylla**

Programme : **Diversité microbienne et Fixation Biologique de l'Azote**

Institution: **U.C.A.D., Dpt. B.V. Dakar**

Lieu : **LSTM, CIRAD - IRD, Montpellier**

Période : **Du 15 septembre au 15 décembre 1998**

Remerciements

Ce travail a été possible grâce au soutien financier de l'I.R.D. (ex. ORSTOM).

Je remercie Monsieur Bernard Dreyfus, Directeur du L.S.T.M. pour la confiance qu'il m'a accordé en m'accueillant dans son Laboratoire.

Monsieur Eric Giraud et Monsieur Yves Prin ont suivi ce travail avec intérêt et disponibilité.

Mes remerciements vont aux chercheurs, techniciens et stagiaires du LSTM pour leur sympathie et pour m'avoir assuré un cadre de travail où réflexions, opinions et requêtes ne sont jamais restées lettre morte.

J'exprime toute ma gratitude au personnel des bibliothèques de l'IRD, du CIRAD (centre de Lavalette et centre de Baillarguet) et du CNRS / CEFE.

Présentation du laboratoire d'accueil

Le laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes (LSTM) est un laboratoire commun, fruit d'une collaboration entre organismes de recherche et d'enseignement (Cirad, I.R.D., Inra et Ensa-M), dans un domaine prioritaire pour l'environnement.

Le LSTM développe des recherches fondamentales et appliquées sur les microorganismes symbiotiques et leurs plantes hôtes. Deux axes de recherche y sont privilégiés : la caractérisation et l'utilisation de la diversité des symbioses tropicales et méditerranéennes, et la restauration des sols dégradés.

Les équipements utilisés sont ceux de la microbiologie, de la cytologie, de la biochimie et de la biologie moléculaire.

Actuellement, trois mille micro-organismes sont conservés au LSTM. Les souches de la collection sont caractérisées au laboratoire et utilisées sur le terrain comme inoculum pour des plantations d'arbres.

I - INTRODUCTION

Notre stage au Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes a duré trois mois, du 15 septembre au 15 décembre 1998. Le sujet que nous avons abordé a porté essentiellement sur la "**caractérisation des rhizobiums et l'ontogenèse des nodules chez *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*.**" Il s'intègre dans le programme global ayant pour thème "**l'étude de la diversité microbienne et la fixation biologique de l'azote**" qui est développé au LSTM.

Contexte scientifique

Pterocarpus erinaceus et *Pterocarpus lucens* sont deux arbres qui poussent naturellement dans les sols pauvres des régions tropicales arides et semi-arides. Ils font partie des espèces de la famille des Légumineuses qui s'associent avec des rhizobiums logés dans des nodules au niveau de leurs racines. Cette propriété leur confère la capacité à fixer l'azote atmosphérique contribuant ainsi à l'économie d'azote du sol. Une meilleure connaissance des partenaires symbiotiques et du fonctionnement de la symbiose permettrait la mise en place de systèmes fixateurs efficaces et durables. Dans ce cadre, les études initiées à l'Université Cheikh Anta Diop en collaboration avec le Laboratoire de Microbiologie de l'IRD, Dakar ont permis:

-de disposer d'une collection 70 souches de rhizobium isolées de ces deux arbres à différents endroits de leur aire naturelle de répartition au Sénégal (Sylla et *al.* 1996);

-de révéler une diversité phénotypique chez les rhizobiums isolés des deux arbres (Sylla et *al.* 1997a);

-de sélectionner des souches de rhizobiums efficientes pouvant être proposées pour le développement (Sylla *et al.* 1997b);

-et de déterminer le potentiel fixateur d'azote de la symbiose (Sylla *et al.* 1998a).

Objectifs spécifiques

Le but de cette présente étude a été d'approfondir la caractérisation des rhizobiums en utilisant des techniques génotypiques et d'étudier les modalités d'infection de la plante hôte par les rhizobiums ainsi que l'organogenèse des nodules.

II - MATÉRIEL ET MÉTHODE

II.1 - Caractérisation génotypique des rhizobiums

La caractérisation des rhizobiums a été effectuée suivant deux approches fondamentales que sont : (1) l'analyse du polymorphisme des fragments de restriction du 16S rDNA (PCR - RFLP) et (2) le séquençage partiel du 16S rDNA.

II.1.1. - Matériel biologique

31 souches de rhizobium ont été utilisées. Ce sont des souches représentatives des différents groupes définis sur la base des études phénotypiques (Sylla *et al.* 1997a).

