

159

2 PR

58

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes

L.S.T.M. Laboratoire commun IRD / CIRAD / INRA-ENSAEM
Baillarguet, BP 5035
34032 MONTEPELLIER Cedex 1 - FRANCE
Tel : (33)-4-67-59-38-82
ou (33)-4-67-59-37-86
Fax : (33)-4-67-59-37-32

Rapport de stage

du 5 Octobre 1998 au 16 Décembre 1998

Dr. Amadou M. Bâ

ISRA/DRPF

Typage moléculaire par PCR inter-ERIC et REP de *Pseudomonas*
fluorescents de la mycorhizosphère de *Zizyphus mauritiana* Lam.

0051574

IRD / CIRAD
DATE : 26/02/2000
N° : 012796
COTE CUMULÉE D RAP. : 504...BAA

Fonds Documentaire IRD



010021682

Fonds Documentaire IRD

Cote : B * 21682 Ex : unique

1. Remerciements

Ce stage a été effectué au Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM, laboratoire commun IRD / CIRAD / INRA-ENSAM) situé sur le campus du CIRAD de Baillarguet à Montpellier.

Je remercie chaleureusement le Dr. Bernard Dreyfus, directeur du LSTM, de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Mes remerciements vont également à l'IRD qui a bien voulu prendre en charge ce stage dans le cadre de son programme d'accueil de courte durée.

1. Introduction

Les bactéries appartenant au groupe des Pseudomonas fluorescents sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol (Digat, 1994).

Ces bactéries peuvent agir favorablement sur la plante en modifiant son environnement immédiat par des effets d'antibiose et/ou en stimulant directement sa croissance par des effets bénéfiques ou PGPR (pour "Plant Growth Promoting Rhizobacteria"). En effet, ces bactéries sont d'excellents compétiteurs vis-à-vis de la microflore fongique et bactérienne du sol par leur temps de génération in situ relativement court, leur capacité à chélater les ions ferriques et à produire des substances antibiotiques. Elles peuvent également agir sur le métabolisme de la plante par effet hormonal et/ou par solubilisation de formes de phosphore insolubles, rendant ainsi le phosphore biodisponible. Il est également reconnu que des bactéries de la mycorrhizosphère, encore appelées bactéries auxiliaires de la mycorhization, stimulent sélectivement l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne (Garbaye, 1994).

Lors du stage effectué au LSTM de Montpellier en 1997, nous avons entrepris la caractérisation moléculaire par PCR inter-ERIC (pour Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) de Pseudomonas fluorescents de la mycorrhizosphère du jujubier. Les profils ERIC obtenus indiquent qu'il existe une diversité au sein des Pseudomonas qui diffère suivant le lieu géographique et le compartiment mycorrhizosphérique d'isolement. Cette technique nous a également permis de grouper des isolats bactériens identiques (Bâ, 1997). Nous nous proposons de poursuivre ce travail de caractérisation moléculaire de la collection de P. fluorescents en utilisant également d'autres marqueurs moléculaires REP (pour Repetitive Extragenic Palindromic) afin de mener par la suite des études sur la dynamique des populations microbiennes dans les sols.

2. Principe de la PCR

La technique de réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (pour Polymerisation Chain Reaction) permet d'amplifier en un nombre élevé de copies une séquence particulière d'ADN (Figure 1). La polymérisation se réalise dans un mélange réactionnel contenant de faibles quantités d'ADN possédant la séquence à amplifier, les deux amorces nucléotidiques complémentaires des séquences qui encadrent la cible à amplifier, l'ADN polymérase et un mélange des quatre dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP). Elle débute par une étape de dénaturation thermique de l'ADN à amplifier. Des séquences oligonucléotidiques complémentaires ou amorces sont alors hybridées aux extrémités 3' des deux brins du fragment d'ADN matrice. L'allongement des amorces dans le sens 5'--> 3' est ensuite assurée par l'ADN polymérase Taq. Les nouvelles molécules d'ADN ainsi formées sont dénaturées et un nouveau cycle peut commencer, la réaction se répétant ainsi jusqu'à plusieurs dizaines de fois.

