

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DAKAR

FACULTE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DE
BIOLOGIE VEGETALE



Mémoire pour l'obtention du

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES

Présenté par

Moudjahid DEMBA DIALLO

OPTIMISATION D'UN PROTOCOLE D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION D'ADN DE NODULES DE LEGUMINEUSES

soutenu le 16 Juin 1999

devant la Commission d'Examen composée de :

Président :	M. Amadou Tidiane	BA	Professeur, UCAD
Membres :	M. Nicolas	DIALLO	Maître de Conférences, UCAD
	M. Ibrahima	NDOYE	Maître de Conférences, UCAD
	M. Robin	DUPONNOIS	Chargé de Recherche, IRD
	M. Marc	NEYRA	Chargé de Recherche, IRD

Nom : DEMBA DIALLO

Prénom : Moudjahid

Titre : Optimisation d'un protocole d'extraction et de purification d'ADN de nodules de légumineuses.

RESUME: L'optimisation de l'extraction et de la purification d'ADN de nodules de légumineuses a été réalisée en vue de PCR/RFLPs permettant la caractérisation rapide des souches de *Rhizobium* contenues dans ces nodules. Nous avons testé différents tampons d'extraction, notamment en faisant varier deux composants essentiels, le CTAB (CetylTriméthylAmmonium Bromide) et le PVPP (PolyVynil PolyPyrrolidone). Des méthodes standards de purification de l'ADN à base de phénol et de chloroforme ont été testées. Les conditions optimales d'extraction et de purification sont proposées, permettant l'obtention d'un ADN pur, de haut poids moléculaire, parfaitement amplifiable. Le protocole ainsi défini a été testé avec succès sur différents types et divers modes de conservation de nodules, récoltés sur différentes espèces de légumineuses : jeunes plantes de deux mois, plantes âgées de cinq à douze mois cultivées en conditions contrôlées et sur des arbres âgés d'environ trente ans en conditions naturelles. Une étude préliminaire de compétition entre huit souches de *Rhizobium* appartenant à des groupes taxonomiquement différents, inoculées à dix espèces de légumineuses, a permis de mettre en évidence la dominance de certaines de ces souches dans les conditions de l'expérimentation. L'application de la technique à des études de compétition entre souches est discutée dans ce mémoire.

Mots-clés : Extraction ADN / Nodules / PCR-RFLP / *Rhizobium* / Légumineuses.

ABSTRACT: Optimisation of DNA extraction and purification from nodules of leguminous tree have been realised for PCR/RFLPs for a rapid characterisation of rhizobial strains in nodules. Various extraction buffers were tested, different concentrations of both essential compounds CTAB (CetylTriméthylAmmonium Bromide) and PVPP (PolyVynil PolyPyrrolidone). Standard methods of DNA purification with phenol and chloroform were tested. The optimal conditions of extraction and purification are proposed, to obtain pure DNA of high molecular weight and perfectly amplifiable. This protocole was successfully tested with differents types of nodules, from different leguminous species and after various conditions of conservation of nodules: young plants of two months, plants of five to twelve months, and trees of thirty years old *in natura*. Preliminary studies of competition between eight rhizobial strains belonging to different taxonomic groups, inoculated to ten leguminous species showed the domination of some strains in experimental conditions. Application of this technique for competition studies between strains is discussed.

Key words : DNA Extraction / Nodules / PCR-RFLP / *Rhizobium* / Léguminous tree.

ABREVIATIONS

AcNa	: acétate de sodium
ADN	: Acide Desoxyribo-Nucleique
ARNr	: Acide Ribo-Nucleique ribosomal
BET	: Bromure d'Ethidium
CIRAD	: Centre de coopération International de Recherche Agronomiques pour le développement
CTAB	: CetylTriméthylAmmonium Bromide
dNTP	: désoxyribonucléotide tri-phosphate
DO	: densité optique
EDTA	: Ethylène diamine tetra-Acetate
IRD	: Institut de recherche pour le développement
ISRA	: Institut Sénégalais de Recherches Agricoles
min	: minute
mL	: millilitre
ng	: nanogramme
ORSTOM	: Institut français de recherche scientifique pour le Développement en Coopération
pb	: paire de base
PCR	: Réaction de Polymérase en chaine
pH	: Potentiel hydrogène
PVPP	: PolyVynil Polypyrrolidone
QSP	: quantité suffisante pour
RAPD	: Amplification Aléatoire des Fragments Polymorphes d'ADN
RFLP	: Polymorphisme des longueurs des fragments de restriction de l'ADN
rpm	: Rotation par minute
T	: température

Taq polymérase	: Enzyme(polymérase) extrait de la bactérie <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris Borate EDTA
UCAD	: Université Cheikh Anta Diop de Dakar
UV/VIS	: Ultra-Violet/Visible
v/v	: volume/volume
w/v	: poids/volume
YL	: Yeast Lactate
YLA	: Yeast Lactate Agar
YM	: Yeast Mannitol
YMA	: Yeast Mannitol Agar
°C	: degré celsius
μl	: microlitre
<i>HaeIII</i>	: Enzyme de restriction purifiée de <i>Haemophilus aegyptius</i>
<i>MspI</i>	: Enzyme de restriction purifiée de <i>Moraxella species</i>

A mon DIEU

A la mémoire de tous ceux qui me sont chers

A ma famille

A Eber et Ester

Remerciements

Au terme de ce travail réalisé au Laboratoire de Microbiologie des sols du centre de recherche de l'IRD/ISRA/UCAD/CIRAD de dakar, je tiens à exprimer ma gratitude à tous ceux qui durant ces 12 mois m'ont apporté enseignements, conseils et encouragements. Ils sont trop nombreux pour tous les citer.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Marc NEYRA, Chargé de Recherche et responsable du laboratoire qui a encadré mon travail et qui à su m'initier avec compétence au monde extraordinaire de la recherche ou j'ai découvert l'outil fascinant qu'est la Biologie Moléculaire. Qu'il sache combien je lui suis reconnaissant pour son soutien moral, son humanisme, sa simplicité et son sens d'humour m'ont été très bénéfiques.

Je remercie tout particulièrement M Philippe de LAJUDIS, Chargé de Recherche au LSTM, grâce à qui j'ai eu la passion pour la microbiologie. Qu'il sache combien je lui suis reconnaissant pour son soutien moral, ses encouragements, son attention et son amitié qui ont été très déterminants pour la réalisation de ce travail.

Je remercie Monsieur Robin DUPONNOIS, Chargé de Recherche pour sa disponibilité, son souci de travail bien fait, sa rigueur scientifique, qui font de lui un exemple.

Je tiens à remercier les enseignants du Département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de l'UCAD, et plus particulièrement:

Monsieur le Professeur Tidiane BA, responsable de ce Département, qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Monsieur Ibrahima N'DOYE, Maître de Conférence à l'UCAD pour avoir suivi si patiemment ce travail. Ses suggestions et remarques m'ont été d'un grand apport pour la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici ma profonde gratitude.

Monsieur Nicolas DJALLO Maître de Conférence à l'UCAD pour avoir accepté spontanément de juger ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Awa SALL chef de la scolarité de la Faculté des Sciences et Techniques pour son soutien moral, affectif, ses encouragements son sens maternel et sa bonne humeur m'ont donné de essence pour atteindre l'objectif fixé. Que tout le personnel de la scolarité soit ici vivement remercié.

Je remercie l'ensemble des chercheurs de l'IRD/ISRA/UCAD/CIRAD: Jean LORQUIN, Amadou BA, Tahir DJOP, Samba SYLLA, Alain BRAZUMAN, Didier LESUEUR, Adama DJOUF et Mamadou GUEYE pour leurs conseils pratiques.

J'exprime toute ma gratitude à Madame Fatou FAYE pour son aide technique précieuse et son amitié.

Je n'oublierai pas tout le soutien moral et amical de M^{lle} Hassna FOZINOZINE qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Que tous mes camarades: Amadou, Anicet, Mansour, Jérôme, Saliou, Seidou, Ndeye Fatou, Tania, Moustapha, Sabine, Ramatoulaye, Salif, Etike Diegane et Inamoud trouvent ici l'expression de ma sympathie.

Je remercie Anna Marthe KONTE, pour sa bonne humeur et sa grande disponibilité.

Sincères remerciements à toute l'équipe de techniciens du laboratoire, Lassana, François, Daouda, Mathieu, Léon, Jean, Paul, Camara, Tijiane et Henriette.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail.

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION.....	1
2. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	4
2.1. Populations isolées de nodosités de légumineuses.....	4
2.2. Populations isolées directement du sol.....	4
2.3. Introduction et devenir des souches de <i>Rhizobium</i> dans les sols.....	5
2.4. Nouvelles approches permettant la caractérisation des <i>Rhizobium</i>	6
2.5. Diversité symbiotique et taxonomie des <i>Rhizobium</i>	9
3. MATERIELS ET METHODES.....	11
3.1. Origine des nodules.....	11
3.2. Mode de conservation et traitement des nodules.....	11
3.3. Principe de la méthode d'extraction d'ADN à partir de nodules.....	12
3.4. Effet du CTAB et du PVPP sur l'ADN extrait de broyat de nodules.....	12
3.5. Purification de l'ADN extrait de broyat de nodules.....	13
3.6. Précipitation de l'ADN extrait de nodule.....	14
3.7. Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN en solution.....	15
3.7.1. Dosage de l'ADN extrait au spectrophotomètre.....	15
3.7.2. Dosage de l'ADN extrait sur gel d'agarose.....	16
3.8. Amplification enzymatique de l'ADN.....	16
3.8.1. Amorces utilisées.....	16
3.8.2. Amplification de L'IGS 16S/23S.....	16
3.8.2.1. Conditions de la réaction.....	16
3.9. RFLP sur les fragments amplifiés.....	17
4. RESULTATS.....	18
4.1. Effet du CTAB et ou du PVPP sur l'ADN extrait de nodules.....	18
4.2. Comparaison des différents modes de purifications d'ADN extrait de nodule.....	19
4.3. Comparaison des différents modes de conservation et possibilité d'isolement au cours de l'extraction d'ADN de nodule.....	20
4.4. Amplification enzymatique de l'ADN.....	21
4.5. Choix des enzymes de restriction.....	21

4.6. Application à des études de compétition des différentes souches inoculées pour la formation des nodules.	22
5. DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS.....	23
6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	28
ANNEXE.....	35

1. INTRODUCTION

1. Introduction

Bien que l'inoculation de souches sélectionnées de *Rhizobium* aux légumineuses soit pratiquée en agriculture depuis de nombreuses années pour améliorer la croissance des légumineuses et la production de biomasse, l'introduction de souches bactériennes dans le sol, pour qu'elle réussisse, exige que les bactéries inoculées survivent dans le nouvel environnement. Il est toutefois difficile de prévoir le taux de survie des souches introduites dans le sol à cause de la grande hétérogénéité du milieu qui empêche les bactéries d'atteindre et d'occuper les micro-habitats les plus propices à leur survie. Les différentes souches rhizobiales montrent, une différente capacité à rivaliser pour coloniser les nodules et le succès de la symbiose est influencé par les facteurs environnementaux, par la plante hôte, par la taille de la population rhizobiale initiale et par leur répartition dans le sol. A ces contraintes, il faut ajouter la prédation, par les protozoaires, souvent responsable du déclin des *Rhizobium*, après leur introduction dans le sol. D'autres facteurs biotiques peuvent réduire le nombre de *Rhizobium* tel que les bactériophages, les parasites, les antibiotiques produits par d'autres microorganismes et les bactéricides produits par d'autres *Rhizobium*. Ainsi le contrôle de l'inoculation, nécessite de pouvoir vérifier si la souche inoculée est bien à l'origine des nodules formés. Par ailleurs, nombreux travaux de caractérisation des *Rhizobium* depuis une décennie ont montré une grande diversité des *Rhizobium*. Cependant il apparaît évident que l'étude de cette diversité est loin d'être totalement connue car elle se heurte à des limites méthodologiques importantes notamment, l'absence de méthodes de caractérisation rapides permettant de traiter un grand nombre de souches, condition nécessaire à une étude au niveau de la population. En général, les études de diversité nécessitent un isolement à partir d'une plante hôte et de cultiver les souches pour les caractériser. Les éventuels choix exercés par la plante sur les souches inoculées et la sélection de certains génotypes compatibles avec les milieux de croissance utilisés biaisent l'échantillonnage et peuvent amener à une sous-estimation de la biodiversité. Dans les deux cas il apparaît donc indispensable de maîtriser une technique simple, rapide et fiable permettant de caractériser directement la ou les souches présentes dans un nodule de légumineuse, que ce soit pour vérifier l'efficacité d'un inoculum ou pour approfondir les études de diversité des échantillons récoltés *in natura*.

Différentes méthodes ont été utilisées pour identifier directement les souches de *Rhizobium* contenus dans un nodule de légumineuse. En général elles font appel soit au marquage préalable des souches par introduction de gènes reporters (type gène Gus) ou par sélection de mutants résistants à un ou plusieurs antibiotiques, soit à la caractérisation sérologique par les méthodes d'immunofluorescence ou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Ces méthodes présentent l'inconvénient commun de nécessiter des travaux préalables avant l'utilisation de toute

nouvelle souche. De plus, elles ne permettent que la détection des souches spécifiques du serum ou du gène utilisé, mais pas celle de souches inconnues. L'évolution des techniques de biologie moléculaire permet d'envisager la mise au point de protocoles adaptés. En particulier, la PCR (Polymerase Chain Reaction, ou amplification génique) permet de détecter rapidement et spécifiquement des micro-organismes (Bej *et al.*, 1990, Josephson *et al.*, 1991) ou d'accéder à la diversité génétique de populations bactériennes dans leurs milieux naturels (Moyer *et al.*, 1994). La PCR sur l'ADN issu de broyat de nodule a déjà été appliquée avec succès lors d'études phylogénétiques de souches appartenant au genre *Frankia* (Rouvier *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 1998), notamment couplée avec l'étude du polymorphisme des sites de restriction du fragment amplifié (PCR/RFLP). Cette technique offre deux avantages : (i) la PCR nécessite très peu d'ADN cible et peut donc être appliquée sur l'ADN extrait des nodules ; (ii) la RFLP permet une approche rapide et fiable de la diversité génétique. Dans cette perspective, notre étude avait pour objectif principal de tester sur des nodules de légumineuses l'applicabilité d'un protocole d'extraction et de purification d'ADN qui avait été proposé par Rouvier *et al.* (1996) sur les nodules de plantes actinorhiziennes appartenant aux genres *Allocauarina* et *Casuarina*.

Nous avons cherché à optimiser son utilisation, notamment :

- * En testant l'effet de différentes concentration en CTAB (CetylTriméthylAmmonium Bromide) et ou en PVPP(PolyVynil PolyPyrrolidone) entrant dans la composition du tampon d'extraction sur les polysaccharides, polyphénols et les composés humiques contenus dans les nodules.
- * En testant différents types de purification de l'ADN extrait: au phénol, phénol-chloroforme-alcool isoamylique, et au chloroforme-alcool isoamylique.
- * En testant son applicabilité sur différents modes de conservation de nodules : nodules frais, nodules secs, nodules conservés dans l'alcool 70%, nodules conservés dans du glycérol 60%.
- * En testant son application sur différents types de nodules d'origines diverses :
 - nodules récoltés sur des *Acacia raddiana* adultes (≥ 30 ans) en conditions naturelles;
 - nodules récoltés sur diverses légumineuses, notamment *Acacia holosericea*, *Acacia mangium*, *Acacia auriculiformis*, *Acacia senegal*, *Vigna unguiculata* cultivées dans des conditions expérimentales variées;
 - nodules récoltés sur dix espèces de légumineuses pérennes et annuelles (*Sesbania rostrata*, *Alysicarpus glumaceus*, *Acacia senegal*, *A. raddiana*, *A. albida*, *A. seyal*, *A. mangium*, *A. auriculiformis*, *Phaseolus vulgaris*, et *Zornia glauclidiata*) que nous avons cultivées en serre sur sol

stérile en les inoculant avec un mélange de huit souches de *Rhizobium* appartenant à des groupes taxonomiquement différents. La caractérisation des souches contenues dans les nodules récoltés nous permettra de mener une étude préliminaire de compétition entre les différentes souches inoculées.

2. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

2. Rappels bibliographiques

Un des intérêts agronomiques des légumineuses est leur capacité à fixer l'azote lorsqu'ils sont en symbiose avec les *Rhizobium*. Cependant l'utilisation de nouveaux cultivars sélectionnés ou introduits dans de nouvelles aires peut être accompagnée par un faible niveau de fixation symbiotique d'azote due à l'absence de souches appropriées de *Rhizobium* (Halila, 1986, Keating *et al.*, 1988, Beck, 1992).

Pour remédier à cela, une technique communément utilisée pour améliorer la croissance des légumineuses et la production de biomasse, est l'inoculation avec des souches sélectionnées de *Rhizobium*. Toutefois ces souches inoculées peuvent être incapables de noduler à cause des stress environnementaux (Thies *et al.*, 1992). Par ailleurs, les bactéries inoculées ne survivent pas toujours dans le sol et on observe une chute du nombre de bactéries dès la première année à la suite de laquelle l'installation de la souche n'est pas certaine. Ainsi, l'installation de la bactérie dans le sol dépend de sa compétence saprophytique, définie par Crozat (1983) comme étant son aptitude à survivre et à coloniser le sol de la rhizosphère.