II.1.2. - Extraction d'ADN des rhizobiums

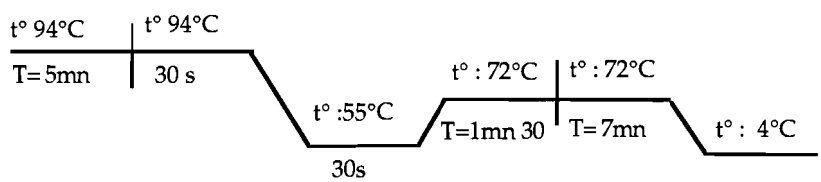
L'ADN génomique des souches a été obtenu par extraction au phénol chloroforme et traitement RNase, à partir de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance dans du YM (Vincent 1970).

II.1.3. - PCR-RFLP

La réaction **PCR** permet la copie exponentielle de segments 16S d'ADN matrice. Elle s'effectue en présence d'une enzyme polymérase (la Taq polymérase), de dNTPS et de 2 fragments d'ADN de 20 à 30 mers tenant lieu d'amorce ou *primer* à l'activité enzymatique. Les oligonucléotides utilisés comme amorces sont la FGPS 6 (5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3') et la FGPS 1509 (5'-AAGGAGGGGATCCAGCCGCA-3').

Les étapes successives de la réaction d'amplification du fragment 16S (dénaturation de l'ADN, hybridation des amorces, extension) sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur de type Perkin Elmer 2400.

Le profil PCR appliqué est le suivant:



L'amplification des fragments de 16S d'ADN a été mise en évidence par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Sigma type II). Un marqueur de poids

moléculaire (Smart Ladder) sert de témoins. En présence de bromure d'éthidium, les bandes 16 S sont révélées sous lumière UV et photographiées.

L'analyse électrophorétique du polymorphisme des fragments de restriction (**RFLP**) d'ADN 16 S a été faite (1) par digestion des produits de PCR en utilisant des enzymes de restriction et (2) par la mise en évidence des profils de restriction des fragments digérés en utilisant l'électrophorèse sur gel d'agarose 3% (Sigma type II) à 75 Volts pendant 3 heures. Un marqueur de poids moléculaire (100pb) sert de contrôle. Les enzymes de restriction utilisées sont M*sp*I, H*aeIII* et S*au* 96. Ce sont des enzymes reconnaissant des sites à 4 bases. Les sites de restriction de ces enzymes sont respectivement: GG*CC; C*CGG; G*AnTC; G*GnCC.

En présence de bromure d'ethidium, les profils de 16S digérés sont révélés sous lumière UV et photographiés.

II.1.4. - Séquençage du 16S rDNA

Le **séquençage** du 16S rRNA (rDNA) a été faite suivant la méthode de Sanger (1977). Elle est également dite méthode des terminateurs en chaîne. L'extraction et la purification du 16S rRNA a été faite suivant le protocole utilisant le kit QIAquick Gel Extraction (QIAquick Spin Handbook, 07/97). Le séquenceur utilisé est le modèle ABI 377 A DNA (Perkin Elmer Co.).

Les fragments de 16S rRNA séquençés sont ceux de 8 souches de rhizobiums représentatives des différents groupes définis sur la base des études phénotypiques (Sylla 1996). Ces souches de rhizobiums sont les suivantes : ORS 199, ORS 203, ORS 206, ORS 207, ORS 214, ORS 215, ORS 217 et ORS 230.

Les séquences obtenues ont été alignées en utilisant les logiciels G.CG. (GENETICS COMPUTER GROUP, Wisconsin) du serveur Infobiogen. Ces séquences ont été comparées à celles des souches de références disponibles dans la banque de données.

II.2. - Étude de l'infection et ontogénèse des nodules

Des tests d'inoculation ont été effectués chez des jeunes plants de *P. erinaceus* et *P. lucens* cultivés en tube, en condition aseptique. Quarante huit jeunes plants ont été inoculées et dix jeunes plants non inoculés ont servi de témoins. A partir du 15 ième jour après inoculation, les plantes sont régulièrement sacrifiées au rythme de 4 plants par jour. Les coupes histologiques ont été effectuées au niveau des racines des plantes. L'étude structurale des nodules a

été faite en utilisant des techniques d'histologie classique et de microscopie et suivant le protocole ci aprés :

1) coupe à main levée;

2) décoloration à l'acide lactique 90% pendant au moins 2 heures (T° ambiante);

3) coloration au bleu de méthylène à 0,01% pendant 30 minutes;

Les observations ont été faites au microscope photonique après rinçage à l'eau.