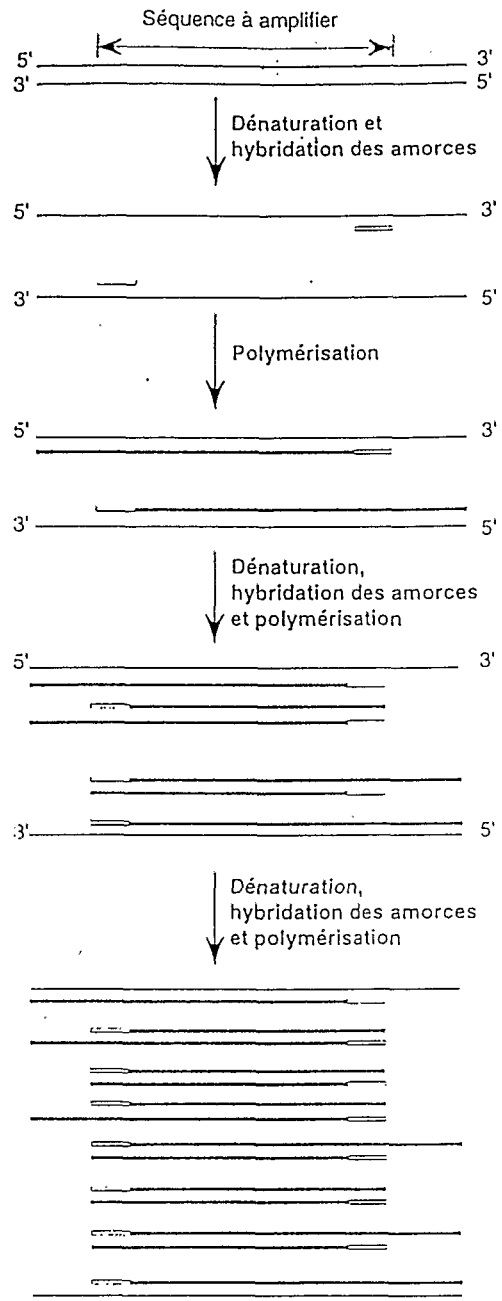


Figure 1: Amplification d'un fragment d'ADN par PCR

3. La PCR inter-ERIC et REP

La PCR inter-ERIC et REP est une approche qui consiste à multiplier, par la réaction de polymérisation en chaîne, des régions d'ADN génomique bactérien situées entre des séquences de types ERIC et REP. Ces séquences sont hautement répétées et conservées dans le génome de la plupart des genres bactériens. Elles sont donc utilisées comme amorces pour l'amplification par PCR de régions de l'ADN génomique bactérien (de Bruijn, 1992). L'approche PCR inter-ERIC et REP permet (1) de rendre compte de la variabilité de l'ensemble du génome bactérien (Versalovic *et al.*, 1991) (2) d'analyser le génome des bactéries appartenant à des groupes phylogénétiquement proches ou éloignés (3) de rendre compte de la dispersion des séquences inter-ERIC et REP caractéristique de chaque souche bactérienne (Schneider et de Bruijn, 1996) (4) de faire une analyse plus fine de la diversité génotypique des *Pseudomonas* fluorescents que la technique PCR-RFLP de l'ADNr 16S (Frey-Klett, 1996).

4. Matériels et Méthodes

4.1. Origine des rhizobactéries

Des *Pseudomonas* fluorescents ont été isolés de la mycorhizosphère de deux jujubiers adultes distants de 20 m en plantation à Sokone (centre Ouest du Sénégal) et dans un sol nu hors de la plantation. Au total, 107 isolats bactériens ont été obtenus dont 55 dans la mycorhizosphère du jujubier numéroté 6, 29 dans la mycorhizosphère du jujubier numéroté 5 et 23 sur sol nu.

Au sein de la collection des 107 isolats de *P. fluorescens*, 18 isolats de la mycorhizosphère du jujubiers n°6, 5 isolats de la mycorhizosphère du jujubier n°5 et 3 isolats du sol nu ont été choisis pour la caractérisation par PCR inter-ERIC et REP.

