

Rapport de stage

Septembre-Décembre 1998

**Etude Taxonomique et Caractérisation des Bactéries Fixatrices
d'Azote nodulant les Caesalpinioideae de la Sous-Famille des
Cassieae (Cassia, Chamaecrista et Senna).**

par

Ibrahima Ndoeye
Maître de conférence

UCAD

**Faculté des Sciences et Techniques
Département de Biologie Végétale**

et

*Chercheur associé au Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'IRD,
Dakar*

Stage effectué au laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes
(LSTM, Laboratoire Commun IRD/CIRAD/INRA-ENSAM)
Campus du CIRAD, Baillarguet, Montpellier.
dans le cadre du programme de bourses SSHN
(pour séjour scientifique de haut niveau).

Remerciements

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

Je remercie très sincèrement le Dr. Bernard Dreyfus de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour le soutien et l'intérêt porté à mes recherches.

Le Dr. Eric Giraud a eu la rude tâche de m'initier à des techniques de biologie moléculaire. Malgré des occupations multiples, il a su faire preuve de patience pour supporter mes incompétences multiples. Je lui en suis profondément reconnaissant. Je n'oublierai pas dans son équipe, Mme Laure Hannibal et les étudiants en thèse Mme Clémence Chaintreuil, Messieurs. Abdoulaye Sy et Salif Bâ pour l'assistance qu'ils m'ont apportée.

Mes discussions avec le Dr. Yves Prin sur les différentes approches d'études de l'infection chez les légumineuses ont été très fructueuses.

La bonne ambiance au sein du personnel est à saluer.

Je ne saurai oublier Mme Nathalie Pujet. Par son dynamisme et son enthousiasme, elle a su rendre notre séjour très effectif et agréable.

Mes remerciements vont également à l'ORSTOM (actuel IRD) qui a bien voulu prendre en charge ce stage dans le cadre de son programme de Bourses SSHN (pour séjour scientifique de haut niveau).

Etude Taxonomique et Caractérisation des Bactéries Fixatrices d'Azote nodulant les Caesalpinioideae de la Sous- Famille des Cassieae (Cassia, Chamaecrista et Senna).

I. Introduction

Plusieurs espèces de légumineuses spontanées fourragères et fixatrices d'azote peuvent jouer un rôle important dans la protection de l'environnement, l'amélioration de la fertilité des sols et le raccourcissement de la durée de la jachère. A côté des applications potentiellement importantes de ces légumineuses, les recherches portent également sur l'adaptation de leurs rhizobiums aux conditions édaphiques défavorables des sols surexploités (épuisés) et leur caractérisation taxonomique par une approche polyphasique.

Le programme développé à Montpellier a porté sur la caractérisation moléculaire par PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) par l'étude du polymorphisme de l'ADNr 16S des rhizobiums de Cassieae, groupe encore mal connu.

Les travaux viseront dans une première approche, à confirmer les relations génétiques entre les différentes espèces de Rhizobium nodulant les Cassieae afin de mener par la suite des études sur la dynamique des populations dans les sols en utilisant des sondes nucléaires spécifiques. Ils devraient aboutir à une meilleure connaissance de ces bactéries associées aux petites légumineuses fourragères spontanées tropicales en vue de leur utilisation en agriculture pour la régénération de la fertilité des sols et le raccourcissement de la durée de la jachère.

L'objectif de cette étude est de renforcer la collaboration entre l'Université de Dakar et l'IRD dans le domaine de la microbiologie.

II. Matériels et Méthodes

1. L'amplification par PCR : Principes

(Polymérase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne)

La répllication in vitro d'un brin d'ADN est possible à partir d'amorces (oligomères de 10 à 25 bases possédant une extrémité 3'OH libre) et une enzyme (ADN polymérase).

La technique de la PCR (Saiki *et al.*, 1985; Mullis et Faloona, 1987) est classiquement réalisée à l'aide d'une ADN polymérase thermorésistante (la Taq DNA polymérase) isolée à l'origine d'une bactérie *Thermus aquaticus*, et consiste en la répétition de trois étapes thermiques réalisées successivement (étapes d'un cycle d'amplification) dont le choix des paramètres (temps et température) détermine l'efficacité de la réaction (fig.1). Cette enzyme a un optimum d'activité pour une température se situant entre 70°C et 80°C et peut supporter des températures allant jusqu'à 96°C. La polymérisation se réalise dans un mélange réactionnel contenant de faibles quantités d'ADN possédant la séquence à amplifier et utilisé comme matrice, les deux amorces nucléotidiques complémentaires des séquences qui encadrent la cible à amplifier (qui s'hybrident avec les séquences situées aux extrémités 5' de la zone à amplifier), l'ADN polymérase et un mélange des quatre dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP) nécessaire à la synthèse de nouveaux brins d'ADN.