III - RÉSULTATS

III.1 - Caractérisation génotypique des rhizobiums

III.1.1 - Extraction d'ADN

Des extraits d'ADN génomique ont été obtenus pour 31 souches de rhizobium de *P. erinaceus* et *P. lucens*. Ces extraits sont disponibles à - 20°c.

III.1.2 - PCR - RFLP

Des copies de fragments d'ADN16S amplifiés ont été obtenus par PCR pour les 31 souches. L'électrophorèse sur gel d'agarose a permis la mise en évidence des bandes 16S. Les données (figure 1) montrent que pour toutes les souches utilisées, les bandes 16S ont le même poids moléculaire. Ceci conforte l'état de pureté l'ADN génomique extrait.

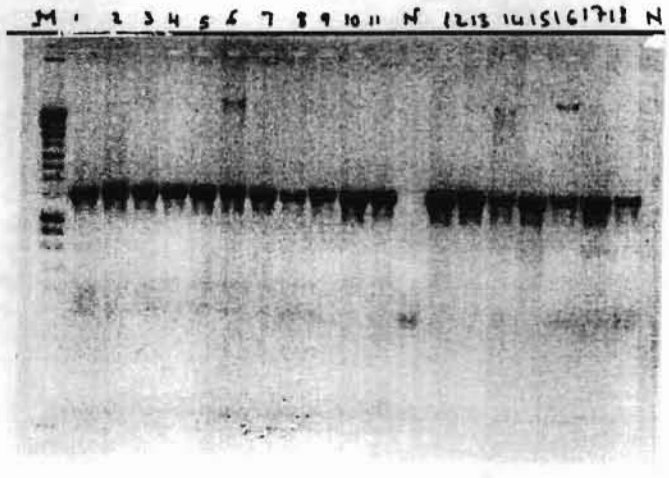


Figure 1 : Gel d'électrophorèse montrant l'amplification des fragments 16S rDNA de souches de rhizobiums isolées de *P. erinaceus* et de *P. lucens* au Sénégal. M (100 PB DNA); N (témoins négatif).

L'analyse des profils RFLP de l'ADN 16S des souches de rhizobiums utilisées (figure 2 et tableau 1) montre : (1) une homogénéité des profils de restriction des souches de *Bradyrhizobium* obtenus après digestion avec l'enzyme *MspI*. Ces souches se distinguent en trois sous - groupes avec l'enzyme *HaeIII*; (2) une hétérogénéité des profils de restriction des souches de *Rhizobium* obtenus avec les deux enzymes, permettant de définir 3 sous - groupes de souches.