4.2. Protocole

Les *E. fluorescents* sont cultivés sur milieu King B gélosé pendant 48 h à 25 °C (Tableau 2). Elles sont ensuite repiquées dans 5 ml de milieu Luria Bertani liquide (Miller, 1972) et cultivées sous agitation (200 tpm), à 37 °C pendant 24 h. L'ADN génomique est extrait (cf. paragraphe 4.2.1) et des amplifications des séquences d'ADN inter-ERIC et REP sont effectuées dans un volume réactionnel de 25 µl qui comprend 0,5 µl d'ADN génomique. La composition du milieu réactionnel, les conditions et l'analyse de la PCR sont détaillées dans le paragraphe 4.3. Pour chaque amplification un témoin négatif est réalisé avec de l'eau stérile ultrapure. Les produits de l'amplification sont visualisés par la fluorescence du bromure d'éthidium sous lumière UV, après électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% (12 x 14 cm) dans du tampon TBE (Tableau 4), pendant 2 h à 120 V. Le gel est photographié à l'aide d'un appareil Polaroid, sous lumière UV.

4.2.1 Extraction de l'ADN génomique

Cette technique d'extraction d'ADN génomique comprend plusieurs étapes:

1. Culture de bactéries dans 5 ml de milieu LB (Miller, 1972), sous agitation (200 tpm), à 37°C pendant 48 h
2. Centrifugation de la culture pendant 10 mn à 5000 rpm
3. Lavage du culot 1 fois avec 5 ml de tampon Tris EDTA (TE, Tris 10mM pH 8 et EDTA 1mM)
4. Resuspendre le culot dans un tube eppendorf de 2 ml avec 500 µl de tampon TE contenant 1 mg/ml de lysozyme (Bioprobe), vortexer
5. Incubation 30 mn à 37°C
6. Ajouter 30 µl de SDS 10% + 10 µl de protéinase K (Merck) à 20 mg/ml d'eau stérile, vortexer
7. Incubation une nuit à 37°C
8. Ajouter 20 µl de SDS 10% si la lyse est partielle (solution opaque), agiter doucement (plusieurs inversions lentes pendant 5 mn)
9. Ajouter 130 µl de NaCl-5 M, vortexer (obtention d'une émulsion)
10. Incuber 30 mn dans la glace, vortexer (obtention d'une émulsion)

11. Centrifugation 15 mn à 14000 tpm
12. Le surnageant est récupéré dans un tube eppendorf de 2 ml
13. Ajouter 700 μ l de phénol/Sevag, agiter doucement (plusieurs inversions lentes pendant 5 mn) et centrifuger 15 mn à 14000 tpm, à faire 2 fois
14. Le surnageant est récupéré dans un tube eppendorf de 2 ml
15. Ajouter 700 μ l de chloroforme/Sevag, agiter doucement (plusieurs inversions lentes pendant 5 mn) et centrifuger 15 mn à 14000 tpm, à faire 2 fois
16. Reprendre le surnageant dans 70 μ l d'acétate de Na (3 M, pH 5,2) + 1 ml d'isopropanol, agiter doucement (plusieurs inversions lentes pendant 5 mn)

Apparition d'une "méduse"

17. Centrifugation 10 mn à 14000 tpm
18. Sécher le culot d'ADN au SpeedVac pendant 5 à 10 mn
19. Reprendre le culot dans 100 μ l de tampon Tris (10 mM, pH 8) + 2,5 μ l de RNase (Sigma) diluée (4 μ g/ μ l) pendant 2 h à 37°C
20. Ajouter 100 μ l d'acétate de Na + 1 ml d'éthanol absolu, agiter doucement (plusieurs inversions lentes pendant 5 mn)
21. Centrifugation 10 mn à 14000 tpm
22. Reprendre le culot avec 1 ml d'éthanol à 70%
23. Centrifugation 10 mn à 14000 tpm
24. Sécher le culot au SpeedVac pendant 15 à 20 mn
25. Reprendre le culot avec 50 μ l de Tris 10 mM, pH 8
26. Conserver l'ADN au congélateur à -20°C
27. Visualiser l'ADN extrait après électrophorèse sur gel d'agarose 1%