2.1. Populations isolées de nodosités de légumineuses

Les *Rhizobium* isolés d'une légumineuse donnée ont été (et sont encore souvent) assimilés a priori à l'espèce connue comme nodulant cette légumineuse ou, à défaut à un groupe d'inoculation homogène. Les caractères étudiés sur ces *Rhizobium* ont été en toute logique assimilés à ceux de l'espèce ou du groupe ainsi formé. Or, l'analyse des *Rhizobium* isolés des nodosités a montré qu'il existait pour toutes les légumineuses étudiées une grande diversité génétique parmi les isolats (Bottomley, 1992). Cette diversité est à la fois spécifique et intra-spécifique. En effet, même si dans certains cas il est possible de penser que certaines légumineuses ne sont nodulées que par des *Rhizobium* d'une seule espèce, il semblerait que pour une grande part d'entre elles, les *Rhizobium* qui les nodulent appartiennent à des espèces voire des genres distincts (Bottomley, 1992 ; Laguerre *et al.*, 1993 ; Martinez-Romero *et al.*, 1991). En outre, les propriétés saprophytiques de ces divers taxons peuvent être totalement différentes. On comprend alors que certains résultats aient pu apparaître contradictoires, ce qui conduit à la nécessité d'identifier les *Rhizobium* avant toute poursuite de leur étude écologique (Amarger *et al.*, 1996).

2.2. Populations isolées directement du sol

Le procédé usuel d'isolement des *Rhizobium* à partir des nodosités ne permet d'accéder qu'à la partie de la population suffisamment compétitive pour former les nodosités avec la légumineuse considérée et non à l'ensemble des *Rhizobium* réellement présents dans les sols. Des protocoles permettant l'isolement direct à partir du sol ont été récemment développés pour plusieurs espèces de *Rhizobium* (Bromfeld *et al.*, 1994, Louvrier *et al.*, 1995). Ces protocoles font appel à des milieux sélectifs permettant l'enrichissement en *Rhizobium* puis à un screening des colonies par hybridation avec des sondes d'ADN spécifiques du génotype recherché. Des bactéries ne portant pas d'information symbiotique mais génotypiquement semblables à des *Rhizobium* ont été ainsi isolées des sols et ont été considérées comme des *Rhizobium* non symbiotiques car celles-ci étaient capables d'exprimer les propriétés symbiotiques de l'espèce proche quand elles leur étaient transférées. De tels isolats non-symbiotiques de *R. leguminosarum* (Laguerre *et al.*, 1993), *R. etli* (Segovia *et al.*, 1991) et de plusieurs espèces proches de *R. loti* (Sullivan *et al.*, 1996) ont été ainsi trouvés dans le sol, la rhizosphère de haricots et dans la rhizosphère de lotiers. Il reste à déterminer la taille, la nature et le rôle joué par ces populations dans la dynamique des populations de *Rhizobium* dans le sol (Amarger, 1996).

2.3. Introduction et devenir des souches de *Rhizobium* dans les sols

Le succès de l'inoculation à des légumineuses par des *Rhizobium*, considéré comme étant l'augmentation du rendement, est en général assuré lorsque les *Rhizobium* spécifiques de la légumineuse sont absents ou en très faible quantité dans les sols (Catroux *et al.*, 1992). C'est le cas lors de l'implantation d'une légumineuse allochtone comme le soja en Europe, ou lorsque les conditions pédoclimatiques sont défavorables à la survie des *Rhizobium* spécifiques comme pour les *Sinorhizobium meliloti* en sols acides. Par contre dans de nombreux autres cas où une population indigène de *Rhizobium* de la même spécificité mais peu efficace est présente, il est beaucoup plus rare d'observer un effet bénéfique de l'inoculation (Ham *et al.*, 1971). L'absence d'un génotype de *Rhizobium* dans les nodosités de légumineuses ne signifie pas forcément son absence dans le sol, car la plante peut exercer une pression de sélection contre certains génotypes. Par ailleurs, la formation des nodosités par la souche inoculée peut permettre à cette souche de se retrouver multipliée par 10^2 - 10^3 pendant la période végétative de la légumineuse. Mais cette augmentation est souvent transitoire et le nombre peut retomber à un niveau d'équilibre après récolte. Dans certains cas une souche introduite peut s'implanter durablement à un niveau voisin de celui des souches indigènes sans qu'il soit pour cela nécessaire que la souche forme des nodules ni même qu'elle soit introduite avec une légumineuse (Amarger *et al.*, 1990). Il est donc nécessaire de travailler sur des populations isolées directement du sol pour pouvoir suivre une souche introduite dans le sol. L'utilisation de marqueurs génétiques naturels ou introduits dans le génome peut

permettre, d'une part de détecter une souche particulière à partir du sol et d'autre part de différencier et de suivre les bactéries inoculées dans des sols contenant des *Rhizobium* de même spécificité (Amarger *et al.*, 1990; Hirsch *et al.*, 1994). Il apparaît donc, bien qu'un passage par la plante puisse permettre à un génotype d'être multiplié transitoirement, qu'il n'y a pas une nécessité absolue d'une étape symbiotique pour permettre à une souche de *Rhizobium* de s'implanter dans le sol. Les échecs d'inoculation ne peuvent pas être considérés comme systématiquement causés par des difficultés d'implantation mais doivent être souvent liés à une faible compétitivité pour la nodulation.

En conditions naturelles, l'inoculation par des souches sélectionnées en l'absence de souches natives est très efficace (Brill, 1981). Par contre, quand elles sont inoculées en présence de souches natives il y a parfois absence d'amélioration du rendement. En effet, les souches introduites peuvent ne pas facilement faire compétition avec les microorganismes indigènes adaptés (Dowling et Broughton 1986). Toutefois il est possible de sélectionner des souches selon leur compétitivité (Danso et Owiredo, 1988). En plus, leur haute efficacité obtenue, l'utilité des souches sélectionnées dans chaque région devrait être évaluée avant leur large utilisation (Beck, 1992).

Plusieurs méthodes ont été décrites pour évaluer la compétitivité entre les souches et le suivi *in situ*. Leur principe est le plus souvent basé sur la co-inoculation des plantes par une souche de référence et un ou plusieurs compétiteurs, le succès de la souche testée étant évalué par l'étude de l'occupation des nodules par les différentes souches. Certaines méthodes d'évaluation de l'occupation nodulaire sont indirectes. Par exemple, si la souche testée est effective pour la fixation d'azote et que les compétiteurs ne le sont pas, le rendement peut être mesuré (Amarger, 1984). L'absorption d'hydrogène (ElHassan *et al.*, 1986), la chlorose de l'hôte / ou la formation de pigments noirs dans les nodules peuvent aussi être utilisées avec certaines souches comme indicateurs de compétitivité (Eaglesman *et al.*, 1982). Cependant, dans la plus part des cas, il est préférable de pouvoir identifier directement la souche présente dans les nodosités et plusieurs approches ont été décrites dans ce sens.

2.4. Nouvelles approches permettant la caractérisation des *Rhizobium*

Les études de la biodiversité intéressant le plus souvent un nombre important de souches et se situant au niveau intraspécifique, nécessitent l'utilisation de techniques très discriminatoires avec des protocoles suffisamment simples pour être compatibles avec le grand nombre de souches examinées. Nous ne ferons pas l'inventaire de toutes les techniques envisageables pour étudier la

biodiversité microbienne, mais nous retiendrons celles qui sont actuellement les plus couramment utilisées.

La technique RAPD ou Random Amplified Polymorphic DNA (Williams *et al.*, 1990) est basée sur l'utilisation d'amorces choisies arbitrairement (Caetano-Anollès *et al.*, 1991) qui sont de petites tailles et non spécifiques. Elles vont de ce fait se fixer en de nombreux sites de l'ADN génomique. La taille des fragments et leur nombre permet de différencier les souches et d'éviter ainsi l'utilisation des enzymes de restriction. Toutefois la non spécificité des amorces impose de ne travailler que sur des bactéries en culture pure. La RAPD présente donc un champ d'application plus limité et pose un problème de reproductibilité.

La technique de détection des variations génétiques par comparaison des profils isoenzymatiques a été étendue aux populations bactériennes (Mytton *et al.*, 1978 ; Goulet, 1980 ; Selander *et al.*, 1986). En effet l'application de ces techniques au monde bactérien nécessite tout d'abord la possibilité de cultiver un nombre important de souches bactériennes en quantité suffisante pour être analysable au niveau de l'activité enzymatique. Ceci représente une difficulté non négligeable avec certains genres bactériens à croissance lente, contraignant ainsi l'investigateur à réduire sérieusement la taille des populations à étudier (Schwencke, 1991). D'une manière générale, l'étude du polymorphisme enzymatique consiste tout d'abord à réaliser un extrait protéique à partir d'un culot bactérien et à rechercher dans cet extrait, le polymorphisme enzymatique par rapport à un substrat donné. Après électrophorèse, les enzymes sont révélées par réaction colorée. La lecture des gels permet de classer les isolats en fonction de leur type électrophorétique au sein duquel ils partagent les mêmes allèles à tous les locis enzymatiques examinés (Young, 1992).

Les techniques immunologiques sont couramment utilisées dans le suivi et l'identification des souches grâce à l'utilisation d'anticorps poly ou plus récemment monoclonaux (Velet *et al.*, 1988; Kinkle et Schmidt, 1992). Ainsi, l'utilisation du test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) par Kishinevsky et Bar-Joseph (1978) pour l'identification des *Rhizobium* d'*Arachis hypogea* a été étendue à d'autres *Rhizobium*. Cette technique utilise de faibles quantités de serum et ne nécessite pas d'équipement microscopique. Par ailleurs, son utilisation n'affecte pas l'efficacité des souches (Kishinevsky et Bar-Joseph, 1978; Ayanaba *et al.*, 1986; Cleyet-Marel, 1987; Wolff *et al.*, 1991; Anyango *et al.*, 1998) et permet de traiter un nombre très élevé d'échantillons. Ce test peut être utilisé avec des bactéries non isolées (systèmes racinaires, sols,...) à condition de disposer d'anticorps spécifiques (Fernandez-Flouret et Cleyet-Marel, 1987).

La technique d'amplification de gènes ou PCR: Polymerase Chain Reaction (Saiki *et al.*, 1988), est une réaction de polymérisation réitérative de nucleotides triphosphates qui permet la synthèse rapide d'un très grand nombre de copies d'une séquence polynucleotidique (ADN ou ARN) unique. L'échantillon initial est constitué d'un fragment d'ADN mono ou bicaténaire qui peut être déjà partiellement purifié ou tout simplement contenu dans une population brute hétérogène.

Grâce à la technique d'amplification par PCR, de nouvelles approches ont été développées qui permettent de cibler un biomarqueur pour analyser la structure des communautés bactériennes. L'utilisation d'amorces PCR spécifiques d'une région génétique définie *a priori*, permet d'obtenir l'augmentation du signal. Un grand nombre de copies d'une séquence cible est ainsi rapidement obtenu au sein d'un mélange complexe d'ADN. Toutefois les méthodes utilisant la PCR doivent prendre en considération les biais liés à cette technique pour l'analyse des données. Les principaux biais de cette technique sont (i) l'amplification non spécifique , (ii) la création de séquences recombinantes ou chimères et (iii) l'amplification préférentielle. Les conditions de la PCR (nombre de cycles), l'utilisation d'ADN fortement dégradé (faible poids moléculaire) et la quantité d'ADN cible, peuvent fortement influencer la reproductibilité et l'efficacité de la PCR par la formation de molécules chimériques (Liesack *et al.*, 1991; Wilson,1997; Chandler *et al.*, 1997). La fréquence de reproduction de ces molécules est approximativement de 10% quand on réalise une amplification par PCR de deux séquences présentant 82% d'homologie, mais peut augmenter jusqu'à 30% de produit final dans une coamplification de séquences très proches (Wang et Wang, 1997). L'amplification préférentielle dépend aussi du nombre de cycles d'amplification PCR mais encore de facteurs tels que la nature de l'ADN matrice (%G+C), la nature des amorces et les conditions d'hybridation (Reysenbach *et al.*, 1992; Suziki et Farrelly *et al.*, 1995; Giavannoni, 1996; Chandler *et al.*, 1997). Il en résulte que la coamplification par PCR d'un mélange de séquences cibles peut favoriser ou défavoriser l'obtention de certaines séquences présentes dans l'ADN extrait et donc fournir une mauvaise estimation du nombre de cibles relatives à l'origine. Ainsi, il reste indispensable de vérifier la représentativité des séquences obtenues par comparaison avec les bases de données (Larsen *et al.*, 1993), mais aussi de pallier les problèmes d'amplification préférentielle par l'utilisation de plusieurs cibles ou par dilution de la solution d'ADN de départ. Néanmoins, la technique d'amplification par PCR a permis de pouvoir aborder de manière qualitative la diversité microbienne aussi bien dans le sol que dans les nodules.

L'amplification de l'ADN par PCR: Polymerase Chain Réaction, (Saiki *et al.*, 1988) permet d'obtenir une grande quantité d'ADN; le fragment amplifié pouvant atteindre une taille de 4000 pb (paires de bases). L'ADN amplifié peut être analysé par des enzymes de restriction, par des sondes

spécifiques ou éventuellement par séquençage direct (Bally *et al.*, 1992). La PCR permet de travailler sur des biomasses bactériennes très réduite en multipliant l'ADN et non pas les cellules (Simonet *et al.*, 1990), de ne s'intéresser éventuellement qu'à une fonction spécifique (en utilisant des amorces spécifiques des gènes codants pour cette fonction), de comparer des fragments d'ADN en aveugle et d'évaluer ainsi la présence de bactéries capables d'assurer cette fonction dans un environnement aussi complexe que le sol, sans passer par une étape d'isolement de souches (Picard *et al.*, 1992).

En général, les études moléculaires de caractérisation et de diversité des *Rhizobium* se font le plus souvent par l'amplification des régions 16S ou IGS (IGS=InterGenic Spacer) de l'ADN ribosomal. L'ADN codant pour l'ARNr 16S permet d'établir des groupes phylogénétiques, mais est trop contraint évolutivement pour établir un niveau de discrimination comparable aux isoenzymes. Ainsi il apparaît qu'aucune des dix enzymes les plus fréquemment utilisées ne permet pas de séparer toutes les espèces du genre *Sinorhizobium* (Neyra *et al.*, 1998). Par contre la région intergénétique (IGS=InterGenic Spacer) située sur l'opéron ribosomal entre les ARNr 16S et 23S pourrait avoir subi moins de contraintes évolutives, et donc être beaucoup plus variable permettant ainsi une meilleure discrimination.

L'IGS (InterGenic Spacer) peut être analysé de différentes manières. S'il est suffisamment grand, il peut être analysé par polymorphisme de restriction du fragment amplifié (PCR/RFLP). Ce type d'étude a été mené sur des ectomycorhizes et a permis de descendre au niveau de discrimination de la souche (Gardes *et al.*, 1991). Les microorganismes appartenant à la sous-classe des protéobactéries de la sous division α semble présenter un IGS d'au moins 1000 pb (Normand *et al.*, 1994). Son étude par PCR/RFLP sur les genres *Nitrobacter* et *Agrobacterium* a permis de discriminer des souches que l'analyse de l'ARNr 16S n'avait pu différencier (Navarro *et al.*, 1992, Ponsonnet et Nesme, 1994).

Le polymorphisme de longueur de l'IGS peut être un bon outil de caractérisation rapide. L'amplification de plus de 300 bactéries appartenant à 8 genres, dont *Listeria*, *Staphylococcus* et *Salmonella*, a permis de différencier les souches au niveau de l'espèce, avec quelques caractérisations au niveau du genre (Jensen *et al.*, 1993) Cette méthode d'analyse a également permis de discriminer des souches de *Clostridium* difficiles à séparer.

2.5. Diversité symbiotique et taxonomie des *Rhizobium*

L'amélioration de l'efficacité de la fixation symbiotique passe par la sélection végétale et la gestion des populations de *Rhizobium* dans les sols et la rhizosphère. Ainsi, il est important d'étudier la dynamique des populations (transferts de gènes, persistance des souches et des caractères introduits par inoculation).

La description des populations et de leurs diversités est réalisée à l'heure actuelle par l'utilisation de marqueurs moléculaires (RFLP, méthodes dérivées de la PCR, hybridation etc...) (Laguerre *et al.*, 1996). Le classement, la nomenclature et l'identification des souches passent par une étude taxonomique de type polyphasique basée sur une combinaison de méthodes phénotypiques et génotypiques (Vandamme *et al.*, 1996). La taxonomie des *Rhizobium*, s'appuyant sur des relations phylogénétiques évaluées par des similitudes de séquences d'ARN ribosomal 16S essentiellement, a ainsi permis d'identifier une vingtaine d'espèces regroupées en six genres (Jordan *et al.*, 1982; Jarvis *et al.*, 1982; Jordan *et al.*, 1984; Dreyfus *et al.*, 1988; de Lajudie *et al.*, 1994 de Lajudie *et al.*, 1998) dans la sous-classe alpha des protéobactéries: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* (Tableau 1) qui comprend également deux autres genres: *Agrobacterium* et *Phyllobacterium*.

Il n'y a pas de correspondance stricte entre la position taxonomique d'un *Rhizobium* et ses propriétés symbiotiques comme la spécificité d'hôte. En effet de nombreuses espèces sont hétérogènes d'un point de vue symbiotique et contiennent des souches ayant des spectres d'hôte totalement différents. Par exemple l'espèce *Rhizobium leguminosarum* est divisé en trois symbiotypes (ou biovars) nodulant respectivement le pois (bv. *viciae*), le trèfle (bv. *trifolii*), ou le haricot (bv. *phaseolus*) (Marninez-romero et Caballero-Mellado, 1996), de même que l'espèce *Sinorhizobium teranga* renferme des souches d'*Acacia* (bv. *acaciae*) et des souches de *Sesbania* (bv. *sesbaniae*) (Lortet *et al.*, 1996). Par ailleurs des isolats d'une même plante comme le haricot peuvent appartenir à au moins trois espèces différentes (Martinez-Romero et Caballero-Mellado, 1996).