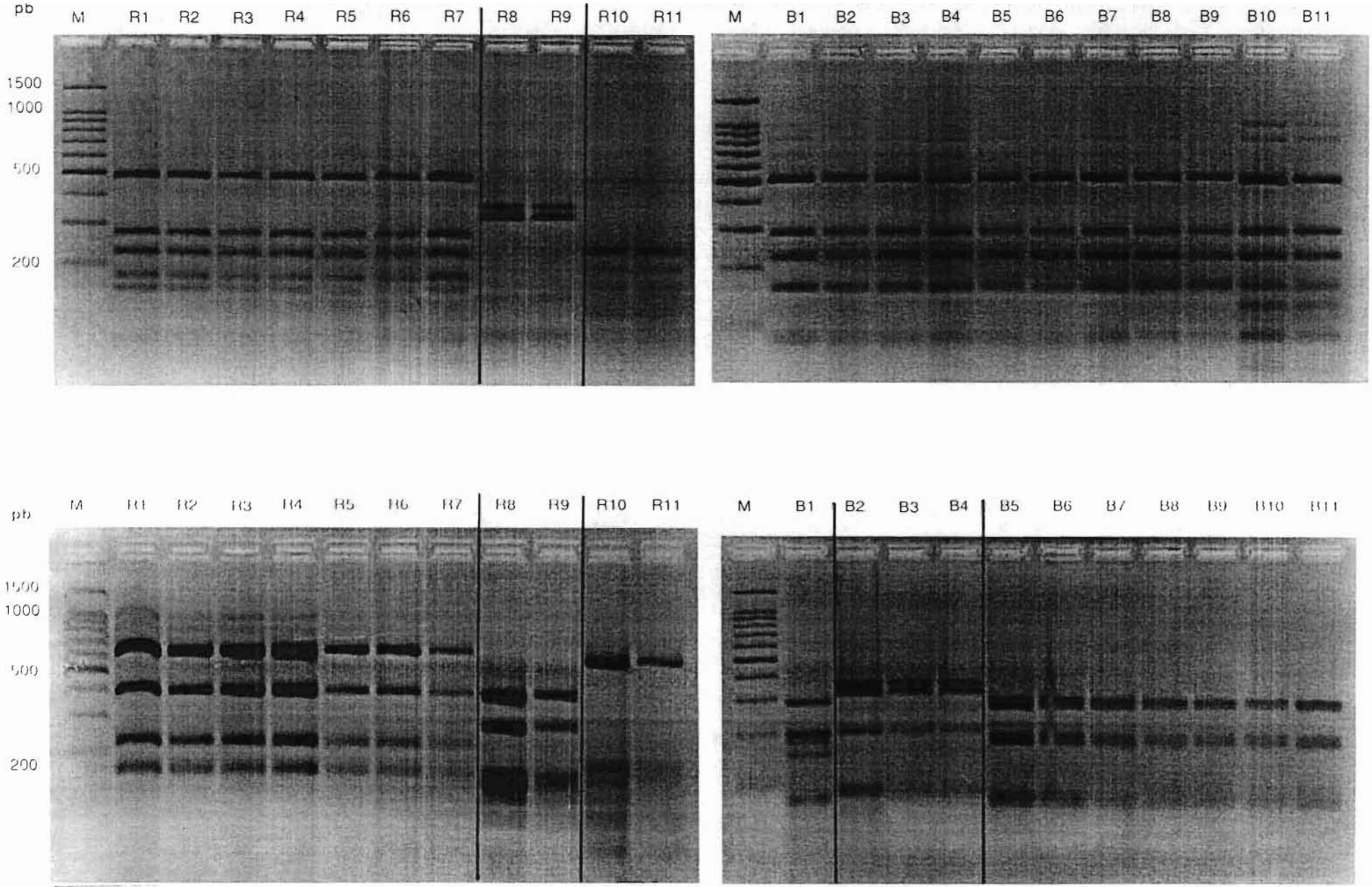


FIG. : 2

Profils de restriction de souches de *Rhizobium* (R) et de *Bradyrhizobium* (B) obtenus par PCR -RFLP de l'IGS 16S-23S de l'ADNr, utilisant deux enzymes de restriction *MSP*I et *Hae*III

Tableau 1 : Comparaison des groupes définis sur la base des profils de restriction obtenus par PCR - RFLP du 16S rDNA, utilisant deux enzymes de restriction, *MspI* et *HaeIII*.

Souches	Type de croissance	Enzymes de restriction	
		MspI	*HaeIII*
ORS 196		A	A
197		A	A
198		A	A
199		A	A
201		A	B
203		A	B
204	*Bradyrhizobium*	A	B
206	(croissance lente)	A	C
208		A	C
211		A	C
221		A	C
222		A	C
226		A	C
228		A	C
256		A	C
ORS 217		B	B
227		B	B
243		B	B
214		C	C
233		C	C
242		C	C
246		C	C
247		C	C
248	*Rhizobium*	C	C
230	(croissance rapide)	D	D
231		D	D
240		D	D
241		D	D
235		sep	sep
215		sep	sep
239		sep	sep