Chloroforme/Sevag: 24 vol de chloroforme + 1 vol d'alcool isoamylique

Phénol/Sevag: 25 ml de Sevag + 25 ml de phénol (prélever la phase inférieure)

4.2.2. Conditions de la PCR inter-ERIC et REP

4.2.2.1. Séquences des amorces utilisées

ERIC 1R: 5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3'

ERIC 2: 5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'

REP 1R: 5' IIIICGICATCIGGG 3'

REP 2: 5' ICGICTTATCIGGCCTAC 3'

I= Inosine

4.2.2.2. Cocktail d'amplification

Produit (concentration finale)	Produit (concentration initiale)	µl par tube d'amplification
Eau ultrapure stérile		11,375
Tampon	10 x	2,5
Tris-HCl (10 mM, pH 9)		
KCl (50 mM)		
Triton X-100 (0,1%)		
MgCl ₂ (1,5 mM)	25 mM	1,5
(Promega)		
dNTP (0,2 mM)	2,5 mM	2
(Promega)		
BSA (0,17 mg)	1,7 mg ml ⁻¹	2,5
(Sigma)		
DMSO (10%)		2,5
ERIC 1R ou REP 1R (0,8 pmol µl ⁻¹)	20 pmol µl ⁻¹	1
(Eurogentec)		

ERIC 2 ou REP 2 (0,8 pmol μl^{-1}) (Eurogentec)	20 pmol μl^{-1}	1
ADN polymerase Taq (0,625 U pour 25 μl) (Promega)	5 U μl^{-1}	0,125
ADN génomique		0,5
Volume réactionnel		25

4.2.2.3. Cycle d'amplification

Précycle	7 mn	94°C
30 cycles	1 mn	94°C
	1 mn	52°C
	8 mn	65°C
Elongation terminale	16 mn	65°C
Fin		4°C

Tableau 2: Milieu Luria-Bertani. (Miller, 1972)

Extrait de levure	5 g
Tryptone (ou peptone)	10 g
NaCl	10 g
H ₂ O	1 l
pH	7

Tableau 3: Milieu King B (King *et al.*, 1954)

Proteose peptone	20 g
Glycérol	10 ml
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	1,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,5 g
H ₂ O	1 l
Agar	20 g

Tableau 4: Tampon TBE 10 x (Tris-borate)

Tris base (Sigma)	108 g
Acide borique (Sigma)	55 g
EDTA 0,5 M pH 8	40 ml
H ₂ O	960 ml
Autoclaver 120°C/20 mn	

Tableau 5: Préparation du gel d'agarose 1,5%

Agarose (Eurogentec)	1,87 g
Tampon TBE 1x	125 ml
Bromure d'éthidium (Bioprobe)	6,25 µl