- La dénaturation de l'ADN est réalisée par chauffage à 92°C-95°C, généralement pendant 1 à 2 minutes ou plus si le pourcentage en GC de l'ADN à amplifier est important.

- L'hybridation (annealing) des deux amorces oligonucléotidiques (primers) se fait à une température comprise entre 37°C et 55°C, pendant 30 secondes à 1 minute selon la concentration en amorces et la spécificité recherchée. La détermination de cette température est primordiale pour l'efficacité de la réaction : la règle générale est de choisir la température voisine de la température de dissociation des amorces (température à laquelle la moitié des molécules d'amorces sont hybridées à l'ADN matrice). Ainsi, les amorces pourront se fixer sur les séquences totalement homologues.

- L'élongation (extension ou polymérisation) des brins d'ADN par une ADN polymérase s'effectue pendant un temps proportionnel à la longueur de l'ADN à amplifier. La température d'extension correspond à la température d'activité optimale de la polymérase (72°C) Les brins synthétisés doivent être ensuite séparés par dénaturation des brins parentaux pour initier le cycle suivant.

L'originalité en fait de la PCR est d'effectuer cette extension d'amorces en même temps sur les deux brins d'ADN et pour cela deux amorces sont choisies pour être chacune complémentaire d'un des deux brins d'ADN. Cette synthèse conduit à une duplication de la séquence matrice initiale. La spécificité et le rendement de l'amplification reposent sur la qualité de cette hybridation amorces/matrice. Les produits de l'amplification (brins néosynthétisés) vont à leur tour, après dénaturation, devenir des matrices.

2. Caractérisation des souches par la Technique PCR-RFLP

L'unité ribosomique est constitué de séquences contenant des domaines conservés, répétés en tandem et séparés par une séquence inter-génique moins conservée, l'IGS (fig.2). Des mutations ponctuelles dans ces régions peuvent avoir pour effet l'apparition ou la disparition de sites de restriction.

L'approche PCR/RFLP conduit à comparer le polymorphisme des fragments de restriction d'une région choisie du génome préalablement amplifié par PCR et utilisé comme substrat d'enzymes de restriction. Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui reconnaissent spécifiquement une séquence courte (4 à 8 bases) et coupent la chaîne d'ADN chaque fois qu'elles reconnaissent cette séquence élémentaire. l'ADN se retrouve ainsi fragmenté en morceaux de différentes longueurs séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur un support physique. Un fragment va migrer d'autant plus loin qu'il est court. Un polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) est ainsi mis en évidence.

Les profils observés permettent l'analyse de la diversité des souches:

- la caractérisation d'un isolat/ d'une souche et
- l'estimation des divergences de séquences entre isolats/souches et donc d'établir leur proximité phylogénétique.

2.1. Méthode d'extraction de l'ADN génomique bactérien pour PCR-RFLP

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

1. culture de bactéries dans 5 ml de milieu YM, à 37°C pendant 48 h
2. centrifugation de la culture pendant 10 mn à 5000 tpm.
3. lavage du culot 1 fois avec 5 ml de tampon Tris EDTA (TE, Tris

10 mM pH 8 et EDTA 1mM) : vortexer avant centrifugation 10 mn à 5000 tpm.

4. resuspendre le culot dans un tube Eppendorf de 2 ml avec 500 µl de tampon TE contenant 1 mg/ml de lysosyme (Bioprobe), vortexer. La lysosyme détruit la paroi des cellules bactériennes.

5. incubation à 37°C pendant 30 mn

6. ajouter 30 µl d'un détergent (SDS à 10%) + 10 µl de protéinase K (Merck) à 20 mg/ml d'H₂O déminéralisée.

7. incubation une nuit à 37°C.

8. ajouter 20 µl de SDS 10% si la lyse est partielle (solution opaque) agiter doucement par des inversions lentes pendant 5 mn.

9. ajouter 130 µl de NaCl 5M, vortexer (obtention d'une émulsion : mousse).

10. incuber 30 mn dans la glace, vortexer (obtention d'une émulsion)

11. centrifugation 15 mn à 5000 tpm (culot = protéines, surnageant = ADN).

12. récupérer le surnageant dans un tube Eppendorf de 2 ml

13. ajouter 700 µl de phénol/Sevag(phénol/chloroforme/alcoolisoamylique : 25V/24V/1V), les protéines sont éliminées par ce traitement; agiter doucement (plusieurs inversions lentes pendant 5 mn) et centrifuger 5 mn 14000 tpm, à faire 2 fois.

14. récupérer le surnageant dans un tube Eppendorf de 2 ml.

15. ajouter 700 µl de chloroforme/Sevag (chloroforme/alcool isoamylique : 24V/1V), agiter doucement(plusieurs inversion lentes pendant 5 mn) et centrifuger 5 mn à 14000 tpm, à faire 2 fois.