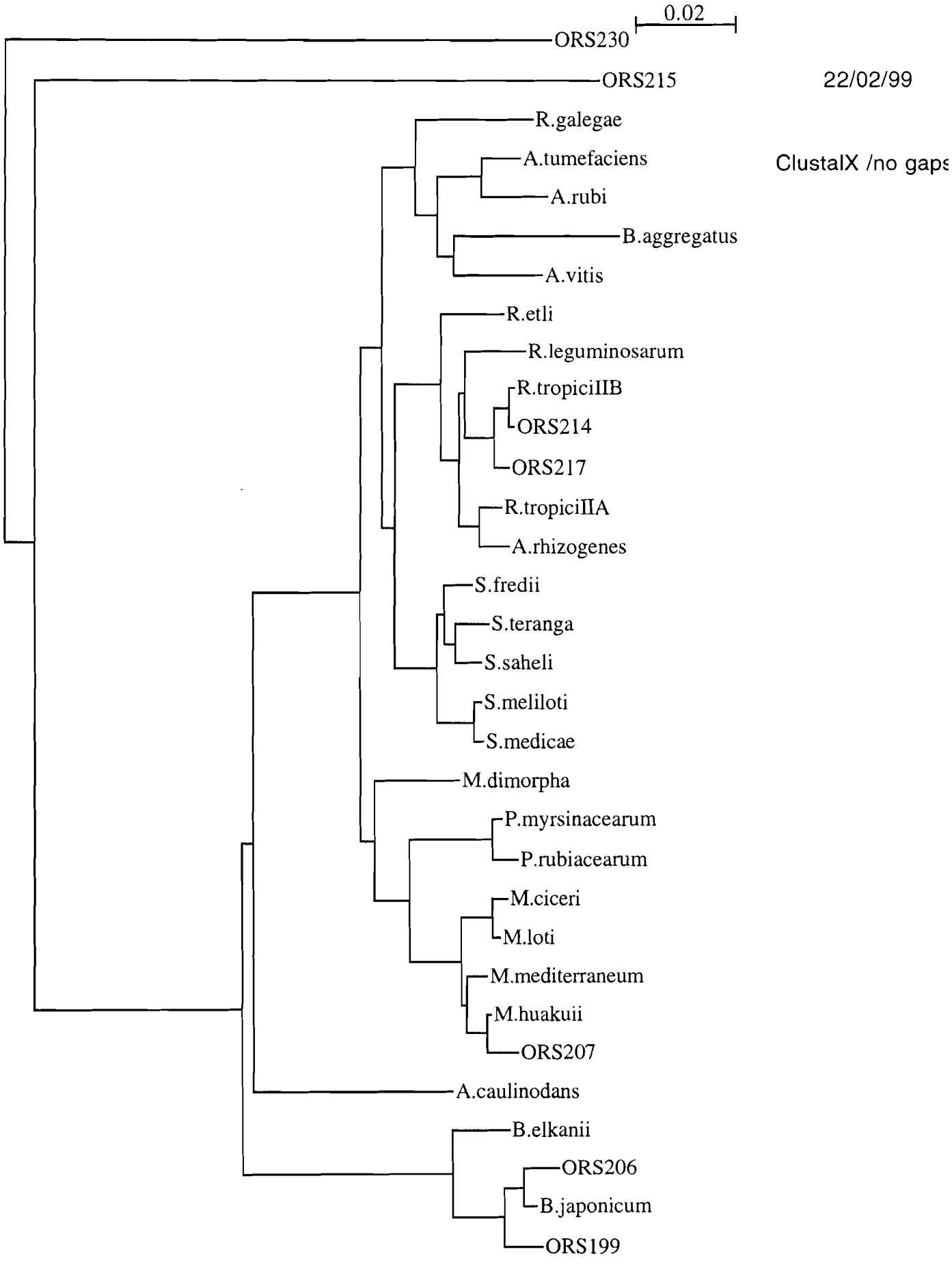


Figure 3 : Dendrogramme montrant la phylogénie des souches de rhizobiums, obtenue par séquençage partiel du 16S rDNA. Les souches isolées de *Pterocarpus erinaceus* et de *P. lucens* sont codées ORS.

III.1.3 - Le séquençage partiel du 16S rDNA.

Des séquences partielles ont été obtenues (tableaux 2 et 3). Ces séquences concernent les 400 premières paires de base du 16S rDNA des souches de rhizobium choisies. L'alignement des séquences par rapport à celles des souches de références (fig. 3) montre une grande différence parmi les souches étudiées. Les souches ORS 214 et ORS 217 groupent avec *Rhizobium tropici* IIB; la souche ORS 207 s'identifie à l'espèce *Mesorhizobium huakii* et les souches ORS 199 et ORS 206 groupent avec la souche type de *B. japonicum.*

Tableau 2 : Analyse de la séquence des 400 premières paires de bases du 16S rDNA d'une souche "type croissance rapide" (ORS 214) isolée de *P. erinaceus* et de *P. lucens* au Sénégal.

GGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGT
AACGCGTGGGAATCTACCTTTTGCTACGGAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATA
CCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGCAAGAGATGAGCCCGCGTTGGAT
TAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAG
AGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGT
GATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCC
GGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCACAGCCGCGGTAAT

Tableau 3 : Analyse de la séquence des 400 premières paires de bases du 16S rDNA d'une souche "type croissance lente" (ORS 199), isolée de *P. erinaceus* et de *P. lucens* au Sénégal.