5. Résultats et discussion

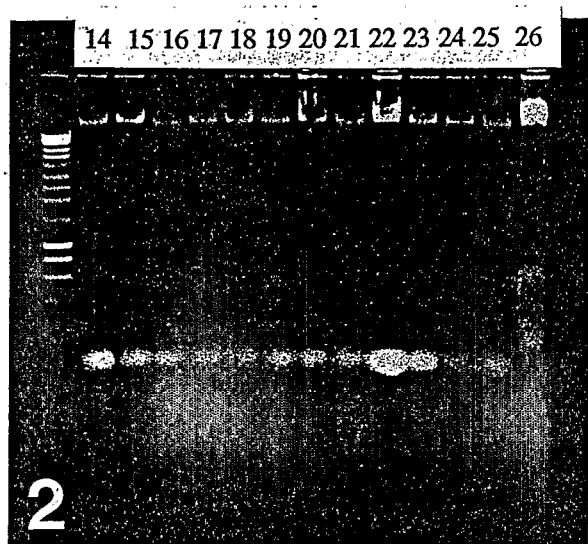
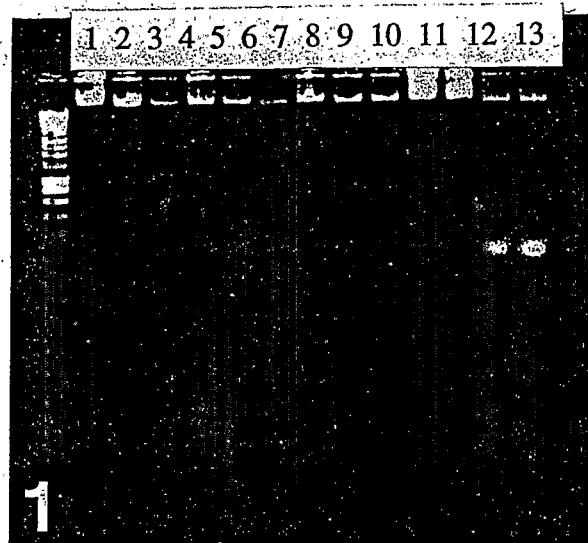
Nous avons utilisé la technique de PCR inter-ERIC et REP pour caractériser 26 isolats de *P. fluorescens* choisis parmi 107 isolats de la mycorrhizosphère de deux jujubiers adultes (distants d'environ 20 m) en plantation et dans du sol nu hors de la plantation. Ces souches se répartissent comme suit: 5 proviennent du jujubier n°5 (S5F7, S5F7, S5F29, S5F27 et S5F16), 18 proviennent du jujubier n°6 (6F51, 6F60, 6F30, 6F40, 6F54, 6F55, 6F56, 6F41, 6F42, 6F44, 6F45, 6F46, 6F47, 6F49, 6F50, 6F52, 6F53 et 6F43) et 3 proviennent du sol nu (H1, H16 et H21). L'amplification par PCR des séquences inter-ERIC et REP ont été réalisées séparément à partir de l'ADN génomique des bactéries (Photos 1 et 2).

Nous avons, pour chaque profil ERIC obtenu, compté les bandes principales et repéré leur position par rapport aux marqueurs de poids moléculaire connu (Photos 3 et 4). Ceci nous a permis de faire un groupage moléculaire des souches qui présentent des profils ERIC identiques. Nous avons ainsi mis en évidence 10 profils ERIC différents. Le profil I (environ 15 bandes) se retrouve chez les 10 souches 6F54, 6F55, 6F44, 6F45, 6F46, 6F47, 6F48, 6F49, 6F50 et 6F51, le profil II (environ 16 bandes) chez les 4 souches 6F30, 6F43, 6F52 et 6F53, le profil III (environ 14 bandes) chez les 2 souches 6F40 et 6F41, le profil IV (environ 18 bandes) chez la souche 6F56, le profil V (environ 13 bandes) chez la souche 6F42, le profil VI (environ 19 bandes) chez les 2 souches S5F27 et S5F29, le profil VII (environ 18 bandes) chez les 2 souches S5F7 et S5F16, le profil VIII (environ 10 bandes) chez la souche H1, le profil IX (environ 8 bandes) chez la souche H21 et le profil X (environ 17 bandes) chez la souche H16.

Ces différents profils traduisent une diversité au sein des *P. fluorescens*. Il y a cinq profils ERIC différents dans la mycorrhizosphère du jujubier n°6, deux profils ERIC dans la mycorrhizosphère du jujubier n°5 et 3 profils ERIC dans le sol nu. Sur un total de 26 isolats, on a obtenu 10 souches de *Pseudomonas* fluorescents ayant des profils ERIC bien différents. Les souches isolées du jujubier n°5 ont des profils différents des souches isolées de la mycorrhizosphère du jujubier n°6, lesquelles sont différentes de celles que l'on trouve dans le sol nu. Il n'y a donc pas de souches communes aux deux jujubiers adultes et au sol nu.

Nous avons effectué par PCR REP des amplifications de l'ADN génomique des isolats de Pseudomonas fluorescents et avons suivi la même procédure de repérage (nombre et positions des bandes) que pour le polymorphisme ERIC. Les différents profils REP obtenus permettent de faire un groupage des isolats identiques et de confirmer les analyses ERIC. Par exemple, les souches S5F27 et S5F29 présentent les mêmes profils ERIC et REP (Photo 6).