16. reprendre le surnageant dans 1/10ème de volume d'acétate de Na (700 µl)(3M, pH 5,2), l'ADN est alors précipité sélectivement; ajouter 1 ml (ou 500 µl) d'isopropanol pour ne pas précipiter les polysaccharides, agiter doucement (plusieurs inversions lentes pendant 5 mn : Apparition d' une méduse(ADN).

17. centrifugation 10 mn à 14000 tpm.

18. laver le culot par 500 µl éthanol 70%, vortexer et centrifuger.
19. sécher le culot d'ADN au Speed Vac pendant 5 à 10 mn.
20. reprendre le culot dans 50 ml de Tris(10 mM, pH 8) + 2,5 ml de RNase (Sigma) diluée(4 mg/ml) pendant 2 h à 37°C(ADN débarrassé de l'ARN).
21. ajouter 10 ml d'acétate de Na 3M + 200 ml d'éthanol absolu, agiter doucement(plusieurs inversions lentes pendant 5 mn) : précipitation de l'ADN.
22. centrifugation 10 mn à 14000 tpm.
23. reprendre le culot avec 500 ml d'éthanol 70%.
24. centrifugation 10 mn à 14000 tpm.
25. sécher au Speed Vac pendant 5 à 10 mn.
26. reprendre le culot dans 50 ml de Tris 10 mM, pH 8.
27. conserver l'ADN au congélateur à(-20°C)
28. visualiser l'ADN extrait après électrophorèse sur gel d'agarose 1%

2.2. Conditions d'amplification de l'ADN extrait

Deux régions ont été amplifiées dans cette étude:

- le fragment du gène 16 S rRNA chez les souches bactériennes en utilisant les amorces universelles : la FGPS6 et la FGPS1509 (fig.2)
- le fragment du gène nod A chez les rhizobia.

Les amorces utilisées sont la nodA1F et la nodAB1R permettant d'amplifier un fragment d'environ 660 pb(fig.3). Ce sont des amorces dégénérées, elles ont été définies à partir des séquences des gènes nod A de souches de rhizobia disponibles dans GenBank. Le tableau (1) donne les séquences des amorces utilisées ainsi que leur localisation au niveau de l'opéron ribosomal.

La réaction de PCR est réalisée en utilisant un thermocycleur Perkin-Elmer 2400 (ou 9700)(Perkin-Elmer Corp. Norwalk, Conn.) dont les différents programmes sont donnés pour tous les fragments étudiés.

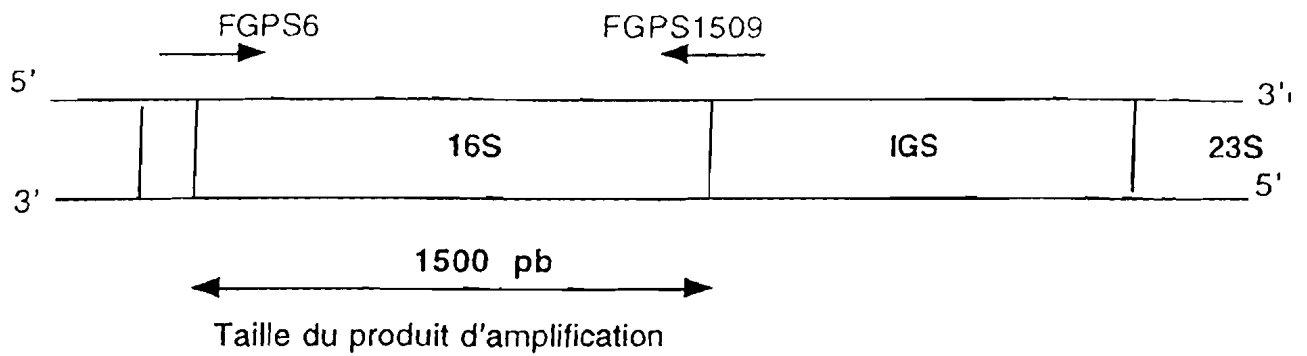


Figure 2 : Représentation simplifiée de l'organisation nucléaire de la région 16S de la petite sous-unité ribosomale (rRNA). Les flèches indiquent approximativement la position des primers utilisés (FGPS6 et FGPS1509) de même que la taille du fragment.