Tableau 1 : Classification des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote de la famille des *Rhizobiaceae*
(Nick *et al.*, 1998)

Genres	Espèces	Plantes hôtes	Références
Rhizobium (croissance rapide)	<i>R. leguminosarum</i>		Jordan,1984
	biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum, Vicia, Lathyrus, Lens</i>	Jordan,1984
	biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>	Jordan,1984
	biovar <i>phaseolus</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Jordan,1984
	<i>R. galegae</i>		Lindström,1989
	biovar <i>orientalis</i>	<i>Galega orientalis</i>	Lindstrom,1998
	biovar <i>officinalis</i>	<i>Galega officinalis</i>	Lindström,1998
	<i>R. tropici</i> IIA	<i>Phaseolus vulgaris L., Leucaena</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
	<i>R. tropici</i> IIB	<i>Phaseolus vulgaris L., Leucaena</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Segovia <i>et al.</i> , 1993
	<i>R. hainanensis</i>	Leg.tropicale, Hainan de chine	Chen <i>et al.</i> , 1994 ; Chen <i>et al.</i> , 1997
	<i>R. gallicum</i>		
	biovar <i>gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
	biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>R. giardinii</i>			
biovar <i>giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997	
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997	
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica L. Ledebour</i>	Berkum <i>et al.</i> , 1998	
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999	
Mesorhizobium (croissance rapide)	<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i>	Jarvis <i>et al.</i> , 1982 ; Jarvis <i>et al.</i> , 1997
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen <i>et al.</i> , 1991 ; Jarvis <i>et al.</i> , 1997
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arintinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994 ; Jarvis <i>et al.</i> , 1997
	<i>M.tianshanense</i>	13 espèces de Leg.tropicales	Chen <i>et al.</i> , 1995 , Jarvis <i>et al.</i> , 1997
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Ciecr arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995 ; Jarvis <i>et al.</i> , 1997
	<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, prosopis</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998
	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999
Sinorhizobium (Croissance rapide)	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trrigonella</i>	Jordan,1984 ; Eardly <i>et al.</i> , 1990 de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	<i>S. fredii</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	<i>S. terangaie</i>		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	biovar <i>acaciae</i>	<i>Acacia</i>	Lortet <i>et al.</i> , 1996
	biovar <i>sesbaniae</i>	<i>Sesbania</i>	Lortet <i>et al.</i> , 1996
	<i>S. medicae</i>	<i>Medicago trunculata</i>	Eardly <i>et al.</i> , 1990 , Rome <i>et al.</i> , 1996
<i>S. arboris</i>	<i>Acacia senegal</i>	Nick <i>et al.</i> , 1998	
<i>S. kostiense</i>	<i>Prosopis chilensis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1998	
Allorhizobium (croissance rapide)	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998
Azorhizobium (Croissance rapide)	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
	<i>A. sp</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
Bradyrhizobium (Croissance lente)	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max, G.soja</i>	Jordan , 1982
	<i>B. sp</i>	<i>Vigna, Lupinus, Mimosa, Acacia</i>	Jordan, 1982 , Dupuy <i>et al.</i> , 1994 ; Alazard, 1985 , Young, 1991
	<i>B. elkanu</i>	<i>Glycine max</i>	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
	<i>B. liaoningensis</i>	<i>Glycine max, G.soja</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995

3. MATERIEL ET METHODES

3. Matériels et méthodes

3.1. Origine des nodules

Les nodules ont été récoltés des légumineuses d'origines diverses qui se sont développés soit naturellement soit dans des conditions contrôlées. Ainsi les nodules utilisés dans cette étude proviennent soit:

- des plantes d'*Acacia raddiana* adultes qui se sont développées en conditions naturelles dans la région du Ferlo (Sénégal) et dont l'âge est estimé à 30 ans. Les nodules provenant de ces arbres sont souvent de très petites tailles (quelques millimètres) récoltés des racines secondaires.

- de diverses légumineuses d'*Acacia holosericea*, *Acacia mangium*, *Acacia auriculiformis*, *Acacia senegal*, *Vigna unguiculata* qui ont été cultivées en conditions variées (nature du substrat, origine du substrat, substrat stérile ou non, inoculé ou non...). Les nodules provenant de ces plantes sont polymorphes (sphériques, allongés, ovales), leur taille varie entre 0,5 cm et 1,2 cm. Ces nodules nous ont été gracieusement fourni par des chercheurs de l'IRD et du CIRAD.

- De dix espèces de légumineuses (*Sesbania rostrata*, *Alysicarpus glumaceus*, *Acacia senegal*, *Acacia raddiana*, *Acacia albida*, *Acacia seyal*, *Acacia mangium*, *Acacia auriculiformis*, *Phaseolus vulgaris*, et *Zornia glaucochidiata*) pérennes et annuelles (Tableau 1 annexe) que nous avons élevées en serre sur sol stérile. Elles ont été inoculées par un inoculum mixte comportant huit souches de *Rhizobium* appartenant à des groupes taxonomiquement différents dont les principales caractéristiques sont présentées sur le tableau 2 (annexe). Ces souches sont capables de noduler ces plantes. Vingt répétitions sont effectuées pour chacune des espèces de légumineuses utilisées.

Nota: Les conditions de cultures, les milieux de culture des bactéries et des plantes ainsi que la technique de dénombrement des bactéries sont résumés en annexe.

3.2. Mode de conservation et traitement des nodules

Les nodules prélevés sur les racines des différentes espèces de légumineuses, sont rincés plusieurs fois à l'eau distillée.

Les nodules sont répartis en quatre groupes en vue de l'extraction d'ADN.

* Groupe 1: constitué de nodules frais; ces nodules sont désinfectés avec du HgCl₂ 0,1% pendant 30 secondes puis rincés à l'eau stérile.

* Groupe 2: constitué de nodules frais désinfectés au HgCl₂ 0,1% pendant 30 secondes puis rincés à l'eau stérile et conservés dans du glycérol 60% à - 80°C.

* Après un rinçage à l'eau permutée, les nodules du groupe 3 sont conservés directement dans l'alcool 70% pendant deux mois. Ils seront réhydratés de la façon suivante: alcool 70%, alcool 50% (1 heure), alcool 25% (1 heure), eau ultra pure.

* Groupe 4: constitué de nodules séchés à l'étuve à 40°C pendant 10 à 14 jours. Ils seront réhydrater pendant 4 heures au moins dans l'eau ultra-pure stérile avant toute extraction d'ADN.

3.3. Principe de la méthode d'extraction d'ADN à partir de nodules

La méthode est adaptée de celle de Rouvier et *al* (1996) sur les nodules de plantes actinorhiziennes appartenant aux genres *Allocauarina* et *Casuarina*. Afin d'optimiser au maximum qualitativement et quantitativement l'ADN extrait de broyat de nodules de différentes espèces de légumineuses, nous avons testé quatre types de tampons d'extraction en faisant varier leur composition en CTAB (CetylTriméthylAmmonium Bromide) et en PVPP (PolyVynil PolyPyrrolidone). Quatre différents types de purification ont également été testée afin d'obtenir de l'ADN de bonne qualité.

3.4. Effet du CTAB et du PVPP sur l'ADN extrait de broyat de nodules

Le but de l'extraction est d'obtenir des acides nucléiques débarrassés des contaminants bactériens et d'autres substances pouvant inhiber la Taq polymérase. Les nodules sont broyés dans un tampon d'extraction contenant du CTAB (CetylTriméthylAmmonium Bromide) et du PVPP (PolyVynil PolyPyrrolidone). Ces deux produits avaient été utilisés dans des études précédantes pour complexer et éliminer les contaminants solidement liés à l'ADN lors de son extraction (Ausubel, *et al.*, 1990, Holben *et al.*, 1988)

Le CTAB est un détergent qui, en présence d'une forte concentration en NaCl (au moins 0,5 M), forme avec les protéines, les polysaccharides et les composés phénoliques des complexes

facilement extractibles par le chloroforme (Murray et Thompson, 1980). Les polysaccharides et les tanins produits par la plante sont très difficiles à séparer de l'ADN car ils ont des propriétés biochimiques communes (ce sont de grandes molécules chargées négativement). Or ces molécules inhibent la Taq polymérase, l'enzyme de la PCR, en complexant les ions Mg^{2+} qui sont des cofacteurs de l'enzyme (Tsai et Olson, 1992). Le CTAB permet donc la lyse des cellules végétales et bactériennes et évite la contamination de l'ADN par les composés phénoliques. Les solutions contenant du CTAB ne doivent pas être soumises à des températures de moins de 15°C sinon le CTAB précipite.

Le PVPP complète l'action du CTAB en piégeant les tanins et les polyphénols végétaux. Ceux-ci se fixent, grâce à des liaisons hydrogènes, sur ce composé insoluble dans l'eau et les complexes PVPP/composés phénoliques et sont éliminées par centrifugation.

La solution d'extraction est tamponnée par du Tris-HCl pH 8 et contient de l'EDTA à haute concentration afin de protéger l'ADN libéré de l'attaque des ADNases.

Nous avons donc évalué l'effet du CTAB et du PVPP contenus dans le tampon d'extraction sur les polysaccharides, polyphénols et les composés humiques entrant dans la composition des nodules. Les nodules sont broyés dans un tampon contenant (i) ni CTAB ni PVPP ou (ii) du CTAB ou (iii) du PVPP ou (iiii) du CTAB et du PVPP.

Le nodule est broyé dans 200 μ l d'eau ultra-pure stérile à l'aide d'un poter en plastique stérile (Piston Pellet, Bioblock, Illkirch, France). 150 μ l (les 50 μ l restant seront mélangés à 100 μ l de glycérol 60% pour avoir un volume final de 20% en vue d'un isolement ultérieur) de ce broyat de nodule sont additionnés à 150 μ l de tampon d'extraction deux fois concentré 2X (voir annexe). La solution obtenue est laissée 1 heure au bain-marie à 65°C afin de lyser les cellules. Une centrifugation de 10 min à 13000 rpm à la température ambiante permet d'éliminer les débris cellulaires, les polyphénols et les polysaccharides piégés par le CTAB et le PVPP. Cette méthode de lyse chimique permet d'obtenir un bon rendement mais elle utilise des détergents qui sont des inhibiteurs de nombreuses réactions enzymatiques et génèrent généralement une coextraction (substances humiques essentiellement) plus importante. Il est donc indispensable d'éliminer ces impuretés résiduelles c'est à dire de purifier l'ADN extrait.

3.5. Purification de l'ADN extrait de broyat de nodules

Le chloroforme est un solvant organique qui dénature les protéines. Il est non miscible à l'eau et de densité supérieure à celle-ci; les acides nucléiques n'y sont pas solubles. Après extraction par agitation et centrifugation, l'ADN se trouve exclusivement dans la phase aqueuse supérieure. L'alcool isoamylique est un agent anti-mousse stabilisant la séparation des phases, et le phénol intervient dans l'élimination des protéines contaminantes.

Quatre méthodes de purification de l'ADN extrait de nodule ont été testées. Après la lyse bactérienne et une centrifugation, de 10 min à 13000 rpm:

* le surnageant est recueilli, on ajoute un volume de Phénol et on agite (par retournement) pour mélanger les deux phases jusqu'à ce qu'il se forme une émulsion. Une centrifugation à 13000 rpm pendant 15 min est suivie d'une purification avec un volume phénol-chloroforme alcool isoamylique (25:24:1), et d'un volume de chloroforme-alcool isoamylique (24:1).

* le surnageant est recueilli, on ajoute un volume phénol-chloroforme alcool isoamylique (25:24:1). Une agitation par retournement permet de mélanger les deux phases jusqu'à ce qu'il se forme une émulsion suivie d'une purification avec un volume de chloroforme-alcool isoamylique (24:1).

* une seule purification du surnageant avec un volume de chloroforme-alcool isoamylique (24:1),.

* deux purifications du surnageant avec un volume de chloroforme-alcool isoamylique (24:1).

Toutes ces différentes phases de purifications sont suivies d'une centrifugation pendant 15 minutes à 13000 rpm à la température ambiante afin d'éliminer les protéines et les lipides.

3.6. Précipitation de l'ADN extrait de nodule

La précipitation se fait en présence d'éthanol pur et d'un cation monovalent. Après la dernière extraction au chloroforme-alcool isoamylique, la phase supérieure est récupérée tout en notant le volume exact. Le chloroforme étant un déprotéinisant très puissant, il doit être éliminé pour permettre l'action ultérieure des enzymes de restrictions sur l'ADN extrait. On ajoute 1/10^e volume d'acetate de sodium 3M pour un volume de surnageant et 2,5 volumes d'éthanol absolu froid.

Après avoir observé la précipitation des acides nucléiques, les tubes sont placés à -20°C pendant une nuit. Les tubes sont centrifugés 30 min à 13000 rpm (4°C). Le surnageant est éliminé et on ajoute 1 volume d'éthanol à 70% pour laver le culot d'ADN. Le lavage par une solution d'éthanol 70% permet d'éliminer les sels. On centrifuge 15 min à 13000 rpm.

Le surnageant est soigneusement éliminé puis les culots sont séchés 30 min au Speed Vac.

Les culots sont dissous dans 20 μl d'eau ultra pure stérile.

L'ADN est ensuite conservé à -20°C .

3.7. Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN en solution

3.7.1. Dosage de l'ADN extrait au spectrophotomètre

Le spectre d'absorption des solutions d'ADN est enregistré à l'aide du spectrophotomètre UV/VIS (Pharmacia Biotech) dans une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique. Un échantillon de 50 μl a permis de faire une analyse quantitative et qualitative de l'ADN extrait. Pour affiner cette approche, un balayage des longueurs d'ondes comprises entre 200 et 340 nm est effectué pour l'ensemble des échantillons analysés. Des précautions se sont révélées nécessaires pour obtenir des mesures fiables: le rinçage de la cuve en quartz à l'acide sulfochromique et la recalibration de l'appareil entre chaque passage, à l'aide de l'eau ultra-pure qui avait servi à diluer les solutions d'ADN.

La densité optique à 260 nm est corrélée à la concentration d'ADN en solution, il a été montré qu'une solution d'ADN de concentration égale à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a une densité optique de 1. La quantité d'ADN est donc déterminée de la manière suivante:

$$Q_{\text{ADN}} (\mu\text{g}/\text{ml}) = 50 \times \text{DO}_{260} \times \text{facteur de dilution}.$$

Pour contrôler la pureté de l'ADN en suspension, il faut vérifier que:

$$\alpha = \text{DO}_{260} / \text{DO}_{280} \text{ est compris entre } 1,8 \text{ et } 2.$$

Une valeur inférieure indique une contamination par des protéines. Une nouvelle extraction au phénol/phénol-chloroforme alcool isoamylique ou au chloroforme-alcool isoamylique est donc nécessaire.

$\beta = DO_{260} / DO_{230}$ doit être compris entre 2 et 2,3. Une valeur supérieure traduit la présence d'ARN et/ ou de nucléotides libres.

3.7.2. Dosage de l'ADN extrait sur gel d'agarose

En complément du dosage par spectrophotométrie, une estimation sur gel après coloration au bromure d'éthidium doit être effectuée. Afin de visualiser les produits de l'amplification, 5 μ l de la solution d'ADN sont déposés sur un gel d'agarose (Sigma, La Verpillière, France) 1% (w/v). Après 2h de migration à 80 Vcm⁻¹ dans une cuve horizontale contenant un tampon TBE (Tampon Tris-Borate, 1 μ g ml⁻¹) (cf. Annexe), le gel est coloré pendant 30 min dans une solution de BET (Bromure d'Ethidium, 1 μ g ml⁻¹) et photographié sous UV avec le Gel Doc (BIO-RAD).

3.8. Amplification enzymatique de l'IGS 16S/23S

3.8.1. Amorces utilisées

La région intergénique entre l'ADNr 16S et l'ADNr 23S a été amplifiée par PCR avec des amorces dérivant de l'extrémité 3' de l'ADNr 16S (FGPS1490-72; 5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3') (Navarro *et al.*, 1992) et de l'extrémité 5' de l'ADNr 23S (FGPL132-38; 5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3') (Ponsonnet *et al.*, 1994).

3.8.2. Conditions de la réaction

L'ADN extrait des nodules constitue l'ADN matrice employé pour l'amplification de l'IGS. La réaction d'amplification s'effectue sur un volume total de 25 μ l contenant pour chaque réaction une bille lyophilisée (Ready-to-go PCR beads, Pharmacia Biotech) renfermant 1,5 U de *Taq* polymérase, 10 mM Tris-Hcl, (pH 9 à la température ambiante), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M de chaque dNTP, 1 μ M de chaque amorce, et entre 10 et 50 ng d'ADN génomique. Un témoin négatif sans ADN est inclus dans l'expérience. Les conditions de la PCR adoptée sont les suivantes: 1 cycle à 95°C 5 min afin de dénaturer l'ADN, 35 cycles composés des étapes suivantes: 95°C pendant 30 s (dénaturation), 55°C pendant 1 min (hybridation), 72°C pendant 1 min (élongation). Les échantillons sont ensuite laissés 3 min à 72°C afin de terminer l'élongation des

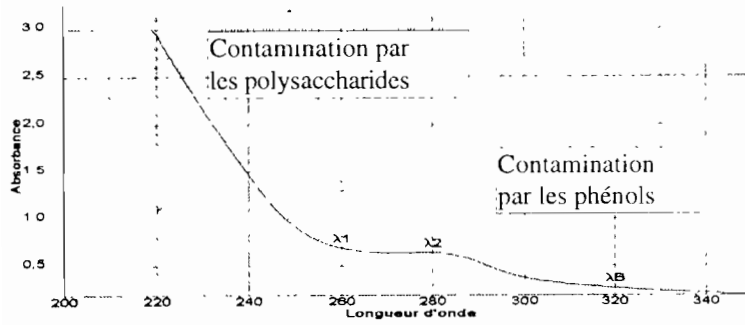
brins incomplets. Cette réaction s'effectue dans des tubes de 0,2 ml à l'aide d'un amplificateur automatique Perkin -Elmer (GeneAmp® PCR System 2400). Afin de visualiser les produits de l'amplification, 3 µl du mélange réactionnel sont déposés sur un gel d'agarose (Sigma, La Verpillière, France) 1% (w/v). Après 1h de migration à 80 Vcm⁻¹ dans une cuve horizontale contenant un tampon TBE (cf Annexe), le gel est coloré pendant 30 min dans une solution de BET (Bromure d'ethidium, 1 µg ml⁻¹) et photographié sous UV avec le Gel Doc (BIO-RAD).