Ce travail de caractérisation sera poursuivi sur la collection de *P. fluorescens* et le groupage moléculaire des différents isolats devrait permettre de construire un arbre phylogénétique des *P. fluorescens* tropicaux. Il serait également intéressant d'établir une relation entre le groupage moléculaire et les caractères phénotypiques des souches (effets sur la croissance des hyphes, solubilisation des phosphates naturels...).



Photos 1 et 2: Exemples de profils d'ADN génomique de 26 isolats de *P. fluorescens* piste 1: souche H1; piste 2: souche H21; piste 3: souche S5F7; piste 4: souche S5F29; piste 5: souche 6F51; piste 6: souche 6F60; piste 7: souche 6F30; piste 8: souche S5F16; piste 9: souche 6F40; piste 10: souche H16; piste 11: souche 6F54; piste 12: souche 6F55; piste 13: souche 6F56; piste 14: souche 6F41; piste 15: souche 6F42; piste 16: souche 6F44; piste 17: souche 6F45; piste 18: souche 6F46; piste 19: souche 6F47; piste 20: souche 6F48; piste 21: souche 6F49; piste 22: souche 6F50; piste 23: souche 6F52; piste 24: souche 6F53; piste 25: souche 6F43; piste 26: souche ORS.278 (*Bradyrhizobium* sp.).

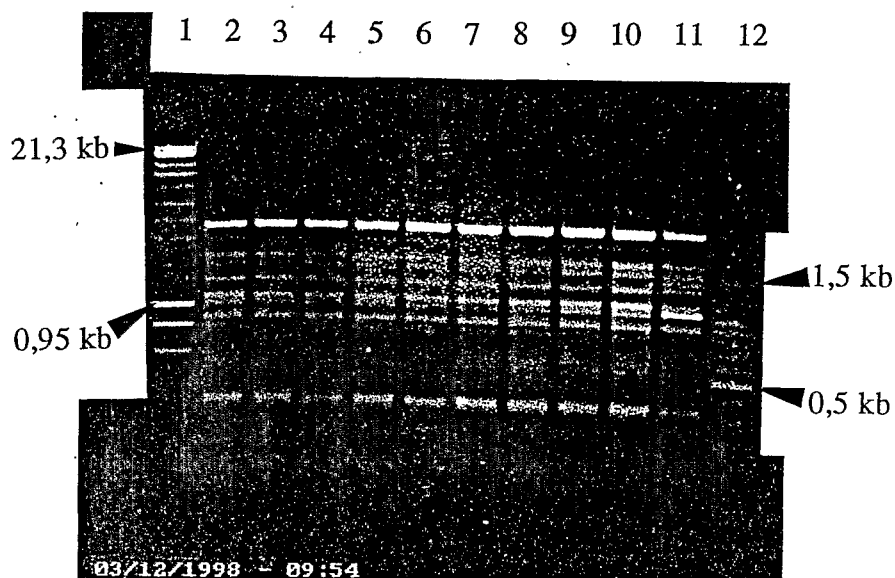


Photo 3: Exemples de profils de PCR inter-ERIC de l'ADN génomique extrait de 10 isolats de *P. fluorescens* de la mycorrhizosphère de *Z. mauritiana*. Les séquences inter-ERIC ont été amplifiées par PCR à l'aide des amorces ERIC 1-R et ERIC 2. Pistes 1 et 12: marqueurs de poids moléculaire; piste 2: 6F54; piste 3: 6F55; piste 4: 6F44; piste 5: 6F45; piste 6: 6F46; piste 7: 6F47; piste 8: 6F48; piste 9: 6F49; piste 10: 6F50; piste 11: 6F52.