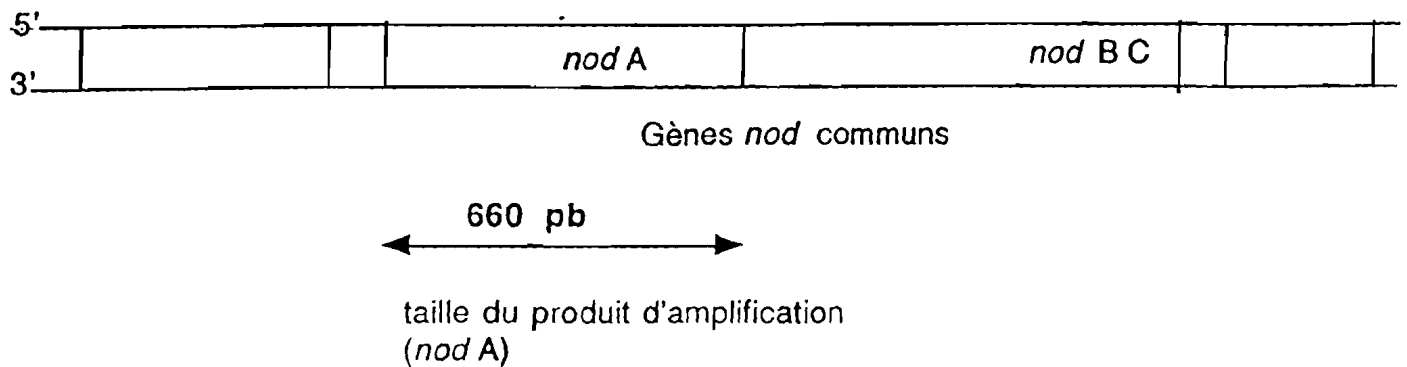


Figure 3 : Représentation schématique de la région chromosomique comprenant le gène commun *nodA*. L'emplacement des primers ainsi que la taille du produit d'amplification sont représentés de façon approximative.

2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

2.3.1. Préparation du gel

Selon la consistance du gel, l'agarose est pesée et mélangée à du tampon TAE ou TBE. Elle est fondue au four micro-ondes, refroidie jusqu'à environ 60°C. Le gel ainsi obtenu est coloré au BET (Bromure d'Ethydium) et coulé dans un porte gel où un peigne a été soigneusement placé. Après polymérisation complète, le peigne est enlevé

2.3.2. Dépôt des ampliats

Le gel ainsi solidifié est placé à l'intérieur d'une cuve d'électrophorèse et recouvert de tampon TBE 1X ou TAE 1X (voir annexe). Dans chaque puits, est déposé, quelques ml d'ADN (ampliats) préalablement mélangés avec du tampon de charge(voir annexe) Un marqueur de taille moléculaire, le Smart (Eurogentec) est déposé sur le gel pour vérifier la taille de l'ADN amplifié.

2.3.3. Migration de l'ADN et visualisation

Les ampliats sont observés après l'application d'une tension de 120 volts pendant 30 mn à 1 h de temps de migration (le front de migration est identifié au bleu de charge situé à environ 2cm de la partie inférieure du gel). Le gel est ensuite déposé sur une plaque de lumière ultraviolette et les fragments d'ADN amplifiés sont ainsi visualisés et ensuite photographiés. Le BET est un cation qui s'intercale entre les bases de l'ADN et ainsi le complexe ion éthidium/ADN devient fluorescent.

2.4. Analyse par PCR-RFLP des ampliats

La digestion enzymatique ou RFLP a été réalisée sur la région 16S rRNA et le gène nod A amplifiés par PCR chez un certain nombre de souches. Les enzymes de restriction utilisées sont : HaeIII et MspI; leurs sites de restriction sont donnés au tableau 2.

L'analyse et la visualisation des fragments de restriction obtenus sont effectuées dans les mêmes conditions que pour l'analyse des produits PCR Cependant, la petite taille des fragments de restriction générés nécessite la préparation d'un type d'agarose plus résolutif (agarose à 3%).

Le marqueur de taille moléculaire utilisé est la 100 pb DNA(Promega) qui permet d'observer des fragments allant jusqu'à 1500 pb.

Tableau 1 : amorces choisies pour la réaction d'amplification des fragments 16SrRNA et gène NodA

Amorces*	Séquences 5'3'	Sites	Références
FGPS6	GGAGAGTTAAGATCTTGGCTCAG	16SrRNA	Normand <i>et al.</i> , 1992
FGPS1509	AAGGAGGGGATCCAGCCGGA	16SrRNA	Normand <i>et al.</i> , 1992
Nod A ₁ F	TGCRGTGGAARNTRBUYTG	NodA	GenBank
NodAB ₁ R	GGNCCGTCRTCRAASGTCARGTA	NodA	GenBank

*: Le nom de l'amorce tient compte de la position en 5' du premier nucléotide de l'amorce sur le gène cible.

R=(A,G); Y=(C,T); S=(G,C); B=(G,T,C); N=(A, G,C,T)

Tableau 2 : Enzymes de restriction et leurs sites de restriction

Enzymes de restriction	Sites à 4 paires de base
HaeIII	5'..GG ↑ CC..3' 3'..CC ↑ GG..5'
MspI	5'..C↑CGG..3' 3'..GGC↓..C..5'

3. La technique de séquençage directe des produits de PCR

Le séquençage a été réalisé suivant la méthode de Sanger (1977) ou méthode des terminateurs en chaîne en utilisant le Kit ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Co., P/N402078 CA, USA) et le séquenceur utilisé est le modèle ABI 377A DNA (Perkin-Elmer Co.)