3.9. RFLP sur les fragments amplifiés

La RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) consiste à couper par différentes endonucléases de restriction, un fragment d'ADN donnant, pour chaque endonucléase, un profil de restriction type. Ce fragment sera donc caractérisé par une combinaison de profils types obtenus pour plusieurs endonucléases. Un groupe PCR/RFLP comprendra des souches dont les fragments amplifiés auront les mêmes combinaisons de profils types.

Les enzymes *HaeIII* et *MspI* ont été choisies pour leur capacité de discrimination mise en évidence lors d'études antérieures de caractérisation de *Rhizobium* (Neyra, communication personnelle). Suivant l'intensité de la bande d'amplification 5 à 10 µl sont digérés par 10U d'enzymes dans un volume réactionnel de 20 µl à 37°C pendant 2 heures. Les fragments digérés sont déposés sur gel d'agarose Metaphor® (FMC BioProducts, Rockland, Marine USA) horizontal à 2,5% (w/v). Les fragments digérés sont ensuite soumis à une électrophorèse. Après 3h de migration à 80 Vcm⁻¹ dans une cuve horizontale contenant du tampon TBE (Annexe), le gel est coloré pendant 30 min dans une solution de BET (Bromure d'ethidium, 1 µg ml⁻¹) et photographié sous UV avec le Gel Doc (BIO-RAD).

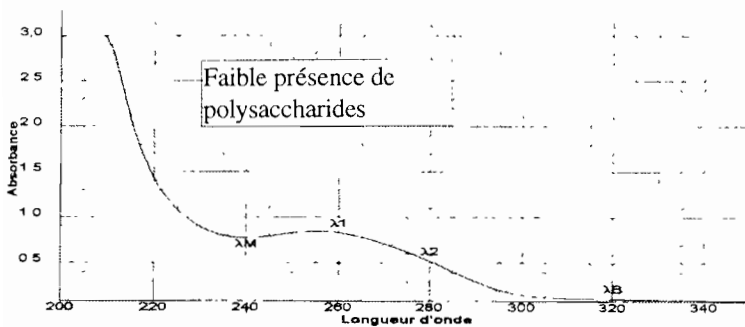
4. RESULTATS



a- CTAB -
PVPP -

$$\text{Rapport } DO_{260}/DO_{280} = 1,130$$

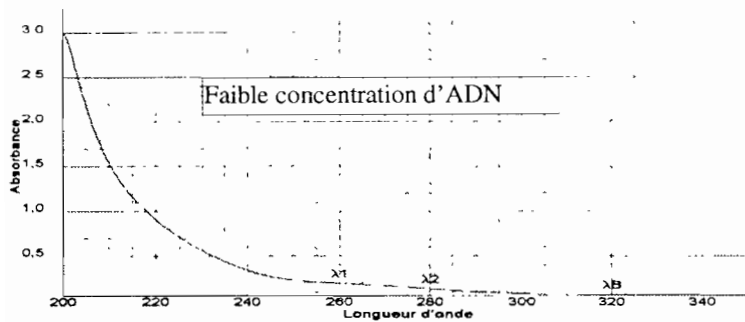
$$\text{Concentration ADN (ng/}\mu\text{l)} = 208,5$$



b- CTAB +
PVPP -

$$\text{Rapport } DO_{260}/DO_{280} = 1,76$$

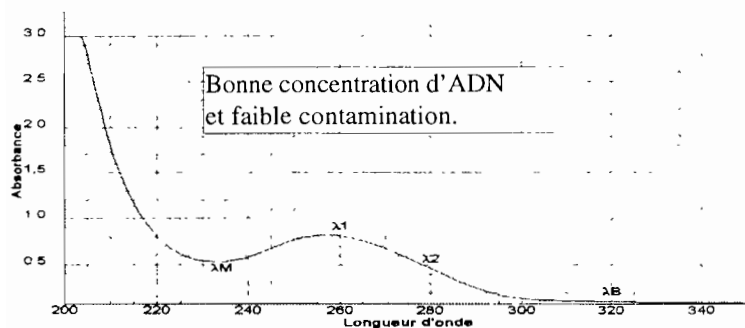
$$\text{Concentration ADN (ng/}\mu\text{l)} = 356,5$$



c- CTAB -
PVPP +

$$\text{Rapport } DO_{260}/DO_{280} = 1,88$$

$$\text{Concentration ADN (ng/}\mu\text{l)} = 63$$



d- CTAB +
PVPP +

$$\text{Rapport } DO_{260}/DO_{280} = 1,95$$

$$\text{Concentration ADN (ng/}\mu\text{l)} = 354$$

Figure 1: Spectres d'absorption de l'ADN extrait de nodules obtenus par différents traitements

a- CTAB - / PVPP -: absence de CTAB et de PVPP.

b- CTAB+ / PVPP -: présence de CTAB et absence de PVPP.

c- CTAB - / PVPP+: absence de CTAB et présence de PVPP.

d- CTAB+ / PVPP+: présence de CTAB et de PVPP.

CTAB = CetylTriméthylAmmonium Bromide.

PVPP = PolyVynil PolyPyrrolidone.

4. Résultats

4.1. Effet du CTAB et ou du PVPP sur l'ADN extrait de nodules

Dans le but d'avoir une lyse la plus exhaustive possible pour libérer l'ADN le plus représentatif des bactéries contenues dans les nodules, nous avons effectué une lyse chimique par utilisation de détergents (CTAB, PVPP).

L'analyse des spectres (Figure 1) nous montre que des différences significatives sur la pureté et la concentration de l'ADN extrait du broyat de nodule sont notables lorsque le tampon d'extraction ne contient ni CTAB ni PVPP ou lorsqu'il contient simultanément les deux. Par contre il n'existe pas de différences significatives sur la pureté de l'ADN extrait lorsque le tampon d'extraction contient soit du CTAB soit du PVPP. En effet lorsque le tampon d'extraction ne contient ni du CTAB ni du PVPP, le rapport de la DO_{260}/DO_{280} (1,130) est largement inférieur à la normale ($\geq 1,8$) montrant la présence des polysaccharides et des polyphénols capables d'inhiber la *Taq* polymérase. L'ADN extrait avec un tampon contenant du CTAB et du PVPP est de bonne qualité (DO_{260}/DO_{280} 1,985), le rendement de l'extraction est satisfaisant et permet une réussite de amplification de 100% (Figure 2). Par contre lorsque le tampon contient soit du CTAB ou du PVPP, le rapport de la DO_{260}/DO_{280} est relativement proche de la normal respectivement 1,77 et 1,88. L'ADN extrait de tels tampons renferme encore quelques contaminants en polysaccharides et en polyphénols mais relativement faibles pour entrainer une inhibition de la *Taq* polymérase (Figure 2).

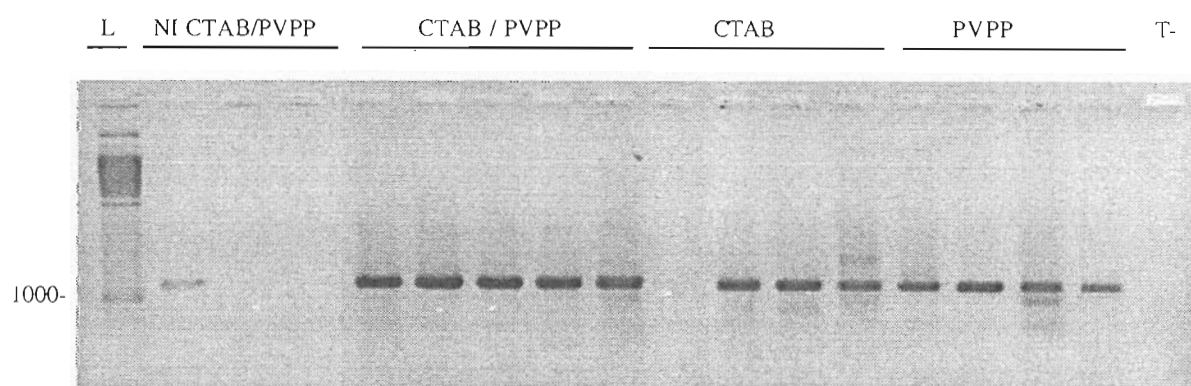


Figure 2: Electrophorèse sur gel d'agarose (1% w/v) des produits d'amplification de l'IGS(16S/23S) après extraction d'ADN de nodules d'*Acacia holosericea*. L= ladder, 100 pb (Pharmacia Biotech); Ni CTAB/PVPP: absence de CTAB et de PVPP; CTAB/PVPP: présence CTAB et de PVPP; CTAB: présence CTAB uniquement; PVPP: présence PVPP uniquement. T-: Témoin négatif.

4.2. Comparaison des différents modes de purifications d'ADN extrait de nodules

Les premières observations du surnageant recueilli après lyse et centrifugation du broyat de nodules ont montrés que les acides nucléiques extraits de nodules sont relativement colorés, en fonction du sol sur lequel la légumineuse a été cultivée. Cette coloration provient vraisemblablement des composés humiques ou polyphénols co-extraits avec l'ADN des différents échantillons de nodules. L'amplification directe de ces dilutions est très souvent inhibée. Il semble donc que ces impurétés (pigments jaunes et bruns) diminuent considérablement le taux d'hybridation des amorces. Il s'avérait donc nécessaire de purifier l'ADN extrait de ces pigments. Compte tenu des données bibliographiques, nous avons testé quatre types de purifications.

1-Une purification au phénol suivie d'une purification au phénol-chloroforme alcool isoamylique (25:24:1) et au chloroforme-alcool isoamylique(24:1).

2-Une purification au phénol-chloroforme alcool isoamylique puis au chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1).

3-Une seule purification au chloroforme-alcool isoamylique (24:1).

4-Deux purifications au chloroforme-alcool isoamylique (24:1).

Les purifications 1,3 et 4 n'induisent aucune différence notable au niveau du taux d'amplification. La réussite de l'amplification pour ces trois types de purifications est de 33%. Par contre purification 2 permet d'obtenir un taux d'amplification de 100% (Tableau 4).

Tableau 4: Optimisation de l'étape de purification de l'ADN extrait de nodules

Traitements	Rapport DO_{260}/DO_{280}	Concentration ADN (ng/ μ l)	Reussite PCR
P+PCA+CA	1,50	+	+/-
PCA+CA	1,88	++	++
CA 1X	1,95	+++	+/-
CA 2X	1,64	+	+/-

P = Phénol, C = Chloroforme, A = Alcool isoamylique

La méthode d'extraction et de purification d'ADN utilisée dans cette étude est donc une extraction au CTAB/PVPP suivie d'une purification au phénol-chloroforme alcool isoamylique (25:24;1) puis au chloroforme alcool isoamylique. Cette méthode nous a permis d'obtenir un très bon rendement en ADN avec des reussites d'amplification de 100% (Figure 2).

La figure 3 résume toutes les étapes du protocole d'extraction.

4.3. Comparaison des différents modes de conservation et possibilité d'isolement au cours de l'extraction d'ADN de nodule

Etant donné que les étapes préliminaires des études écologiques se réalisent sur le terrain, il se pose donc le problème de conservation des nodules en vue d'études écologiques. De même, lors de l'extraction d'ADN, nous avons utilisé un tampon qui contient un détergent (CTAB) qui permet la lyse des bactéries et par conséquent ne permettra pas un isolement ultérieur lorsque les analyses de PCR/RFLP révèlent le profil d'une souche nouvelle. Il devient donc urgent de mettre au point un mode de conservation des nodules et une phase d'isolement avant toute lyse en vue d'obtenir des résultats fiables lors des études écologiques. Les différents modes de conservation des nodules et les possibilités d'isolement sont résumés sur le tableau 5. Les résultats montrent que l'isolement est possible à travers tous les différents modes de conservation sauf avec les nodules conservés dans l'éthanol 70%. Par contre, quelque soit le mode de conservation, l'amplification de la région intergénique située entre les ARNr 16S et 23S (IGS 16S/23S) est positive (Figure 4); nous avons obtenu une amplification de l'ADN extrait des souches contenues dans les nodules de huit espèces de légumineuses étudiées sur dix.

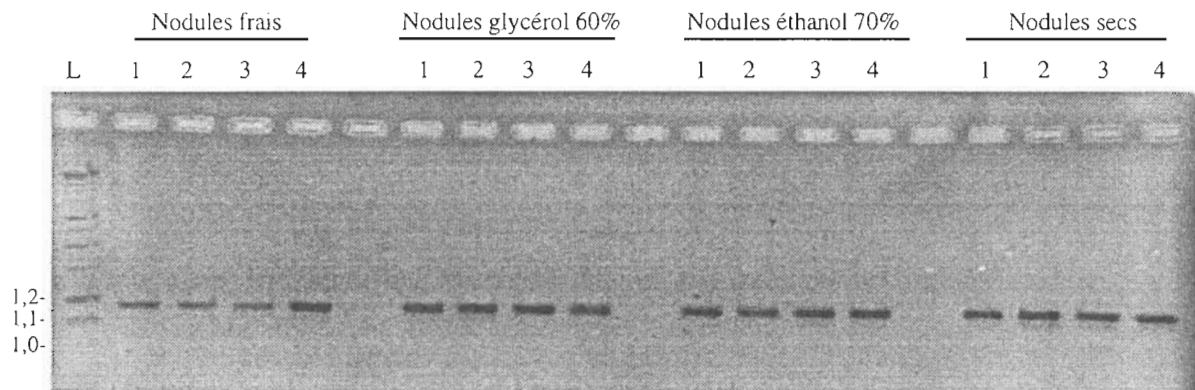


Figure 4: Résultat de l'amplification de la région IGS (16S/23S) après extraction d'ADN de différents traitements de nodules d'*Acacia holosericea*. L, ladder = 1kb (pharmacia Biotech) ; 1 à 4 , différents nodules récoltés des plantes d'*Acacia holosericea* .

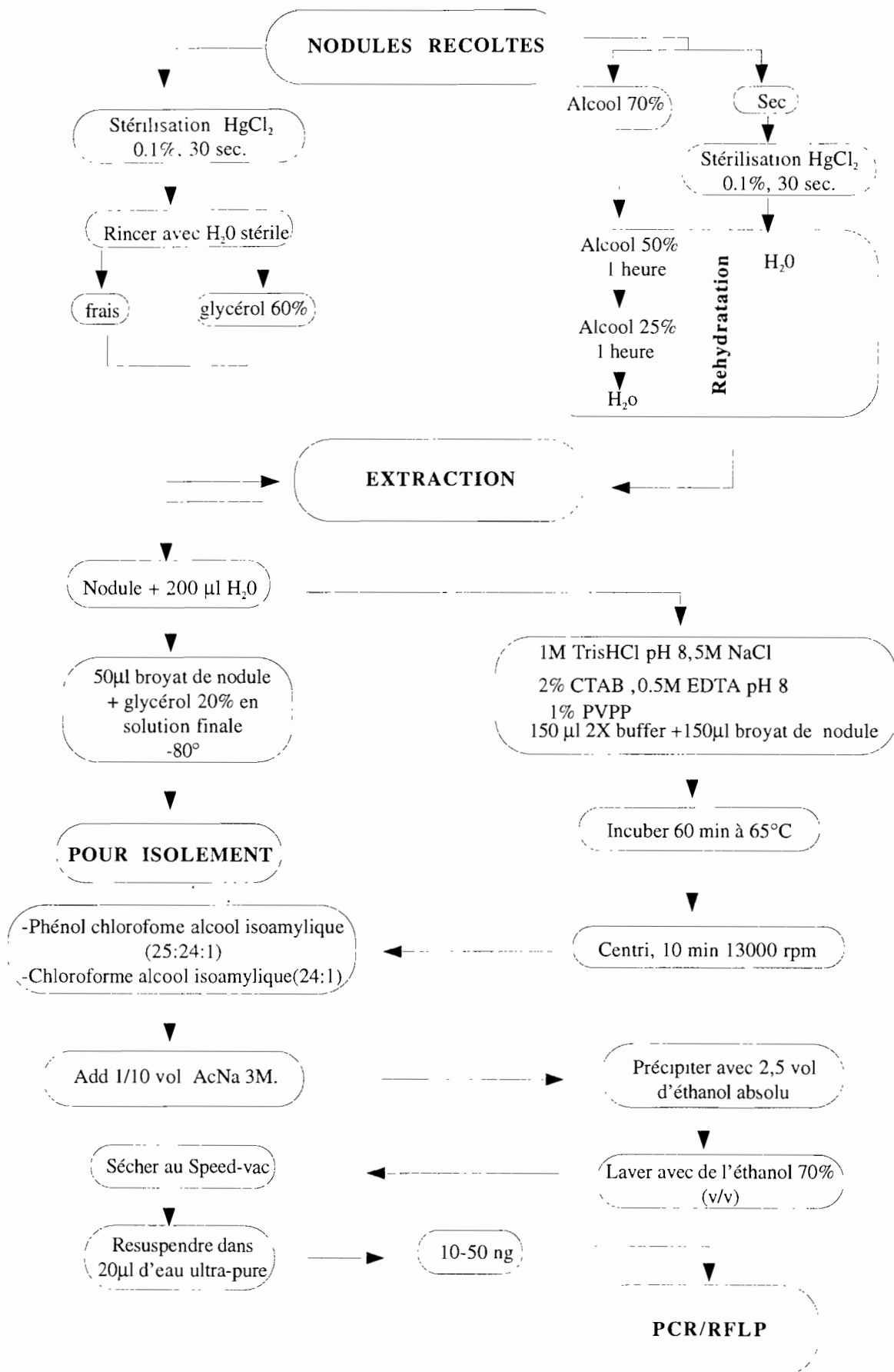


Figure 3: Protocole d'extraction d'ADN de nodules de légumineuses.