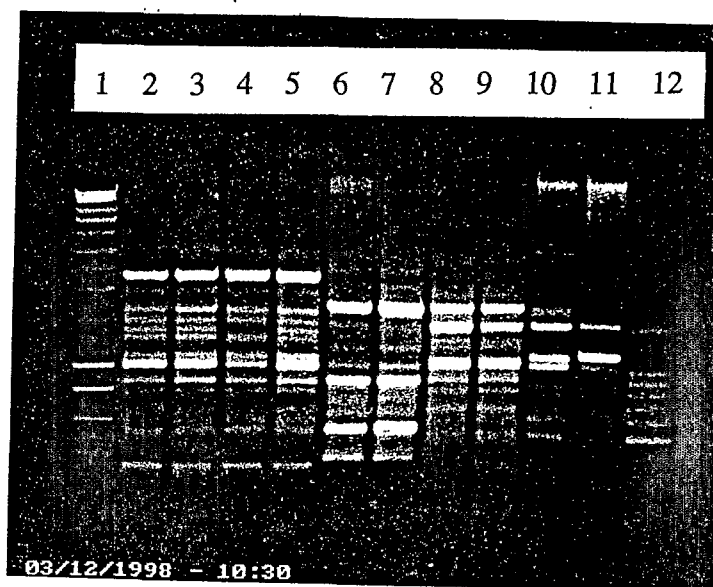


Photo 4: Exemples de profils de PCR inter-ERIC de 10 isolats de *P. fluorescens* de la mycorrhizosphère de *Z. mauritiana*. Les séquences inter-ERIC ont été amplifiées par PCR à l'aide des amorces ERIC 1-R et ERIC 2. Pistes 1 et 12: marqueurs de poids moléculaire; piste 2: 6F53; piste 3: 6F43; piste 4: 6F51; piste 5: 6F30; piste 6: S5F27; piste 7: S5F29; piste 8: S5F16; piste 9: S5F7; piste 10: H1; piste 11: H21.

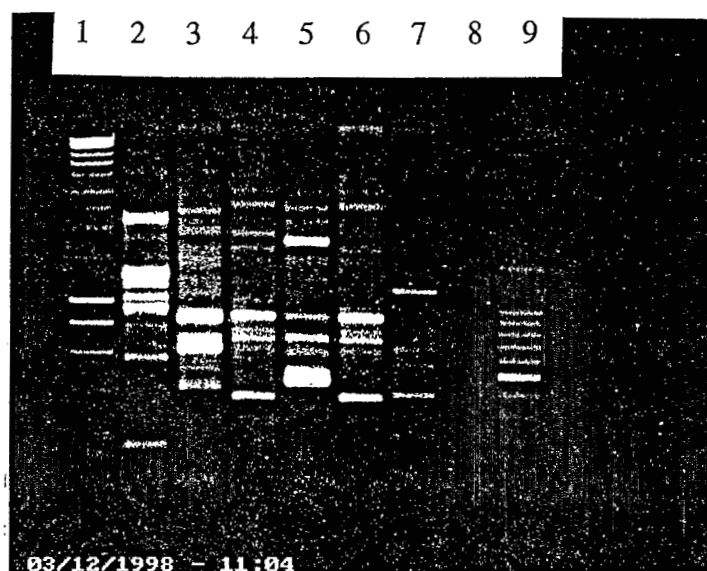


Photo 5: Exemples de profils de PCR inter-ERIC de 5 isolats de *P. fluorescens* de la mycorrhizosphère de *Z. mauritiana*. Les séquences inter-ERIC ont été amplifiées par PCR à l'aide des amorces ERIC 1-R et ERIC 2. Pistes 1 et 9: marqueurs de poids moléculaire; piste 2: 6F60; piste 3: 6F56; piste 4: 6F41; piste 5: 6F42; piste 6: 6F40; piste 7: ORS.278; piste 8: témoin négatif.