3.1. Principe de la méthode

La méthode de Sanger (1977) réalise la synthèse d'une molécule d'ADN simple brin. L'initiation de la réaction de synthèse est obtenue en fixant en position 5' de la matrice, une amorce nucléotique complémentaire.

La réaction d'élongation est catalysée par une ADN polymérase, qui requiert la présence des quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dCTP et dGTP = dNTP) comme substrats. La méthode dépend également de la présence de didéoxyribonucléotides (ddNTP) qui sont incorporés durant la réaction d'élongation à la place des désoxyribonucléotides conventionnels. Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence du groupe 3'-OH nécessaire à la continuité de l'élongation. Quand le ddNTP est incorporé à la nouvelle molécule d'ADN simple brin, l'absence de groupe hydroxyle empêche la formation de liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant. La réaction d'élongation est stoppée. L'incorporation du ddNTP étant effectuée au hasard, on génère ainsi toute une série de fragments de différentes longueurs.

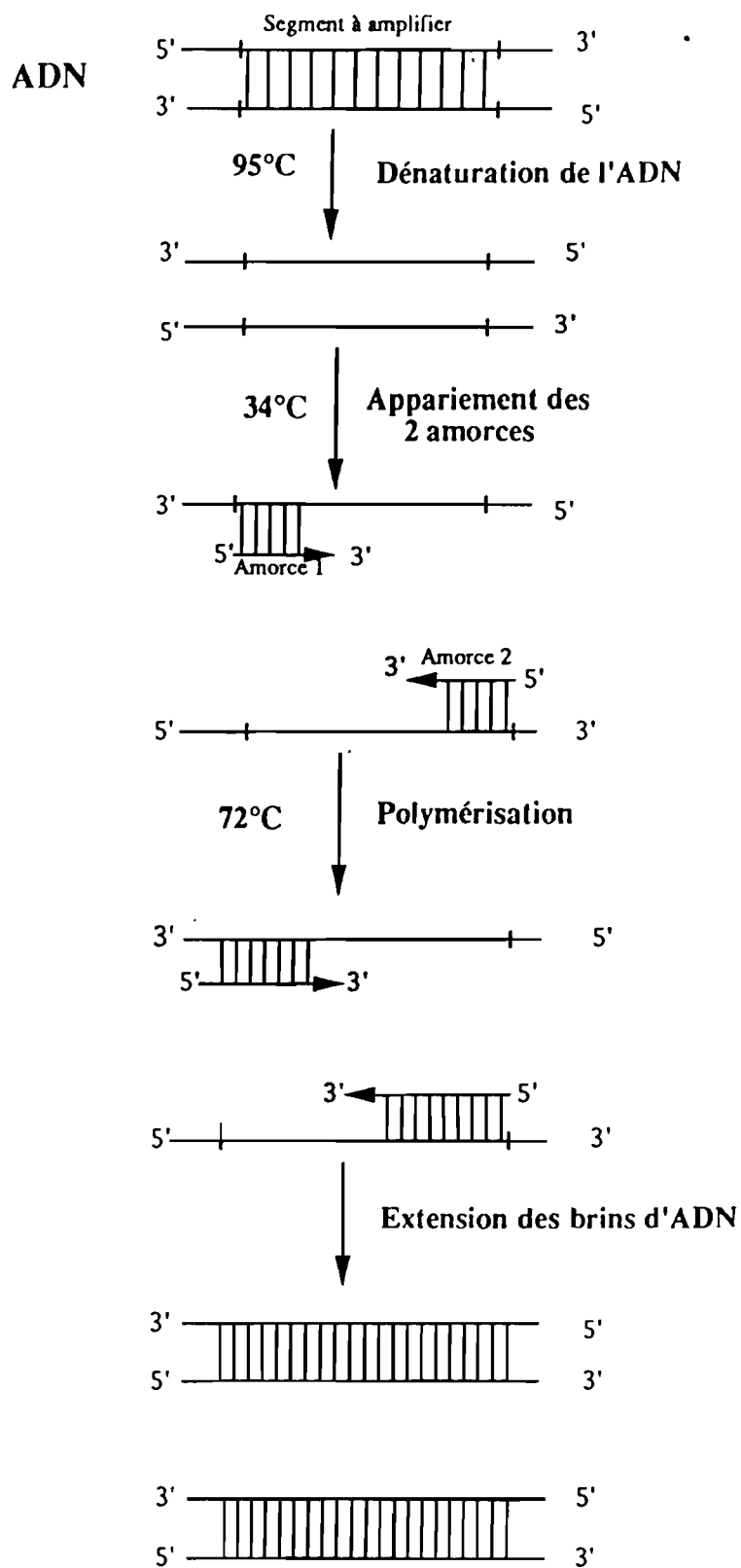
L'originalité du kit repose d'une part sur l'utilisation d'une enzyme stable thermiquement la FS Ampli Tag DNA Polymérase, et d'autre part sur le marquage radioactif conventionnel des quatre ddNTP par des fluorochromes de différentes couleurs. Le ddATP est marqué par une fluorescence verte, le ddTTP, une fluorescence rouge, le ddGTP, une fluorescence noire et le ddCTP, une fluorescence bleue.