Tableau 5: Critères ayant orientés le choix des différents types de conservation, le degré d'amplifiabilité et les possibilités d'isolement

Types de conservation	nodule frais	Nodule conservé glycérol 60%	Nodule conservé l'alcool 70%	Nodule sec
Temps de conservation	30 min	6 mois	6 mois	60 mois.
Possibilité d'isolement	+	+	-	+
Résultat amplification				
<i>Acacia holosericea</i>	+	+	+	+
<i>Acacia raddiana</i>	+	+	+	+
<i>Acacia senegal</i>	+	+	+	+
<i>Acacia auriculiformis</i>	+	+	+	+
<i>Acacia mangium</i>	+	+	+	+
<i>Acacia seyal</i>	+	+	+	+
<i>Acacia albida</i>	-	-	-	-
<i>Sesbania rostrata</i>	+	+	+	+
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	-	-	-
<i>Vigna unguiculata</i>	nt	nt	nt	+

+ : amplification positive.
 - : amplification négative.
 nt: non testé

4.4. Amplification enzymatique de l'ADN

L'ADN extrait des nodules de différentes espèces de légumineuses est en quantité suffisante pour être lu au spectrophotomètre UV/VIS (Pharmacia Biotech) et être visualisé sur gel. Le bromure d'éthidium permet de visualiser sur gel des quantités d'ADN supérieures à 1 ng (Sambrook *et al.*, 1989). Cet ADN est largement suffisant pour être amplifié et une dilution au dixième voire au centième est parfois nécessaire pour éviter l'inhibition de la *Taq* polymérase par les composés phénoliques encore présents. L'amplification des souches de références et les souches non-isolées a donné un seul fragment de taille attendue de l'ordre de 1400 paires de bases. La taille de l'IGS qui inclut les 200 pb de bordures du 16S et 23S n'est pas la même pour toutes les souches; elle est comprise entre 1 et 1,4 kb (kilobase). Notons cependant que si toutes les souches de référence ont amplifié (Figure 5 a et b), les souches non isolées contenues dans les nodules n'ont pas toutes amplifié. Ainsi l'extraction d'ADN des souches contenues dans les nodules d'*Acacia raddiana*, *Acacia senegal*, *Acacia auriculiformis*, *Acacia seyal* et *Sesbania rostrata*, ont très bien amplifié, les souches contenues dans les nodules d'*Acacia albida* et de *Phaseolus vulgaris* n'ont pas amplifié et laissent apparaître des smears.

Des nodules provenant d'autres espèces de légumineuses cultivées dans des conditions variées (nature du substrat, origine du substrat, substrat stérile ou non, inoculé ou non...) ont été utilisés dans ce travail. Ainsi les souches contenues dans les nodules récoltés des plantes d'*Acacia holosericea* montrent une très bonne amplification de la région IGS (16S/23S) avec une taille d'environ 1200 pb (Figure 6 a, b et c). Les souches contenues dans les nodules des plantes de *Vigna unguiculata* cultivées directement sur le terrain sous couvert ou hors couvert d'*Acacia raddiana*, et *Acacia senegal*, révèlent une très bonne amplification de la zone IGS (Figure 7 a et b).

4.5. Choix des enzymes de restriction

Ce paragraphe a pour but d'évaluer le pouvoir discriminant de la région intergénétique située entre les ARNr 16S et 23S (IGS 16S/23S) de huit souches de référence. Nous avons choisi cette région parcequ'elle semble présenter moins de contraintes évolutives que ces régions flanquantes, que sont 16S et 23S. De plus, l'IGS s'était montré 20 fois plus discriminant que l'ARNr 16S sur des souches de *Frankia* (Rouvier *et al.*, 1996).

L'amplification de la région intergénétique située entre l'ARNr 16S et 23S (IGS 16S-23S) aussi bien des souches pures de référence que des souches non isolées des différentes espèces de légumineuses, révèle des bandes de tailles différentes permettant une discrimination mineure

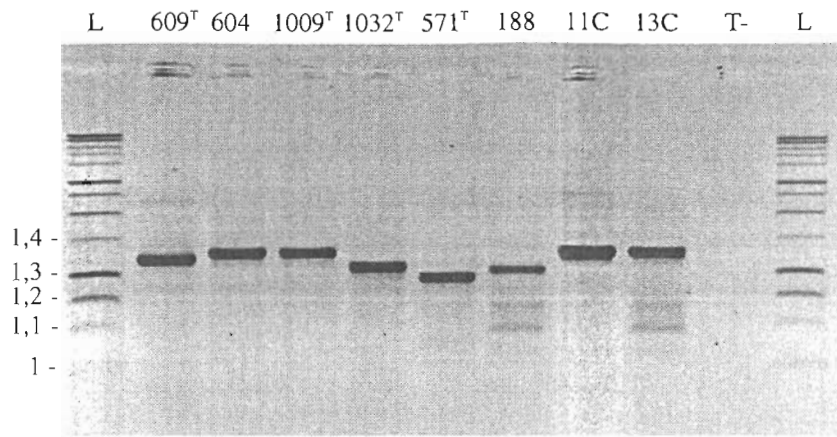


Figure 5a: Electrophorèse sur gel d'agarose (1% w/v) des produits d'amplification de l'IGS (16S/23S) de 8 souches de référence; L, ladder 1kb (Pharmacia Biotech); Puit 1, ORS 609^T; P2, ORS 604; P3, ORS 1009^T; P4, ORS 1032^T; P5, ORS 571^T; P6, ORS 188; P7, 11C (ORS 1782); P8, 13C (ORS 1785); T- Témoin négatif; L, ladder 1kb (Pharmacia Biotech).

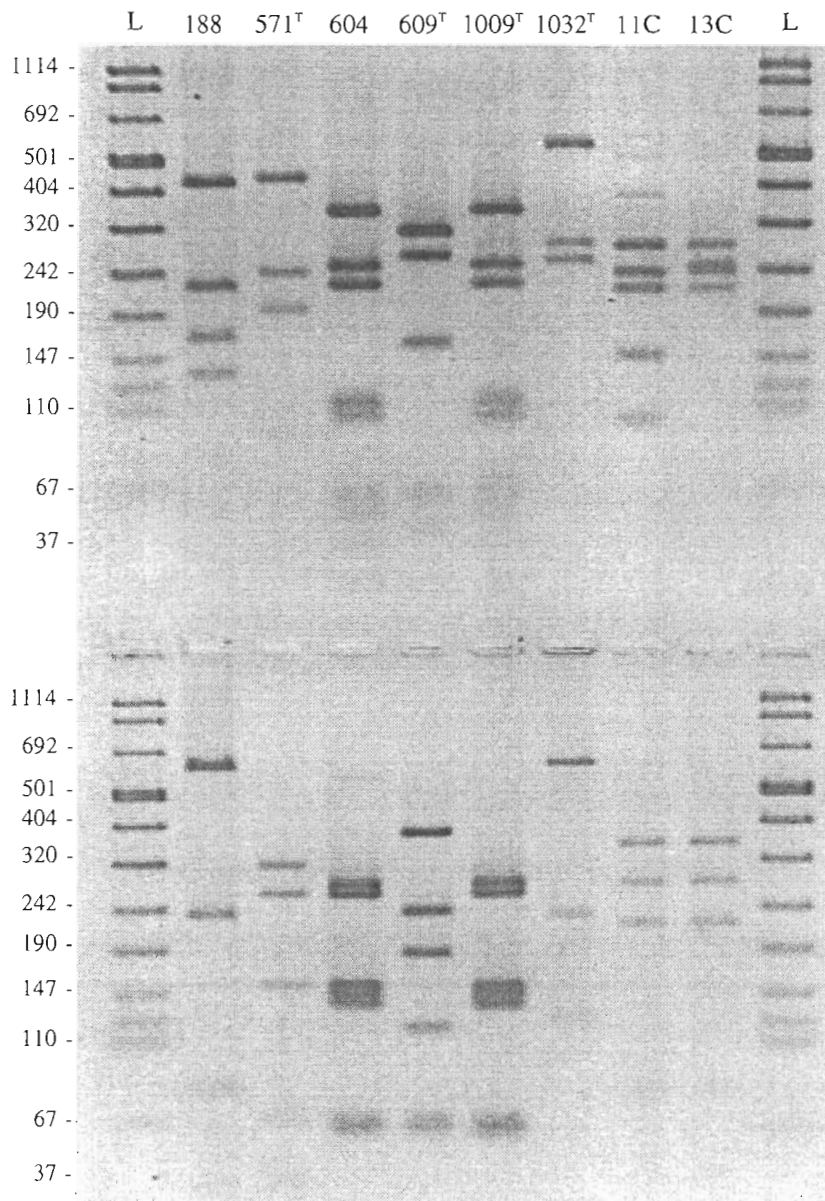


Figure 5b: Electrophorèse sur gel de MetaPhor (2,5% w/v) des produits de restriction obtenus avec les endonuléases *Msp I* et *Hae III* après digestion de l'IGS(16S-23S) amplifié de 8 souches de référence; Puits 1 et 10, ladder (marqueur VIII, Boehringer Mannheim, France); Puits 2 à 8 groupes PCR/RFLP.

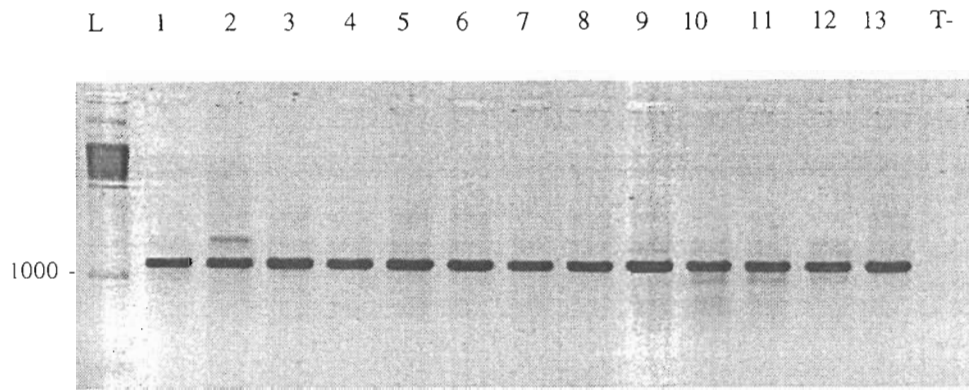


Figure 6a: Electrophorèse sur gel d'agarose (1% w/v) des produits d'amplification de l'IGS (16S/23S) après extraction d'ADN de souche contenue dans chaque nodule d'*Acacia holosericea*; (1 à 13) représentant l'extrait d'ADN de chaque souche contenue dans un nodule différent. L, ladder 100 pb; T-, témoin négatif.

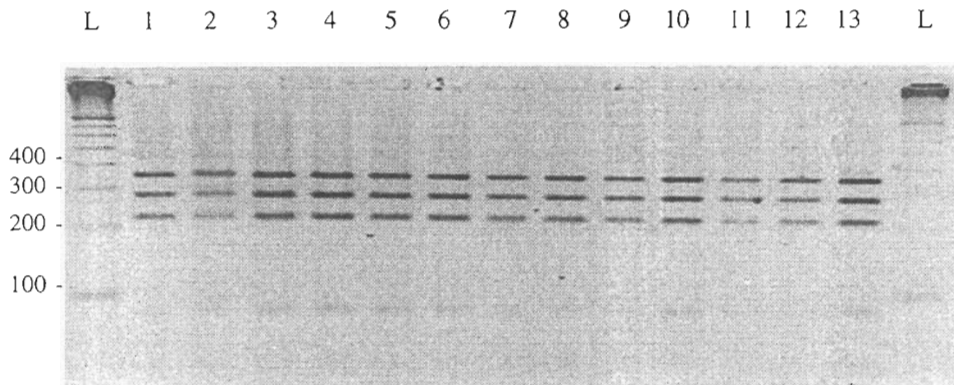


Figure 6b: Electrophorèse sur gel de MetaPhor (2,5% w/v) des produits de restriction obtenus avec l'endonucléase *MspI* après digestion de l'IGS(16S/23S) amplifié. Puits 1 à 13 groupes PCR/RFLP. L, ladder 100 bp (Pharmacia Biotech).

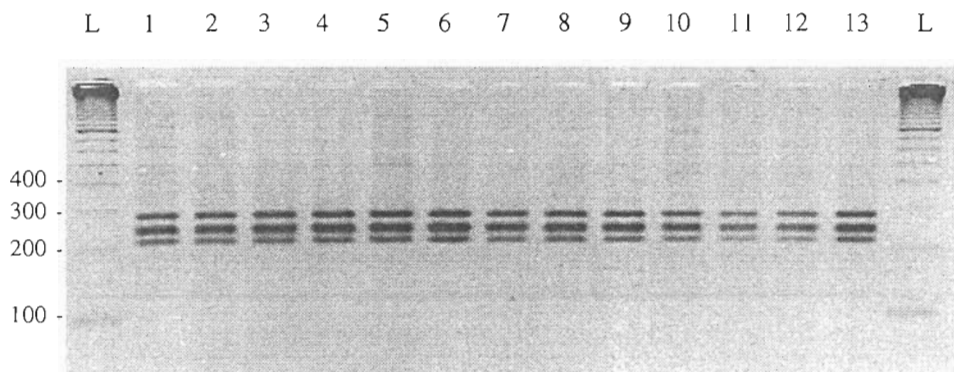


Figure 6c: Electrophorèse sur gel de MetaPhor (2,5% w/v) des produits de restriction obtenus avec l'endonucléase *HaeIII* après digestion de IGS(16S/23S) amplifié Puits 1 à 13 groupes PCR/RFLP. L, ladder 100 pb (Pharmacia Biotech).

(Figure 5a). L'utilisation de deux endonucléases de restriction dont *HaeIII* et *MspI*, (Pharmacia Biotech) permet une discrimination quasi totale des souches de référence à l'exception des souches ORS 604 et ORS 1009^T qui appartiennent à la même espèce (*S. teranga*) et nécessitent l'utilisation d'amorces spécifiques pour être différenciées. Les souches non isolées contenues dans les nodules sont discriminées de manière parfaite par ces deux endonucléases.

4.6. Application à des études de compétition des différentes souches inoculées pour la formation des nodules

Pour évaluer l'aptitude de survie et de formation de nodules des souches de référence à l'état saprophytique dans la rhizosphère, nous avons préparé un inoculum mixte contenant approximativement le même nombre de bactéries en phase exponentielle de croissance de toutes les souches de référence. 8 ml de cet inoculum sont utilisés pour infecter chaque gaine contenant un sol sableux pauvre en matières organiques et en azote préalablement stérilisé pendant 1 heure à 120°C. Dans chaque gaine infectée, est effectuée une transplantation d'une jeune plantule de chaque espèce de légumineuse que nous avons fait prégermer stérilement en boîte de Petri sur de l'eau gélifiée. Les plantes sont périodiquement arrosées à l'eau distillée stérile. Après deux mois de culture en serre, l'application directe de la technique de PCR/RFLP sur les nodules récoltés permet après analyse des profils obtenus, d'évaluer la compétitivité des souches de référence en fonction de la légumineuse.

Le résultat sur la compétition entre les différentes souches de *Rhizobium* inoculées est résumé dans le tableau 6.

L'application de la technique de PCR/RFLP sur les extraits d'ADN de 60 nodules récoltés de 20 plantes de *Sesbania rostrata* cultivées en serre révèle sans aucune ambiguïté le profil de la souche ORS 571^T aussi bien avec *MspI* qu'avec *HaeIII*. Les plantes d'*Acacia raddiana*, d'*Acacia senegal* et d'*Acacia seyal* révèlent le profil de la souche ORS 1009^T après amplification et digestion (Figure 8 a et b). Par contre les extraits d'ADN des nodules récoltés d'*Acacia auriculiformis* montrent après PCR/RFLP 10% du profil de la souche 11C (ORS 1782) et 90% du profil de la souche 13C (ORS 1785).

Les souches contenues dans les nodules d'*Acacia albida*, d'*Acacia mangium* et de *Phaseolus vulgaris* n'ont pas amplifié malgré la bonne qualité et quantité de l'extrait d'ADN. La petite taille des nodules de *Zornia glaucochloa* et d'*Alysicarpus glumaceus* n'a pas permis une extraction d'ADN amplifiable.

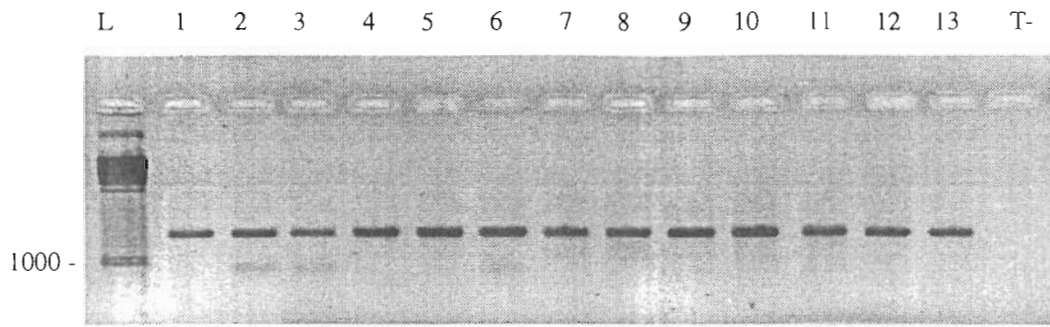


Figure 8a: Electrophorèse sur gel d'agarose (1% w/v) des produits d'amplification de l'IGS (16S/23S). 1 à 13 souches contenues dans 13 nodules provenant de 5 pieds d'*Acacia raddiana* infectés par un inoculum mixte renfermant 8 souches de référence appartenant à 5 genres de *Rhizobium* taxonomiquement différents. L, ladder 100 pb (Pharmacia Biotech); T-, témoin négatif.