TAACACATGCAAGTCGAGCGGGCGTAGCAATACGTCAGCGGCAGACGGGTGAGTA
ACGCGTGGGAACGTACCTTTTGGTTCGGAACAACACAGGGAAACTTGTGCTAATAC
CGGATAAGCCCTTACGGGGAAAGATTTATCGCCGAAAGATCGGCCCGCGTCTGATT
AGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGA
GGATGATCAGCCACATTGGGACTGACACGGCCAAACTCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCACCATGCCGCGTGAGTGATG

III.2 - Étude de l'infection et ontogénèse des nodules

L'histologie des nodules n'a pas permis de révéler la mise en place des cordons d'infection des bactéries sur la racine. De même les séquences de coupes et d'observation n'ont pas permis de mettre en évidence les différentes étapes de la formation des nodules.

IV - DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

La caractérisation génotypique confirme la diversité phénotypique des rhizobiums isolés de *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*. Ces rhizobiums comportent des souches à croissance lente qui s'identifie au genre *Bradyrhizobium* et des souches à croissance rapide qui s'identifient aux genres *Mesorhizobium* et *Rhizobium*. Les *Bradyrhizobia* forment un groupe homogène. Le séquençage de l'ADN 16S des 400 premières paires de base montre que ces souches s'identifient avec la souche type de *Bradyrhizobium japonicum* isolée d'un sol hydromorphe au Japon. Les souches à croissance rapide, sont proches des genres *Mesorhizobium* et *Rhizobium* sont hétérogènes. La comparaison des séquences des 400 premières paires de bases des fragments 16S de ces souches montre que les souches à croissance rapide isolées de *Pterocarpus* sont hétérogènes. Elles s'identifient aux espèces *Rhizobium leguminosarum* et *Rhizobium tropici*. Ce résultat devra être étayé par l'utilissation d'un plus grand nombre d'enzymes de restriction, par la comparaison de séquences entières du 16S rDNA et par l'hybridation ADN/ADN.

L'histologie des nodules n'a pas permis de révéler la mise en place des cordons d'infection. Cependant des stades présidant l'infection et l'apparition des nodules sont observés. Notons en particulier la déformation des poils absorbants en structure en bouteille et les ébauches de nodule circonscrites à l'aisselle de ces poils absorbants et seulement au niveau de la racine principale. Cette étude histologique mérite d'être élucidée par des techniques de coupe beaucoup plus fines (microtomie) et par des séquences d'observation beaucoup lus rapprochées.

V - VALORISATION

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une communication présentée au VIIIième congré de l'AAFBA (Association Africaine pour la Fixation Biologique de l'Azote), Novembre - Décembre 1998 à Capetown.

L'ensemble de ce travail entre dans le cadre de mon programme de thèse de Doctorat d'état à l'UCAD de Dakar.

VI - AUTRES ACTIVITÉS

L'occasion de ce séjour m'a permis : (1) de faire la mise au point sur l'état d'avancement de mes travaux avec mon Directeur de Thèse et d'en dresser les perspectives, (2) de discuter de mes travaux de recherche avec d'autres chercheurs qui travaillent dans le même domaine, (3) de consulter les banques

de données disponibles sur la Foresterie, l'Agroforesterie, la biologie moléculaire et la microbiologie des sols en zone tropicale.

Références

Sylla S. N. (1996). Contribution à l'étude de la symbiose fixatrice d'azote chez *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*. Thèse de Doctorat de troisième cycle, Université Cheikh Anta Diop, Dakar.

Sylla S. N., Ndoye I, Ba A. T. et Dreyfus B. (1997a). Spécificité de la symbiose chez *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*. *Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire* T. 49, Sér. A, n° 1, pp. 17-36.

Sylla S. N., Ndoye I, Ba A. T. et Dreyfus B. (1997b). Potentiel fixateur d'azote de la symbiose Rhizobium-*Pterocarpus*. *Annales de la Faculté des Sciences et Techniques UCAD. B2* (1) pp. 11-19

Sylla S. N., Ndoye I., Ba A. T. Gueye M. et Dreyfus B. (1998a). Assessment of Nitrogen fixation in *Pterocarpus erinaceus* and *P. lucens* using the ^{15}N labelling methods. *Arid Soil Research and Rehabilitation* vol. 12 (3).

Sylla S. N., I. Ndoye, P. de Lajudie, A. T. Ba, M. Neyra and Dreyfus B. (1998). Phenotypic diversity of rhizobia isolated from *Pterocarpus erinaceus* (Poir.) and *Pterocarpus lucens* (Lepr.) in Senegal. Eighth congress of the African Association for Biological Nitrogen Fixation; "Biological nitrogen fixation in Africa: linking process to progress". 23 - 27 November, Capetown.