Les fragments d'extension issus de la réaction de séquençage sont alors séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La lecture de la séquence, c'est à dire l'émission des différents fluorochromes, se fait en temps réel à travers une fenêtre de détection, après l'excitation de ces marqueurs par un faisceau laser.

Les produits de la PCR ont été purifiés en utilisant le KIT QiaQuick de QiaGen DNA..

Après purification, des aliquotes de 10 ng et 20 ng de produits de PCR ainsi que 5 µl du marqueur de taille moléculaire, le Smart ont été déposés sur un gel d'agarose à 1% pour l'estimation de la matrice d'ADN nécessaire pour réaliser la

Figure 1 : Les étapes de la PCR pour 1 cycle d'amplification



réaction de séquence. Après estimation, 60 à 80 ng d'ADN purifié ont été utilisés pour chaque réaction avec 1ml de chaque primer correspondant à 3,2 pmole, 8ml de mélange PCR et de l'eau distillée stérile pour un volume final de 20 ml.

3.2. Analyse phylogénétique des séquences

Chaque région a été séquencée dans les deux sens (forward et reverse), afin de confirmer les séquences obtenues. Le séquençage a été réalisé sur la région génomique : le gène 16S rRNA des souches. Les séquences obtenues ont été alignées en utilisant les logiciels G.C.G. (Genetics Computer Group, Wisconsin) du serveur Infobiogen.

III. Résultats

1. Amplification du gène 16SrRNA

Nous avons réalisé les réactions d'amplification proprement dites ont aux différents cycles de température suivants:

Un premier cycle à consisté à dénaturer l'ADN à 94°C pendant 5min, puis une série de 35 cycles a été appliqué, chaque cycle se déroulant comme suit: une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation des amorces(annealing) à 55°C pendant 30 secondes, une phase d'extension ou polymérisation avec une température de 72°C pendant 1 minute et 30 secondes. La polymérisation est achevée avec un dernier cycle de 72°C pendant 7 minutes .

Pour chaque électrophorèse, nous avons déposé un marqueur de poids moléculaire(Smart) pour vérifier la taille de l'ADN amplifié.

Pour les protocoles d'amplification que nous avons adoptés, voir les différentes fiches.

Dans les puits du gel d'agarose à 1%, nous avons chargé: 6µl d'amplifiat + 3µl de bleu de charge et 5µl de marqueur de PM (Smart)+3µl de bleu. La tension appliquée a été de 120 volts et la migration, 30mn à 1 heure.

Les amorces FGPS6 et FGPS1509 que nous avons utilisées ont généré un fragment unique proche de 1500 pb (voir figures 4, 5, 6, 8 et 9).

Pour la figure 6, nous observons quelques bandes "parasites" autour de 650 pb; celles-ci pouvant disparaître en appliquant des "Touch Down".

FICHE PCR

Objectifs : Amplification du gène 16 SrRNA

Echantillon	Matrice	Primers	Observations
1	1922	FGPS6	0,5µl ADN non dilué
2	469A	FGPS1509	
3	469B		
4	468		
5	T(-)		
6	1967		
7	481A		
8	481B		
9	473		
10	T(-)		

Conditions PCR :

Nbr d'échantillon	12
Volume réactionnelle	30
Eau	241,2
Tampon 10X	36
MgCL2 (50mM)	10,8
dNTP (2.5 mM)	28,8
Taq	1,8
Primer 1	12
Primer 2	12