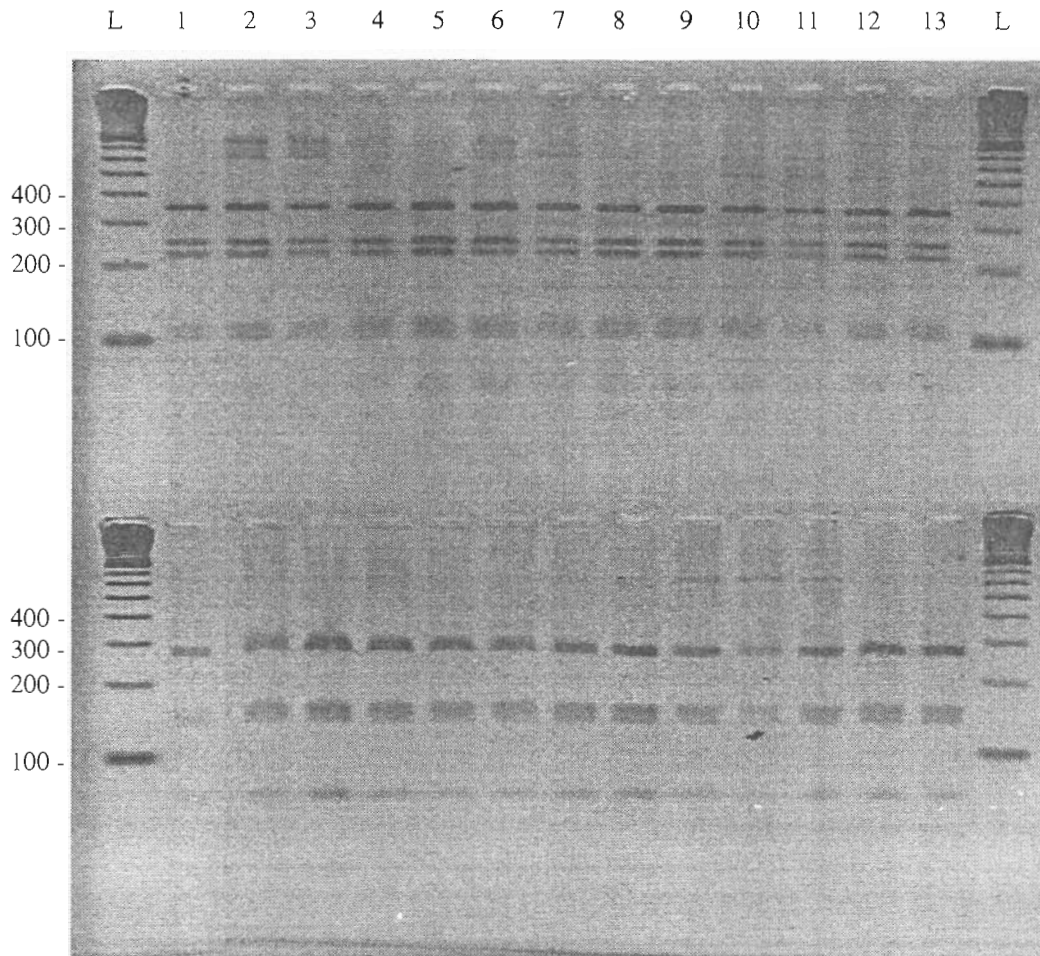


Figure 8b: Electrophorèse sur gel de MetaPhor (2,5% w/v) des produits de restriction obtenus avec les endonucléases *MspI* et *HaeIII* après digestion de l'IGS (16S/23S) amplifié. 1 à 13 le profils de la souche ORS 1009^T; L, ladder 100 pb (Pharmacia Biotech).

Tableau 6: Tableau récapitulatif des résultats de l'applicabilité de la technique de PCR/RFLP à des études de compétition.

	Forme	Nodule		Total/plante	Extraction ADN	Extraction ADN	Evaluation	
		Racine					PCR ADN	Profils
		principale/ plante	secondaire/plante					
<i>Sesbania rostrata</i>	Sphérique	50-60	0	50-60	60	+	+	ORS 571 ^T
<i>Acacia raddiana</i>	Sphérique	25-30	0	25-30	60	+	+	ORS1009 ¹
<i>Acacia senegal</i>	Sphérique	25-3	0	25-30	60	+	+	ORS1009 ¹
<i>Acacia albida</i>	Sphérique	10-15	0	10-15	30	+	-	
<i>Acacia auriculiformis</i>	Sphérique	10-15	0	10-15	50	+	+	90% 13C 10% 11C
<i>Acacia mangium</i>	Sphérique	15-20	0	15-20	30	+	-	
<i>Acacia seyal</i>	Sphérique	10-15	0	10-15	35	+	+	ORS1009 ¹
<i>Alysicarpus glumaceus</i>		0	0	0	0			
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Sphérique	0	2-5	2-5	20	+	-	
<i>Zornia glaucochidiata</i>		0	0	0	0			

+ : réaction positive

- : réaction négative

T : souche type

5. DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

5. Discussion et conclusions

Ce travail s'intègre dans le cadre d'une recherche de l'application de la technique de PCR/RFLP sur différents types de nodules et divers modes de conservations de nodules de différentes espèces de légumineuses. Le but étant d'aboutir à l'optimisation d'un protocole d'extraction et de purification d'ADN de nodules de légumineuses avec une application à des études de compétition entre souches de *Rhizobium*.

Nous avons développé et optimisé un protocole d'extraction directe de l'ADN sur différents traitements de nodule corrélé simultanément à une étape d'isolement bactérien.

Les résultats de nos travaux nous ont permis de proposer des méthodes simples fiables permettant une bonne conservation des nodules en vue d'une applicabilité de la technique de PCR/RFLP sur nodules pour des études écologiques. Ainsi les nodules peuvent être conservés soit: frais, secs, dans du glycérol 60% ou dans l'alcool 70%.

Cependant la conservation dans l'alcool 70% n'est pas très recommandée dans la mesure où l'éthanol 70% en fonction de son pouvoir pénétrant détruit les bactéries ce qui ne permet pas l'isolement ultérieur des *Rhizobium*.. La conservation dans le glycérol à 60% bien que permettant un isolement, présente l'inconvénient majeur d'exiger la conservation des nodules à -80°. Les nodules frais ne peuvent être gardés à l'air libre ou à la température ambiante pendant plus d'une heure après la récolte. Le type de conservation le plus simple et le plus pratique est le séchage des nodules à la température ambiante ou à l'étuve entre 35°C et 40°C pendant dix jours; (des nodules âgés de 60 mois ont été testés à partir de ce type de conservation).

Nous avons pu montrer l'applicabilité directe de la technique de PCR/RFLP sur différents traitements de nodules provenant de plusieurs espèces de légumineuses. Pour cela, nous avons optimisé un protocole d'extraction d'ADN de nodules prélevés des plantes qui a permis d'éviter l'étape d'isolement bactérien. Cette étape devrait être évitée car elle est très longue dans la mesure où, une étape d'isolement bactérien de nodule précédée d'une étape de purification met deux à quatre jours selon le genre auquel appartient la souche à isoler. De plus, l'isolement peut permettre la sélection de certains génotypes compatibles avec les milieux de croissance utilisés.

L'ADN a été extrait par une lyse chimique utilisant le CTAB et le PVPP, qui ont permis d'éliminer assez correctement les composés humiques et phénoliques des nodules et qui pouvaient

inhiber la *Taq* polymérase. L'ADN obtenu est de bonne qualité, puisque l'amplification de fragments de plus de 1000 pb est facilement obtenue. De plus cette méthode d'extraction directe d'ADN de nodules est très rapide dans sa réalisation (moins de 24 heures) et permet donc de reculer les limites des protocoles standards d'extraction d'ADN bactérien qui durent 48 à 72 heures (Porteous et Armstrong 1991; Tsai et Olson, 1991; Zhou *et al.*, 1996; Porteous *et al.*, 1997) et qui sont toujours précédés d'un isolement de *Rhizobium*.. Cependant, l'ADN extrait de nodules peut contenir l'ADN de la plante-hôte, de l'endosymbionte, et de l'ADN de contaminants n'ayant pas été complètement éliminés lors de la désinfection ou lors du pelage des nodules ce qui peut donc nécessiter l'utilisation d'amorces spécifiques. De plus seules deux purifications standards (phénol-chloroforme alcool isoamylique et chloroforme-alcool isoamylique) ont été effectuées; ces purifications peuvent s'avérer insuffisantes en fonction de la nature de sol sur lequel la légumineuse a été cultivée. Notons cependant que les étapes de purifications entraînent toujours une perte d'ADN (Renaud *et al.*, 1998). Il s'agit donc de trouver le meilleur compromis assurant rendement et pureté maximum. Une alternative aux purifications excessives peut consister en une simple dilution de l'ADN.

L'analyse par RFLP des produits d'amplification après extraction d'ADN de nodules nous a permis d'identifier très rapidement les souches de référence introduites dans le sol. en comparaison avec les profils des souches pures de référence.

Dans le cadre de notre étude, la digestion des produits d'amplification des nodules provenant d'une même espèce végétale par deux enzymes de restrictions (*HaeIII* et *MspI*) a permis de distinguer sans ambiguïté le profil d'une des souches de référence, signe de la «présence» d'une seule souche de bactérie dans le nodule. Exceptionnellement, les nodules récoltés des plantes d'*Acacia auriculiformis* montrent une certaine dualité et même dans ce cas, la souche minoritaire n'occupe que 10% des nodules.

Les profils obtenus par l'utilisation de la technique de PCR/RFLP nous ont permis de montrer que la totalité des nodules récoltés d'*Acacia senegal*, (60 nodules) d'*Acacia raddiana*, (60 nodules) d'*Acacia seyal* (50 nodules) est essentiellement occupée par la souche ORS 1009^T. Cette souche isolée d'*Acacia laeta*, est un *Sinorhizobium teranga* *by acaciae*, la souche ORS 1032^T (de Lajudie *et al.*, 1998) est un *Mesorhizobium* isolée d'*Acacia senegal*. Bien que toutes les souches d'*Acacia* nodulent *Acacia raddiana*, *Acacia senegal*, *Acacia nilotica*, *P. juliflora* et *L. leucocephala* en condition de laboratoire (Boivin *et al.*, 1997), et que ces deux genres possèdent les mêmes gènes Nod communs (Lorquin *et al.*, 1997), la souche ORS 1032^T devrait logiquement noduler *Acacia senegal*. La présence de la souche ORS 1009^T dans les nodules de ces trois légumineuses nous

permet de dire que la souche ORS 1009^T est beaucoup plus compétitive que la souche ORS 1032^T et qu'en condition de serre, lorsqu'une bactérie du genre *Sinorhizobium* et une bactérie du genre *Mesorhizobium* sont en compétition, c'est le genre *Sinorhizobium* qui se révèle beaucoup plus compétitive.

Nous avons émis plusieurs hypothèses pour expliquer «l'absence» de la souche ORS 1032^T dans les nodules d'*Acacia senegal*:

1- une différence des gènes Nod spécifiques présents chez ces deux espèces de *Rhizobium* serait peut-être à l'origine d'une meilleure compétitivité de la souche ORS1009^T par rapport aux autres souches d'*Acacia* utilisées dans cette étude notamment la souche ORS 1032^T. Ce résultat suggérerait qu'en conditions de serre ou, les bactéries sont en compétition, la plante exerce une certaine pression de sélection en faveur des souches produisant une population de facteurs Nod présentant des particularités structurales bien définies. Une technique de caractérisation globale des facteurs Nod pourrait donc être intéressante pour le suivi du pouvoir de nodulation et des inoculums. En effet plusieurs travaux effectués par Boivin *et al.*, (1998) ont montré qu'il existe une relation entre la structure des facteurs Nod synthétisés par un *Rhizobium* donné et son spectre d'hôte, indépendamment de sa position taxonomique.

2- elle serait liée à une inhibition de la croissance de la souche ORS 1032^T par la souche ORS 1009^T après une infection simultanée de la plante par ces deux souches.

3- la souche ORS 1032^T n'a peut-être pas pu supporter les conditions de stress environnementaux (acidité, salinité, sécheresse, température...) qui ont probablement modifié la génétique et/ou les propriétés symbiotiques de cette souche (Hoang., 1993) la rendant ainsi moins compétitive par rapport à la souche ORS 1009^T.

L'analyse par RFLP des produits d'amplification de 60 nodules provenant de *Sesbania rostrata* révèle très clairement le profil de la souche ORS 571^T. Ce résultat confirme les analyses faites au laboratoire par Boivin *et al.*, (1997) en rapport avec la spécificité de nodulation de *Sesbania rostrata* par ORS 571^T. Nos résultats montrent qu'en conditions de serre, malgré la présence des souches ORS 604, ORS 609^T qui ont été isolées de *Sesbania, spp*, la totalité des nodules récoltés des plantes de *Sesbania rostrata* est occupée par la souche ORS 571^T. La souche ORS 571^T se montre donc potentiellement plus compétitive que les autres souches de *Rhizobium* isolées de *Sesbania, spp*, à savoir les souches ORS 604 et ORS 609^T et les autres *Rhizobium* présents dans l'inoculum mixte utilisé sur *Sesbania rostrata*, la plante d'isolement.

90% des nodules récoltés des plantes d'*Acacia auriculiformis* ont révélé très clairement les profils de la souche 11C alors que les 10% seulement montrent le profil de la souche 13C. Ces résultats montrent une meilleure compétitivité de la souche 11C par rapport à la souche 13C. En condition naturelle, Galiana *et al.*, 1996, ont remarqué que la souche 13C a une très grande infectivité et effectivité sur les plantes d'*Acacia mangium* par rapport aux souches natives, d'où l'interrogation sur l'issue de ce résultat si nos études avaient été effectuées en milieu naturel.

Quatre souches à savoir ORS 188, ORS 604, ORS 609^T et la ORS 1032^T n'apparaissent dans les nodules d'aucune des espèces de légumineuses utilisées. Il semble que ces souches sont probablement moins compétitives. Mais «l'absence» de ces souches dans les différents nodules des différentes espèces de légumineuses utilisées par la technique de PCR/RFLP devra être considérée avec beaucoup de réserve et cela pour plusieurs raisons:

- (i) l'amplification peut favoriser préférentiellement de l'ADN de la bactérie présente majoritairement dans le nodule.
- (ii) les souches ont peut-être été détruites par l'action de prédateurs ou de facteurs liés au sol réduisant ainsi leur nombre et entraînant leur faible compétitivité.
- (iii) aucune autre méthode pratique ne nous a permis (dans le cas de cette étude) de suivre la dynamique des différentes souches une fois introduites dans le sol.

La souche ORS 188 aurait pu être retrouvée dans les nodules d'*Acacia albida* puisqu'elle a été isolée de cette espèce de légumineuse. Mais malheureusement l'ADN extrait des nodules d'*Acacia albida* n'était pas amplifiable pour des problèmes certainement liés à la qualité des amorces. Le même problème s'est posé avec les nodules de *Phaseolus vulgaris* et *Acacia mangium*.

Ces résultats tout à fait surprenant dans l'occupation de la quasi totalité des nodosités par «une seule» souche pourraient être liés aux facteurs du sol dont les facteurs chimiques (pH, salinité, métaux lourds,...), température, facteurs biologiques et certainement les interactions entre ces facteurs que nous ne contrôlons pas dans cette étude. Cependant plusieurs études ont été effectuées pour évaluer l'effet de ces facteurs. C'est ainsi que Trinick *et al.*, 1983 ont montré qu'à 25°C les souches à croissance rapide sont plus compétitives pour l'occupation des nodules, mais à 30°C, ce sont les souches à croissance lente qui sont plus compétitives, ou présentent une égale compétitivité avec les souches à croissance rapide pour l'occupation des nodules. Ces hypothèses pourront être facilement confirmées ou infirmées par l'utilisation de la technique de PCR/RFLP directe

sur nodules en tenant rigoureusement compte de tous les facteurs qui peuvent influencer la compétitivité des souches.

Ce travail constitue la première étude concernant l'extraction d'ADN bactérien directement de nodules de légumineuses. L'objectif de cette étude visant à extraire directement les acides nucléiques des nodules de différentes espèces de légumineuses afin de leur appliquer les méthodes moléculaires précédemment réservées aux isolats, nous a permis d'occulter les étapes d'isolement et de culture des bactéries. Cette étude nous a permis de révolutionner les méthodologies classiques d'extraction d'ADN de bactéries. La technique de PCR/RFLP appliquée directement sur nodule présente l'avantage de s'affranchir de l'étape d'isolement *in vitro* des microorganismes. Elle apporte non seulement un gain de temps, mais élimine aussi les biais dus à l'étape de l'isolement.

Les résultats acquis dans ce travail nous ont permis de tirer les conclusions suivantes:

- Un ADN bactérien de bonne qualité est extractible et purifiable directement de nodules de légumineuses.

Cet ADN permet de caractériser rapidement par PCR/RFLP les souches de *Rhizobium* contenues dans les nodules.

Les souches de *Rhizobium* peuvent être isolées *a posteriori* pour des études ultérieures.

L'ADN extrait peut être utilisé pour d'autres approches: séquençage, hybridation sur membrane avec des sondes spécifiques.

En perspectives, L'application de cette technique est possible aussi bien pour le suivi de souches inoculées que pour l'étude de la compétition ou de la diversité de populations naturelles. Couplée à d'études technique telles que l'hybridation *in situ*, elle permettra une meilleure connaissance de l'écologie des *Rhizobium* dans le sol, en testant différentes hypothèses sur les relations trophiques entre les organismes et sur l'identification des populations pivots. Ces approches demandent pour être fécondes un approfondissement des modèles déjà maîtrisés pour l'affinage des mesures des activités microbiennes.