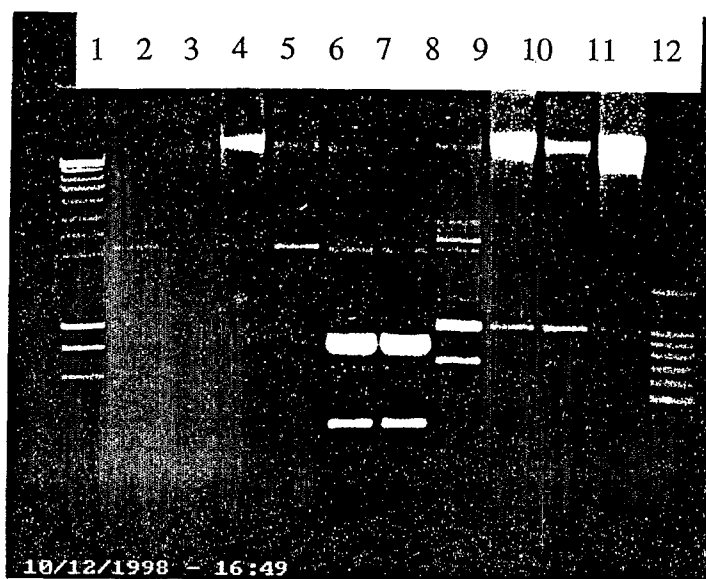


Photo 6: Exemples de profils de PCR REP de 10 isolats de *P. fluorescens* de la mycorrhizosphère de *Zizyphus mauritiana*. Les séquences REP ont été amplifiées par PCR à l'aide des amorces REP1-R et REP 2. Pistes 1 et 12: marqueurs de poids moléculaire; piste 2: 6F53; piste 3: 6F43; piste 4: 6F51; piste 5: 6F30; piste 6: S5F27; piste 7: S5F29; piste 8: S5F16; piste 9: S5F7; piste 10: H1; piste 11: H21.

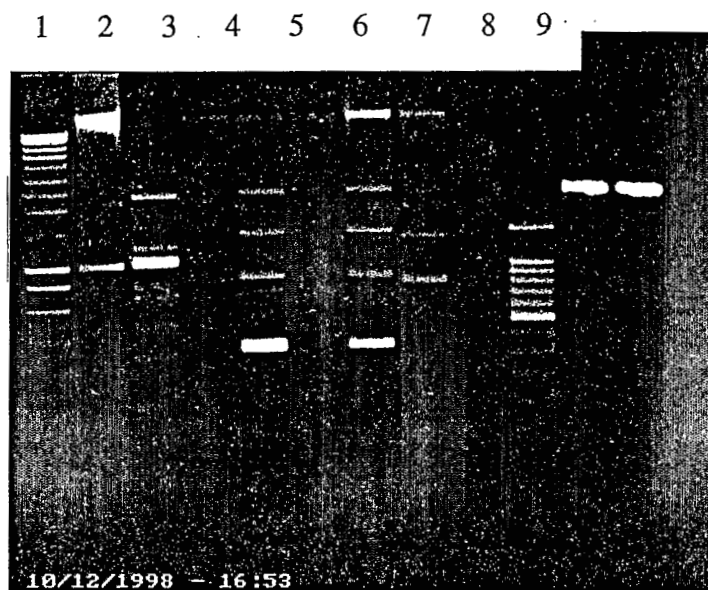


Photo 7: Exemples de profils de PCR REP de 6 isolats de *P. fluorescens* de la mycorrhizosphère de *Zizyphus mauritiana*. Les séquences REP ont été amplifiées par PCR à l'aide des amorces REP1-R et REP 2. Pistes 1 et 9: marqueurs de poids moléculaire; piste 2: 6F60; piste 3: 6F56; piste 4: 6F41; piste 5: 6F42; piste 6: 6F40; piste 7: ORS.278; piste 8: témoin négatif.

6. Références bibliographiques

Bâ, A. M. (1997). I. Caractérisation moléculaire par PCR inter-ERIC de *Pseudomonas* fluorescents associés à la mycorrhizosphère de *Zizyphus mauritiana* et d'*Azelia africana*, II. Ectomycorhization et nodulation in vitro d'*Acacia mangium*. Rapport de stage au LSTM, 28p.

De Bruijn (1992). Use of repetitive (Repetitive Extragenic palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2180-2187.

Digat, B. (1994). Les bactéries stimulatrices de la croissance des plantes: le cas des *Pseudomonas*. *C.R.Acad. Agric.Fr.* 80: 125-140.

Frey-Klett, P. (1996). Ecologie d'un *Pseudomonas fluorescens* auxiliaire de la mycorhization du Douglas. Thèse de Doctorat, Université de Paris XI-Orsay, Paris, France.

Garbaye, J. (1994). Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 128: 197-210.

King, E.O., Ward, M.K. & Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanine and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.

Miller, J.H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schneider, M. & de Bruijn, F.J. (1996). REP-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 163-174.

Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 24: 6823-6831.