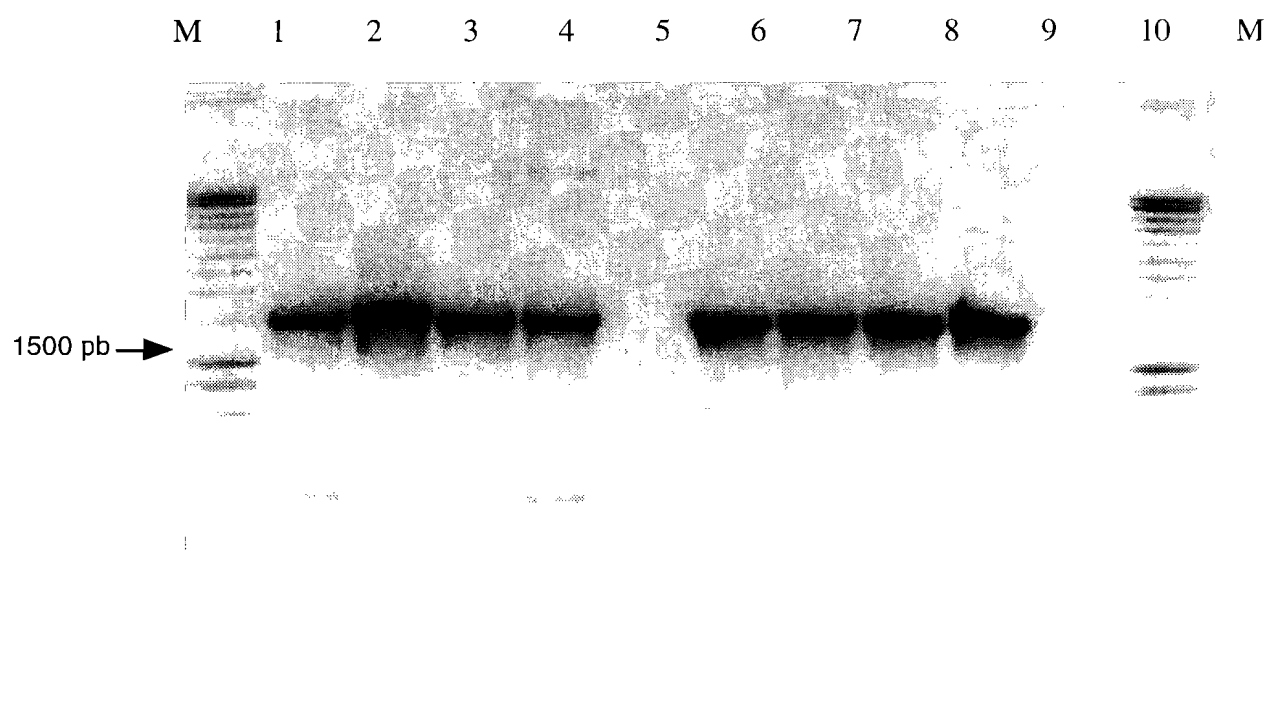


Figure 4 : Gel d'électrophorèse montrant l'amplification du gène 16 S rRNA de souches de *Chamaecrista*

Puits : M = marqueur de poids moléculaire (Smart) ; 1 = ORS 1922 ; 2 = ORS 469 ;
 3 ORS 1967 ; 4 = ORS 481 A ; 5 = témoin négatif ; 6 = ORS 468 ;
 7 = ORS 481 ; 7 = ORS 481 B ; 8 = ORS 473 ; 9 = ORS 469 ;
 10 = témoin négatif

FICHE PCR

Objectifs : Amplification du 16 SrRNA

Echantillon	Matrice	Primers	Observations
1	468	FGPS6	dilution de l'ADN 1/10
2	469	FGPS1509	
3	473		
4	481		
5	T(-)		
6	1922		
7	1967		
8	482		
9	476		
10	T(-)		

Conditions PCR :

Nbr d'échantillon	12
Volume réactionnelle	30
Eau	241,2
Tampon 10X	36
MgCL2 (50mM)	10,8
dNTP (2.5 mM)	28,8
Taq	1,8
Primer 1	12
Primer 2	12