6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

6. Références bibliographiques

- AMARGER N. and DELGUTTE D. 1990. Monitoring genetically manipulated *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* released in the field. In the biosafety results on the field test of genetically modified plants and microorganisms (D. R. Mackenzie and S. C., Henry S. C., Eds). Agricultural Research Institute Betchesda, Maryland. 221-228.
- AMARGER N. In current perspectives in microbial ecology. American Society of microbiology, washington, 300-304. In Cours international sur la Fixation Biologique de l'azote Tunisie. 1996
- AMARGER N., MACHERET V. and LAGUERRE G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 996-1006.
- ANYANGO B., WILSON K. and GILLER K. 1998. Competition in Kenyan soils between *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* strain Kim5 and *R. tropici* strain CIAT899 using the *gusA* marker gene. Plant and Soil. 204: 69-78.
- AUSUBEL F. M., BRENT R., KINSTON R. E., MOORE D. D., SEIDMAN J. G., SMITH J.A. and STRUHL (ed.). In. JIZHONG Z., BRUN A. M., and TIEDJE J. M. 1996. DNA Recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol. 62: 316-322.
- AYANABA A., WEILAND K, D. and ZABLOTOWICZ R. M. 1986. Evaluation of diverse antisera, conjugates, and support media for detecting *Bradyrhizobium japonicum* by Enzyme-linked Immunosobent Assay. Appl. Environ. Microbiol. 52: 1132-1138.
- BALLY R., SIMONET P., HAURAT J. and NORMAND P. 1992. Characterization of *Azospirillum irakense* and *Azospirillum lipoferum* by direct sequencing of a PCR amplified 16S rRNA gene. Symbiosis. 13: 47-53.
- BECK D. P. 1992. Yield and nitrogen fixation of chick pea cultivars in response to inoculation with selected rhizobial strains. Agron. J. 84: 510-516.
- BOIVIN. C. and DENARIE J. 1998. La symbiose *Rhizobiums*-Légumineuses: Génés et signaux de nodulation en perspective. Bull. Soc. Fr. Microbiol. 13 (3): 226-228.
- BOTTOMLEY P. J. 1992. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. In Biological nitrogen fixation (G. Stacey, R. H. Burris , H. J Evans, eds). Chapman and Hall. New York, London. 293-348.
- BREMNER J. M. and MULVANEY C. S. 1982. Nitrogen-total. In: Page Al (eds) Methods of soil analysis, part 2 Am Soc Agron, Madison, Wisconsin. 595-624.
- BRILL W. 1981. Agriculture et microbiologie. Pour la science. 66-79.
- BROMFIELD E. S. P., WHEATCROFT R. and BARRAN L. R. 1994. Medium for direct isolation of *Rhizobium meliloti* from soil. Soils. Biol. Biochem. 26: 423-428.
- CAETANO-ANOLLES G., BASSAM B. J., and GRESSHOFF P. M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio/ Technology. 9: 553-557.
- CATROUX G. and AMARGER N. Rhizobia as soil inoculants in agriculture. In Cours international sur la Fixation Biologique de l'azote Tunisie. 1996.

- CHANDLER D. P., FREDRICKSON J. K. and BROCKMAN F. J. 1997. Effect of PCR temple concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol. Ecol.* 6: 475-482.
- CHEN W. X., LY G. S., QI Y. L., WANG E. T., YUAN H. L. and LI J. L. 1991. *Rhizobium Huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 275-280.
- CHEN W. X., WANG E. T., WANG S. Y., LY Y. B., CHEN X. Q. and LI Y. 1995. Characteristic of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly grown root nodule bacterium isolated from an acid saline environment in Xingjian, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 153-159.
- CLEYET-MAREL J. C. 1987. Dynamique des populations de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* dans le sol et la rhizosphère. Doctorat d'Etat es-Sciences université Claude Bernard-Lyon I., 240. In Cours international sur la Fixation Biologique de l'azote Tunisie. 1996.
- CROZAT Y. 1983. Caractérisation du pouvoir saprophyte des souches de *Rhizobium japonicum* dans le sol à l'aide de l'immunofluorescence. In Cours international sur la Fixation Biologique de l'azote Tunisie. 1996.
- DANSO S. K. and OWIREDU J. D. 1988. Competitiveness of introduced of indigenous cowpea *Bradyrhizobium* strains for nodules formation on cowpeas (*vigna unguiculata* (L.) Walp) in tree soils. *Soils Biol. Biochem.* 20: 305-310.
- DE LAJUDIE P., LAURENT-FULELE E., WILLEMS A., TORCK U., COOPMAN R., COLLINS M. D., L., KERSTERS K., DREYFUS B. and GILLIS M. 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1277-1290.
- DE LAJUDIE P., WILLEMS A., NICK G., MOREIA F., MOLOUBA F., HOSTE B., TORCK U., NEYRA M., COLLINS M; D., LINDSTRÖM K., DREYFUS B. and GILLIS M. 1998. Characterisation of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 369-382.
- DE LAJUDIE P., WILLEMS A., POT B., DEWETTINCK D., MAESTROJUAN G., NEYRA M., COLLIN M. D., DREYFUS B. L., KERSTERS K., and GILLIS M. 1994. Polyphasic taxonomy of Rhizobia. Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 715-733.
- DOWLING D. N. 1986 and BROUGHTON W. J. Competition for nodulation of legumes. *Ann Rev. Microbiol.* 40: 131-157.
- DREYFUS, B. L., ELMERICH C. and DOMMERGUES Y. R 1983. Free-living Rhizobium strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. *Appl. Environm. Microbiol.* 45: 711-713.
- DREYFUS, B.L., GARCIA J.L. and GILLIS M. 1988. Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., a stem nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 89-98.
- EAGLESHAM A. R. J., AHMAD M. H., HASSOUNA S. and GOLDMAN B. J. 1982. Cowpea Rhizobium producing dark nodules: use in competition studies *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 611-618.
- ELHASSAN G. A., HERNANDEZ B. S. and FOCHT D. D. 1986. Comparison of hup trait and intrinsic antibiotic resistance for assessing rhizobia competitiveness axenically and in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 546-551.

- FARRELLY V., RAINEY F. A., and STACKEBRANDT E. 1995. Effect of genomes size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA gene from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2798-2801.
- GALIANA A. and PRIN Y. 1996. The benefits of rhizobial inoculation in tropical forestry: reponse of *Acacia mangium* to the application of selected strain of *Bradyrhizobium spp.* *Tree Improvement for Sustainable Tropical Forestry.* 449-454.
- GALIANA A., CHAUMONT. J, DIEM. G. H., and Y. R. DOMMERGUES. Nitrogen-fixing of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* sedings inoculated with *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*.
- GEBHARDT C., TURNER G. L., GIBSON A. H., DREYFUS B. L., and BERGERSEN F. J. 1984. Nitrogen-fixing growth in continuous culture of a strain of *Rhizobium* sp. isolated from stem nodules on *Sesbania rostrata* . *J. Gen. Microbiol.* 130: 843-848.
- GOULLET P. 1980. Esterase electrophoretic pattern relatedness between *Shigella* species and *Escherichia coli*. *J Gen. Microbiol.* 177: 493-500.
- HALILA H. Les légumineuses alimentaires en Tunisie: Situation actuelle et perspectives d'amélioration. p: 1-9. In *amelioration des légumineuses alimentaires en Afrique du nord.* INRAT-ICARDA (Ed.). 122p.
- HAM G. E. CALDWELL V. B. and JOHNSON H. W. 1971. Evaluation of *Rhizobium japonicum* inoculants in soils containing naturalized populations of rhizobia. *Agron. J.*, 63: 69-72. In *Cours international sur la Fixation Biologique de l'azote Tunisie.* 1996.
- HIRSCH P. R. and J. D. SPOKES. 1994. Survival and dispersion of genetically modified rhizobia in the field and genetic interations with native strains. *FEMS Microbiol. Ecology.* 15: 147-160.
- HOANG G. DIEM. 1993. Reexamen des critères de sélection des souches de *Rhizobium* utilisées en agriculture. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 8: 12, 83-87.
- HOLBEN W. E., JANSSON J. K., CHELM K. B. and TIEDJE J. M. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 703-771.
- HUBERT T. A., AGARWAL A. K. and KEISTER D. L. 1984. Extracllular polysaccharide composition, *explanta* nitrogenase activity, and DNA homology in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 158: 1168-1171.
- JARVIS B. D. W., VAN BERKUM P., CHEN W. X., NOUR S. M., FERNANDEZ M. P., CLEYET-MAREL J. C. and GILLIS M. 1997. Transfer of *Rhizobium loti* , *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tanshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 895, 898.
- JENSEN M. A., WEBSTER J. A. and STRUS N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of poymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 945-952.
- JORDAN D. C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodulebacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 136-139.
- KEATINGE J. D. H., CHAPANIAN N. and SEXENA M. C. 1988. Effet of improved management of legumes in a legume cereal rotation of field estimates of crop nitrogen uptake and symbiotic nitrogen fixation in northern Syria. *J. Agric. Sci. Camb.* 110: 651-659.

- KINKLE B. K. and SCHMIDT E. L. Stability of monoclonal antibody determinant in soil populations of *Bradyrhizobium japonicum*. Soil. Biol. Biochem. 1992, 24, 819-820.
- KISHINEVSKY B. and BAR-JOSEPH M. 1978. Rhizobium strain identification in *Arachis hypogea* nodules by Enzyme-linked Immunosobent Assay (ELISA). Can. J. Microbial. 24: 1537-1543.
- KUYKENDALL L. M., ROY M. A., O'NEILL J. J., and DEVINE T. E. 1988. Faty acid, antibiotic resistance, and deoxyribonuclic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum* . Int. J. Syst. Bacteriol. 91: 271-279.
- KUYKENDALL L.M., SAXENA B., DEVINE T. E. and UDELL S.E. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. Can. J. Microbiol. 38: 501-503.
- LAGUERRE G., BARDIN M. and AMARGER N. 1993. Isolation from soil of symbiotic and nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA hybridization. Can. J. Microbiol., 39: 1142-1149.
- LAGUERRE G., FERNANDEZ M.P., EDEL V., NORMAND P. and AMARGER N. 1993. Genomic heterogeneity among french *Rhizobium* isolated from *Phaseolus vulgaris* L. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 761-767.
- LAGUERRE, G., M. R. ALLARD, F. REVOY and N. AMARGER. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragments length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol. 60: 56-63.
- LARSEN N. G, OLSEN B. L. MAIDAK M. J., McCAUGHEY M; J. OVERBEEK R., MACKE T. J., MARSH T. L., and WOESE C. R. The ribosomal Database project. Nucleic Acids Res. 21. 3021-3023.
- LIESACK W., WEYL H. and STACKEBRANDDT E. 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. Microb. Ecol. 21: 191-198.
- LINDSTRÖM K. 1989. *Rhizobium galegae* a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst Bacteriol. 39: 365-367.
- LORQUIN J., LORTET G., FERRO M., MEAR N., PROMÉ J-C. and BOIVIN C. 1997. *Sinorhizobium terangae* bv. acaciae ORS1073 and *Rhizobium* sp. strain ORS1001, Two Distantly related Acacia-nodulating Strains, Produce Similar Nod Factors That Are O Carbamoylated, N Methyllated, and Mainly Sulfated. American. Society. For Microbiol. 179: 3079-3083.
- LORTET G., MEAR N., LORQUIN J., DREYFUS B., DELAJUDIE P., ROSENBERG C. and BOIVIN C. 1996. Nod Factor TLC profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of Rhizobial strains: Application to *Sinorhizobium saheli*, *Sinorhizobium terangae* and *Rhizobium* sp. strains isolated from Acacia and Sesbania. American. Phytho. Society. 9: 736-747.
- LOUVRIER P. diversité et structures des populations *Rhizobium leguminosarum* bv viciae isolés du sol, de rhizosphère et des nodosités racinaires du pois (*Pisum sativum*) et de la féverole (*vicia sativa* L.) Thèse. université Bourgogne. In Cours international sur la Fixation Biologique de l'azote Tunisie. 1996.
- MARTINEA-ROMERO E., SEGOVIA L., MARTIN F., FRANCO A. A., GRAHAM P. and PARDO M. A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. tree. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 417-426.

- MARTINEZ-ROMERO E. and CABALLERO-MALLADO J. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. Crit. Rev. Plant Sci. 15: 113-140.
- MINAMISAWA K. 1989. Comparaison of extracellular polysaccharides composition, ribotoxine production, and hydrogenase phenotype of strain of *bradyrhizobium japonicum*. Plant Cell Physiol. 30: 877-884.
- MUROOKA Y., XU Y., SANADA K., ARAKI M., MORINAGA T. and YOKATA A. 1993. Formation of root nodules by *Rhizobium Huakuii* biovar *renge* bv. nov. on *Astragalus sinicus* cv. Japan. J. Ferment. Bioeng. 76: 38-44.
- MURRAY M. G. and THOMPSON W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight-plant-DNA. Nucl. Ac. Res. 8: 4321-4325.
- MYTTON L. R. MCADAM N. J. and PORTLOCK P. 1978. Enzyme polymorphism as an aid to identification of *Rhizobium* strains. Soils Biol. Biochem. 10: 79-80.
- NALIN R., RANJARD L., NAZARET S. and SIMONET W. P. 1998. La biologie moléculaire en écologie microbienne du sol: application à l'analyse de la structure des communautés bactériennes. Bull. Soc. Fr. Microbiol. 13: 21-26.
- NAVARRO, E., SIMONET, P. NORMAND, and R. BARDIN. 1992. Characterization of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. Arch. Microbiol. 157: 107-115.
- NEYRA M. Communication personnelle.
- NEYRA M., KHBAYA B., de LAJUDIE P., DREYFUS B., and NORMAND P. 1998. Computer-assisted selection of restriction enzymes for *rrs* genes PCR-RFLP discrimination of rhizobial species. Genet. Sel. Evol. 30: 227-309.
- NICK G. 1998. Polyphasic Taxonomy of Rhizobia Isolated from Tropical Tree Legumes. Thesis University of Helsinki.
- NOUR S. M., FERNANDEZ M.P., NORMAND P. and CLEYET-MAREL J.C. 1994b. *Rhizobium ciceri* sp. nov. consisting of strains nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 511-522.
- NOUR S.M. CLEYET-MAREL J. C., NORMAND P. and FERNANDEZ M. P. 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 640-648.
- OSBORN A. M.; BRUCE K. D., STRIKE P. and RITCHIE A. 1993. Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism analysis shows divergence among *mer* determinants from gram negative soil bacteria indistinguishable by DNA-DNA hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 59: 4024 - 4030.
- PICARD C., PONSONNET C., PAGET E., NESME X. and SIMONET P. 1992. Detection of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2717-2722.
- PONSONNET, C. and X. NESME. 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR/RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. Arch. Microbiol. 16: 300-309.
- PORTEOUS L. A. and ARMSTRONG J.L. 1991. Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method. Current. Microbiol. 22: 345-348.

- PORTEOUS L. A.; SEIDLER R. J. and WATRUD L. S. 1997. An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Mol. Ecol.* 62: 3905-3907.
- RALPH, D., M. MCCLELLAND, J. WELSH, G. BARANTON. and P. PEROLAT. 1992. *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR amplified rRNA genes. *J. Bacteriol.* 175: 973-981.
- REYSENBACH A. L., GIVER L. J., WICKHAM G. S. and PACE N. R. 1992., Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3417-3418.
- RINAUDO G., ORENGA S., FERNANDEZ M., MEUGNIER H. and BARDIN R. 1991. DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem-and root nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 144-120.
- ROME S., FERNANDEZ M. P., BRUNEL B., NORMAND P. and CLEYET-MAREL J-C. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 972-980.
- ROUVIER C., PRIN Y., REDDELL P., NORMAND P. and 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: 979-985.
- SAIKI R. K., GELFAND D. H., STOFFEL S., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G. T., MULLIS K. B. and ERLICH H. A. 1988., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487-491.
- SCHWENCKE J. 1991. Rapid, exponential growth and increased biomass yield of some Frankia strains in buffered and stirred mineral medium (BAP) with phosphatidylcholine. *Plant and Soil.* 137: 37-41.
- SEGOVIA L., YOUNG J. P. W., and MARTINEZ-ROMERO E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains in a new species, *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 374-377.
- SEGOVIA L., YOUNG J. P. W., MARTINEZ-ROMERO E. 1993. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseolus* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*
- SELANDER R. K., CAUGANT D. A., OCHAAN H., MUSSER J. M., GILMOUR M. N. and WHITTMAN T. S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 873-884.
- SESSITSCH A., HARDARSON G., DE VOS W. M., and WILSON J. K. 1998. Use of marker genes in competition studies of *Rhizobium*. *Plant and Soil.* 204: 35-45.
- SIMONET P., NORMAND P., MOIROUD A. and BARDIN R. 1990. Identification of Frankia strains in nodules by hybridation of polymerase chain reaction products with strain-specific oligonucleotide probes. *Arch. Microbiol.* 153: 235-240.
- SULLIVAN J. T., EARD B. D., P. VAN BERKUM and RONSON C. W. 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1426-1434.

- SULLIVAN J. T., PATRICK N. H. LOWTHER W. L, SCOTT D. B. and RONSON C. W. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 8985-8989.
- SUZIKI M. T. and GIOVANNONI S.J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62: 625-630.
- THIES J. E., BEN BOHLOOL B. and SINGLETON P. W. 1992. Environmental effects on competition for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced strains. Can. J. microbiol. 38: 493-500.
- TSAI Y. L. and OLSON B. H. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1070-1074.
- TSAI Y. L. and OLSON B. H. 1992. Detection of low number of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58: 754-757.
- VELEZ D. MACMILLAN J. D. and MILLER L. 1988. Production and use of monoclonal antibodies for identification of *Bradyrhizobium japonicum* strain. Can. J. Microbiol. 34: 88-92.
- WANG E. T., VAN BERKUM P., SUI H. X., BEYENE D., CHEN X. W. and MARTINEZ-ROMERO. 1999. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov.
- WANG G. C. Y., and WANG Y. 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3972-3976.
- WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A. and TINGEY S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic. Acids Res. 18, 6531-6535.
- WILSON I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3741-3751.
- WOLFF A. B., STREIT W., KIPE-NOLT J. A., VARGAS H. and WERNER D. 1991. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. Biol. Fertil. Soils. 12: 170-176.
- XU L. M., GE C., CUI Z., LI J. and FAN H. 1995. *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 706-711.
- YOUNG J. P. W. and HAUKKA K. E. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. New Phytol. 133: 87-94.
- YOUNG J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organism. In PRIN Y., GALIANA A., DUCOUSSO M., DUPUY N., DELAJUDIÉ P. and NEYRA M. 1993. LES RHIZOBIMUM D'ACACIA, biodiversité et taxonomie. Bois et Forêts des Tropiques, 4^e trimestre. 238: 5-18.
- YOUNG J. P.W., DOWNER H. R. and EARDLY B. D. 1991. Phylogeny of phototrophic *Rhizobium* strain BTail by polymerase chain reaction-base sequencing of 16S rRNA gene segment. J. Bacteriol. 173: 2271-2277.
- ZHOU J., BRUNS M. A. and TIEDJE J. M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol. 62: 316-322.

ANNEXE

Protocole d'extraction d'ADN bactérien directe de nodules

PREPARATION DES SOLUTIONS:

Travailler dans des conditions DNAase-free: Eppendorf stériles, eau ultra-pure, porter des gants.

Travailler sous une hotte aspirante lors de l'utilisation des solvants.

EDTA 0,5 M pH 8 (Solution mère)

Quantité: Solution mère de 100 ml.

Intérêt: EDTA inhibe les DNAases par capture du calcium nécessaire au fonctionnement des enzymes.

Produits:

EDTA SIGMA Molecular biology: **18,6 g**

Eau ultra-pure: **100 ml**

Protocole:

- Ajuster au pH 8 avec environ 2 g de NaOH en granules, jusqu'à la dissolution de l'EDTA (celle-ci n'apparaît pas avant pH 8).

- Compléter à 100 ml avec de l'eau ultra-pure.

- Conserver à +4°C

Acétate de sodium 3M

Quantité: 1/10 du volume du surnageant prélevé à la dernière phase d'extraction

Intérêt: Précipitation des acides nucléiques.

Produits:

Acétate de sodium: **24,6 g**

Eau ultra-pure: **100 ml**

Protocole:

- Dissoudre 24,6 g d'Acétate de sodium dans 100 ml d'eau ultra-pure.
- Aliquoter en tubes Eppendorf stériles.
- Conserver à la température ambiante.

Tris - HCl 0,5 M pH 8(Solution mère)

Quantité: Solution mère de 100ml.

produits:

Tris-HCl: **6,06g**

Eau ultra-pure **100ml**

Protocole:

- Dissoudre 6,06 g de Tris-HCl dans 100ml d'eau ultra-pure.
- Ajuster le pH à 8.
- Aliquoter en falcon.
- Conserver à +4°C.

PVPP (PolyVinylPolyPyrolidone) insoluble lavé à l'acide

Quantité: 1g dans 100 ml du tampon d'extraction

Intérêt: première étape de purification de l'échantillon, face aux composés humiques et aux polyphénols.

Produits:

PVPP (PolyVinylPolyPyrolidone) Sigma ref P- 6755: 50g

HCl 10%: 500ml

Tp Phosphate de Potassium 100 mM (5X):2l

Tp Phosphate de Potassium 20 mM (5X):3 à 5l

Protocole:

- Ajouter 50g de PVPP dans 500 ml d'HCl 10%
- Laisser à température ambiante durant 12 à 16 h

- Filtrer le PVPP sou vide, sur deux couches de filtre Wathman n°1
- Neutraliser le PVPP en versant successivement sur le filtrat le tampon Phosphate de Potassium 5X (2l) puis 1X (3 à 5 l)
- Vérifier le pH du liquide résultant de la filtration
- Sécher durant une nuit le PVPP réduit en poudre, dans un dessiccateur sous vide
- Conserver dans une bouteille ambrée à température ambiante.

Ethanol absolu

Intérêt: précipitation des acides nucleiques

Protocole:

Conserver à -20°C au cours de la manipulation.

Eau ultra-pure

Protocole

•Stériliser 30 mn à 110°C, aliquoter dans des tubes Eppendorf stériles et conserver à -20°C

TAMPON D'EXTRACTION

Concentration initiale

Concentration finale

TrisHCl pH 8 1M	ajouter	10ml	TrisHCl pH 8 100 mM
NaCl 5M	ajouter	28ml	NaCl 1,4 M
EDTA 0,5M	ajouter	4ml	EDTA 20mM
CTAB	ajouter	2g	CTAB 2%
		QSP 100ml	
PVPP	ajouter	1g	PVPP 1%

Le PVPP ne se dissout pas, c'est normal.

AUTOCLAVER à 110°C pendant 30 min.

Préparation du marqueur de taille (1kb, 100pb)

10 μ l de ladder 1kb, 100pb,...)

40 μ l de bleu de charge

50 μ l d'eau ultra-pure stérile

Composition du bleu de charge 10X

à utilisé au 1/10^{ème}

0,25%(w/v)	242,2g
30% glycérol	18,54g
10mM d'EDTA	57,1g
H ₂ O	qsp 1 litre

TAMPON Tris-borate (TBE) 10X

Tris-base	108g
Na ₂ EDTA,2H ₂ O	7,44g
Acide borique	55g
H ₂ O	qsp 1 litre

Bromure d'éthidium

La solution de BET à 10mg/ml:

à protéger de la lumière, conserver à 4°C, manipuler impérativement avec des gants.

Premier jour

Etapes:

1. Dans une boîte de petri, désinfecter le nodules au HgCl_2 0,1% pendant 1min.
2. Rincer dans l'eau ultra-pure stérile.
3. Peler¹ le nodule à l'aide d'un scalpel stérile sous hotte
4. Mettre le nodule pelé dans un Eppendorff stérile puis ajouter 300 μ l de tampon d'extraction.
5. Broyer le nodule à l'aide d'un poter en plastique
6. Laisser au bain marie 65°C pendant 1 heure pour la lyse des bactéries
7. Centrifuger à 13000 rpm pendant 10 min
8. Récupérer le surnageant
9. Ajouter 1 volume de Phénol Chloroforme Alcool isoamylique (25:24:1)
10. Centrifuger à 13000 rpm à la température ordinaire pendant 15 min pour séparer les phases aqueuse et phénolique
11. Reprendre le surnageant aqueux dans un tube Eppendorf 1,5 ml
12. Ajouter 1 volume de Chloroforme Alcool isoamylique (24:1)
13. Centrifuger à 13000 rpm à la température ordinaire pendant 15 min pour séparer les phases aqueuse et phénolique
14. Reprendre le surnageant aqueux dans un tube Eppendorf 1,5 ml
15. Centrifuger à 13000 rpm pendant 5 min
16. Récupérer le surnageant aqueux dans un tube Eppendorf 1,5ml
17. Ajouter au surnageant 1/10 d'Acetate de Sodium 3M et 2,5 volume d'éthanol absolu. On doit pouvoir observer la précipitation de l'ADN
18. Mélanger doucement
19. Laisser précipiter toute la nuit à -20°C

Deuxième jour

20. Centrifuger à 13000 rpm à 4°C pendant 30 min

21. Le culot doit être visible (noter le sens du tube dans la centrifugeuse), on jette le surnageant qui contient phénols et contaminants
22. Reprendre le culot dans 300 µl d'éthanol 70% pour laver le culot
23. Centrifuger à 13000 rpm à 4°C pendant 15 min
24. Jeter le surnageant
25. Laisser sécher les tubes au Speed Vac pendant 30 min
26. Reprendre le culot dans 20 µl d'eau ultra-pure
27. Centrifuger pendant 30 s pour obtenir une solution translucide
28. Stocker les échantillons à -20°C

Composition du milieu YM et YMA (Vincent, 1970)
--

Mannitol	10g
Glutamate Na	0,5g
K ₂ HPO ₄	0,5g
NaCl (1 ml de solution à 50 mg/ml)	0,05g
Solution T (MgSO ₄ , 7H ₂ O à 10 g/l)	10ml
Solution U (CaCl ₂ à 40 g/l)	1ml
Solution V (FeCl ₃ à 4g/l)	1ml
Extrait de levure	1g
Eau distillée ml	qsp 1000
Agar	20g

Ajuster le pH à 6,8 (HCl N/10) et stériliser 30 min à 110°C

Composition du milieu YL et YLA (Vincent, 1970)
--

Lactate Na	16ml
K ₂ HPO ₄	1,67g
KH ₂ PO ₄	0,87g
K ₂ HPO ₄	0,5g
NaCl (1 ml de solution à 50 mg/ml)	0,05g
Solution T (MgSO ₄ , 7H ₂ O à 10 g/l)	10ml
Solution U (CaCl ₂ à 40 g/l)	1ml
Solution V (FeCl ₃ à 4g/l)	1ml
Oligoelements de Jensen	1ml
Extrait de levure	1g
Glutamate Na (ou (NH ₄) ₂ SO ₄)	1g
Eau distillée qsp 1000ml	

Agar	20g
------	-----

Ajuster le pH à 6,8 (Hcl N/10) et stériliser 30 min à 110°C

Oligoelements de Jensen

H ₃ BO ₃	2,86g
MnSO ₄ ,4H ₂ O	2,03g
ZnSO ₄ ,7H ₂ O	0,22g
CuSO ₄ ,5H ₂ O	0,08g
Na ₂ MoO ₄ ,2H ₂ O	0,09g
H ₂ O qsp	1000ml

1. Souches bactériennes

Les principales caractéristiques des souches de rhizobia utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau 2.

1.1. Milieu et conditions de culture des souches bactériennes

Les souches bactériennes de référence utilisées ont été repiquées séparément dans des boîtes de Petri contenant du milieu YMA (Yeast Extract Manitol) puis mises en incubation à 28°C. Elles proviennent toutes de la collection ORS (ORSTOM). Toutes les souches ont été conservées à -80°C dans des cryotubes en milieu complet contenant du glycérol 20% en volume final.

Après vérification de la pureté des colonies à la loupe puis au microscope, pour chaque souche bactérienne repiquée, deux colonies sont cultivées séparément dans deux fioles d'Erlenmeyers de 250 ml contenant 150 ml du milieu liquide YM pour les *Bradyrhizobium*, les *Sinorhizobium* les *Mesorhizobium* et du milieu YL pour les *Azorhizobium*. Les cultures ainsi réalisées en condition aseptique sous hotte à flux laminaire sont mise à incuber sous agitation (Orbit Shaker, Bioblock) à environ 170 rpm à une température de 28°C. Le temps d'incubation est de 96 heures pour les souches de *Bradyrhizobium* et de 48 heures pour les souches de *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et les *Azorhizobium*.

1.2. Préparation de l'inoculum

Dans le but d'avoir approximativement pour chaque souche de référence le même nombre de bactéries dans l'inoculum mixte, deux méthodes de quantifications ont été utilisées.

1.2.1. Mesure de la DO (densité optique) pour quantification bactérienne

Les suspensions bactériennes de même souche contenues dans deux fioles d'Erlenmeyers de 250 ml sont mélangées dans une fiole d'Erlenmeyer de 500 ml. Après agitation, la densité optique à 600 nm (DO_{600}) de la suspension est enregistrée à l'aide du spectrophotomètre (Berkman DU 40) avec une cuve de 1 cm de trajet optique. L'inoculum final est obtenu en mélangeant dans une fiole d'Erlenmeyer de 3000 ml préalablement stérilisé un volume contenant environ 10^9 bactéries/ml (en fonction de la DO_{600}) de chaque souche bactérienne des souches de référence en phase exponentielle de croissance.

En effet les différentes suspensions bactériennes n'ayant pas les mêmes densité optique à 600 nm, donc ne contenant pas les mêmes nombres de bactéries, la formule $C_1V_1=C_2V_2$, permet à

Tableau 2: Liste des souches de référence, des souches type, des différentes espèces d'*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et de *Mesorhizobium*.

Espèces	Souche	plante hôte d'isolement	origine Géographique	Référence
<i>Azorhizobium</i> <i>A. caulinodans</i>	ORS 571 ^T	<i>Sesbania rostrata</i>	Senegal (Ferlo)	Dreyfus <i>et al.</i> , (1988).
<i>Bradyrhizobium</i> <i>B. sp</i>	ORS 188	<i>Acacia albida</i>	Senegal (Ferlo)	Dupuy <i>et al.</i> , (1993)
<i>B. sp</i>	11C	<i>Acacia auriculiformis</i>	Australie (Bloomfield)	Galiana <i>et al.</i> , (1996)
<i>B. sp</i>	13C	<i>Acacia mangium</i>	Australie (Daintree)	Bremner <i>et al.</i> , (1982)
<i>Sinorhizobium</i> <i>S. saheli</i>	ORS 609 ^T	<i>Sesbania cannabina</i>	Senegal (Bel-air)	de Lajudie <i>et al.</i> , (1994)
<i>S. terangae</i> biovar <i>acaciae</i>	ORS 1009 ^T	<i>Acacia laeta</i>	Senegal (Bel-air)	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
biovar <i>sesbaniae</i>	ORS 604	<i>Sesbania aculeata</i>	Senegal (Bel-air)	de Lajudie <i>et al.</i> , (1994)
<i>Mesorhizobium</i> <i>M. plurifarium</i>	ORS 1032 ^T	<i>Acacia senegal</i>	Senegal (Camberène)	de Lajudie <i>et al.</i> , (1998)

partir de la DO_{600} de calculer le volume précis de suspension bactérienne de chaque souche à additionner pour la formation de l'inoculum final.

1.2.2. Dénombrement des bactéries

Le dénombrement des colonies de chaque souche bactérienne se fait de la manière suivante: Sous une hotte à flux laminaire on prélève 100 μ l de chaque suspension de la même souche de référence qu'on met dans un tube d'Eppendorf stérile pour obtenir un volume final de 200 μ l. Après avoir vigoureusement vortexer le contenu de l'Eppendorf, on le conserve à 4°C pour éviter toute nouvelle multiplication des bactéries. Ce mélange qui constitue la solution mère est utilisé pour réaliser des dilutions à l'aide d'une solution d'eau physiologique de NaCl à 0,9% (w/v). Le comptage se fait avec les dilutions à 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Pour chaque dilution, 100 μ l sont déposés stérilement en boîte de Pétri sur milieu YMA (YLA pour la souche ORS 571) contenant 10 billes stériles à raison de trois répétitions pour chaque dilution. Les boîtes de Pétri sont vigoureusement agitées afin de permettre une répartition plus ou moins homogène sur toute la surface de la goutte de suspension bactérienne. Les boîtes sont scellées par un film de parafine pour éviter toute contamination et sont mises en incubation dans l'étuve à 32°C.

Après 48 heures d'incubation les boîtes de Petri contenant les souches à croissance rapide laissent apparaître des colonies dont le nombre décroît en fonction de la dilution. Le comptage se fait sous une lampe fluorescente.

2. Culture des plantes

Les espèces de légumineuses testées pour leur capacité à être nodulées par les différents genres de *Rhizobium* choisis, proviennent de diverses régions du Sénégal de la France et de l'Australie. Les graines d'*Alysicarpus glumaceus*, d'*Acacia albida*, *Acacia raddiana*, *Acacia senegal*, *Acacia seyal*, de *Sesbania rostrata* et de *Zornia glaucochloa* proviennent du laboratoire de microbiologie de l'IRD (ex ORTOM) de Bel-Air (Sénégal), les graines d'*Acacia auriculiformis* et d'*Acacia mangium* proviennent d'Australie, celles de *Phaseolus vulgaris* proviennent de Contender (France).

2.1. Germination des graines en conditions stériles.

Dans le but de lever l'inhibition tégumentaire et de les désinfecter superficiellement, les graines sont plongées dans des composés organiques pendant des temps variables en fonction des espèces (tableau 3). Les graines sont abondamment rincées à l'eau bidistillée stérile pour faciliter leur germination. Les graines sont ensuite déposées dans des boîtes de Petri contenant de l'eau

gélifiée 8g/l. Ces opérations sont effectuées en condition aseptique sous hotte à flux laminaire. Les graines sont incubées à l'obscurité dans une chambre thermostatée à 32°C. Le temps de germination varie selon les espèces (tableau 3). Les graines prégermées sont ensuite mise en culture.

2.2. Inoculation des plantes

Après homogénéisation par agitation grâce à un barreau magnétique pendant 5 minutes de l'inoculum mixte contenant environ le même nombre de bactéries pour chacune des souches de référence, un volume total de 2400 ml nous a permis d'infecter 240 gaines contenant du sable stérile de plage préalablement humidifié. 8 ml ont été utilisés pour infecter chaque gaine.

2.3. Culture en pépinière.

24 heures après l'inoculation, les jeunes plants sont repiqués dans des gaines en plastiques noir percées. 20 répétitions sont effectuées pour chacune des espèces de légumineuses utilisées. Les plantes sont disposées dans l'ombrelle et sont périodiquement arrosées toutes les 48 heures à l'eau distillée stérile afin de limiter l'apport d'autres microorganismes.

Tableau 3: Temps de désinfection, d'imbibition et de germination des graines des plantes étudiées.

Espèces végétale	Origine	Temps de désinfection			Temps d'imbibition	Temps de germination
		Alcool 96 %	HgCl ₂ 1‰	H ₂ SO ₄ 96 %		
<i>Alysicarpus glumaceüs</i>	Bel-Air	-	-	15 min	1 nuit	24 h
<i>Acacia albida</i>	Bel-Air	-	-	1 h	1 nuit	24 h
<i>Acacia auriculiformis</i>	Australie	-	-	1 h	1 nuit	24 h
<i>Acacia mangium</i>	Australie	-	-	1 h	1 nuit	24 h
<i>Acacia raddiana</i>	Bel-Air	-	-	1 h	1 nuit	24 h
<i>Acacia senegal</i>	Bel-Air	-	-	14 min	1 nuit	24 h
<i>Acacia seyal</i>	Bel-Air	-	-	30 min	1 nuit	24 h
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Contender	3 min	5 min	-	4 h	48 h
<i>sesbania rostrata</i>	Bel-Air	-	-	1 h	1 nuit	24 h
<i>Zornia glauchidiata</i>	Souilène	-	-	1 h	1 nuit	24 h

- : Traitement non réalisé.