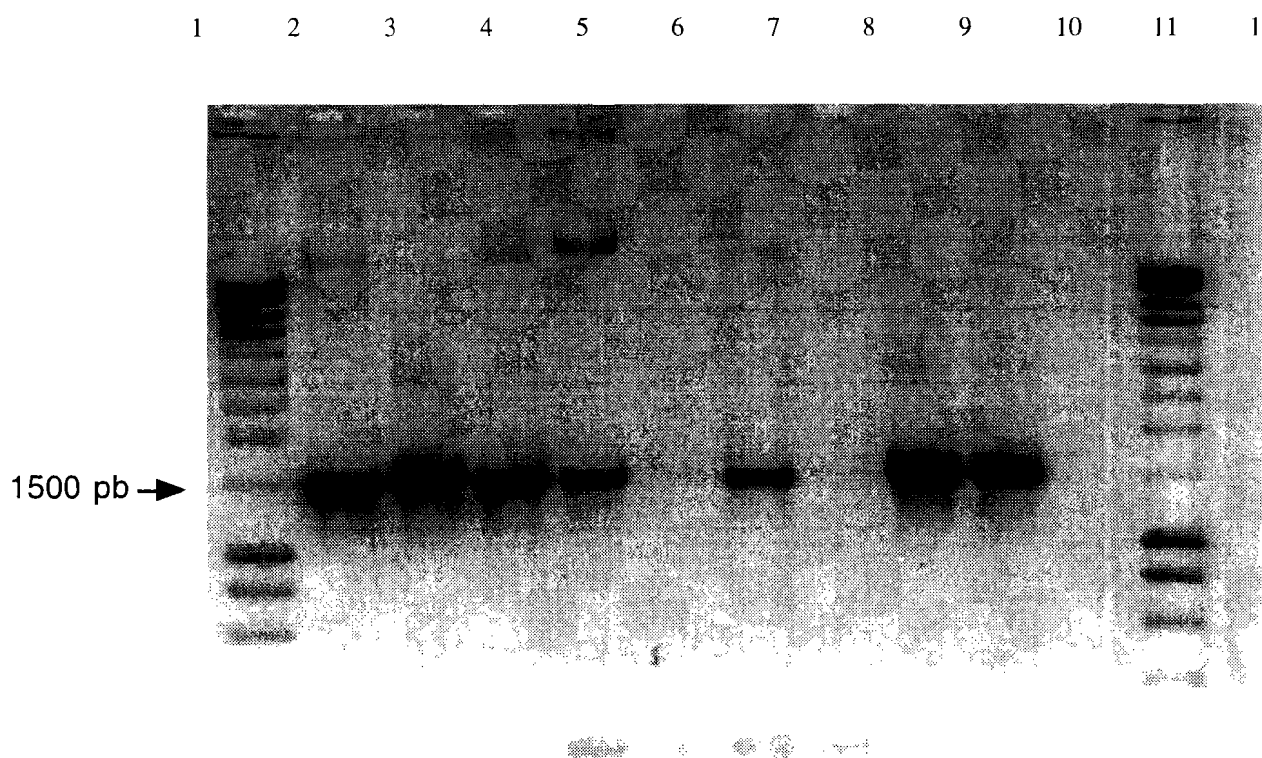


Figure 5 : Gel d'électrophorèse montrant l'amplification du gène 16S rRNA de spuches de *Chamaecrista*

Puits : 1 = marqueur de PM (Smart) ; 2 = ORS 468 ; 3 = ORS 469 ;
 4 = ORS 473 ; 5 = ORS 481 ; 6 = témoin négatif ; 7 = ORS 1922 ;
 8 = ORS 1967 ; 9 = ORS 482 ; 10 ORS 476 ; 11 témoin (-)

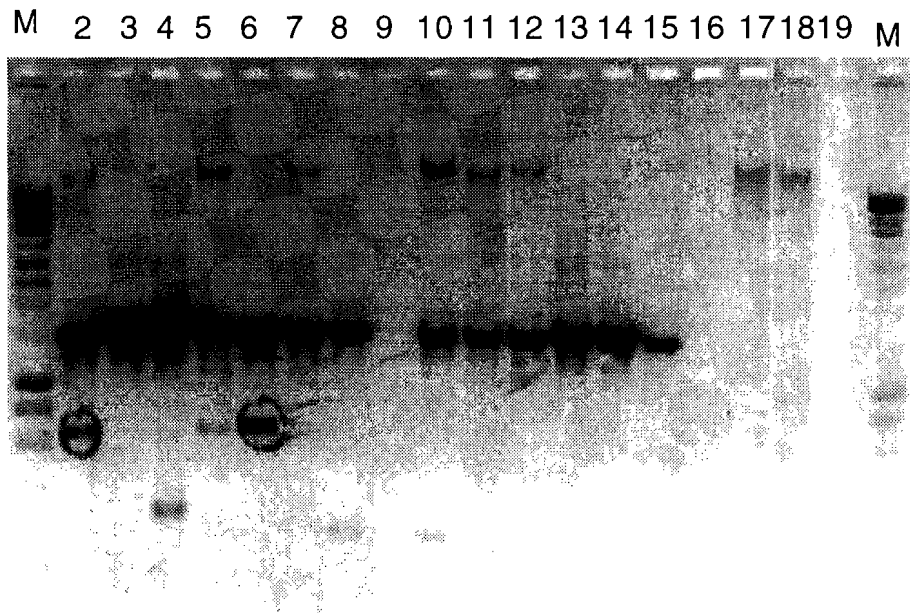


Figure 6 : Gel d'électrophorèse montrant l'amplification du gène 16 S rRNA de souches de *Chamaecrista*

Puits : M = marquer PM (Smart) ; 2 = ORS 468 A ; 3 = 469 A ;
 4 = 469 B ; 5 = 469 C ; 6 = 469 D ; 7 = 473 A ; 9 = T (-) ;
 10 = 481 A ; 11 = 481 B ; 12 = 481 C ; 13 = 482 ;
 14 = 476 ; 15 = 1922 A ; 16 = 1922 B ; 17 = 1967 A ;
 18 = 1967 B ; 19 = T (-)

FICHE PCR

Objectifs : Amplification du gène NodA

Echantillon	Matrice	Primers	Observations
1	468A	Nod A1F	0,5µl ADN non dilué
2	469 A	Nod AB1R	
3	473A		
4	T(-)		
5	481A		
6	1922A		
7	1967A		
8	T(+)309		

Conditions PCR :

Nbr d'échantillon	10
Volume réactionnelle	30
Eau	201
Tampon 10X	30
MgCL2 (50mM)	9
dNTP (2.5 mM)	24
Taq	1,5
Primer 1	12
Primer 2	12

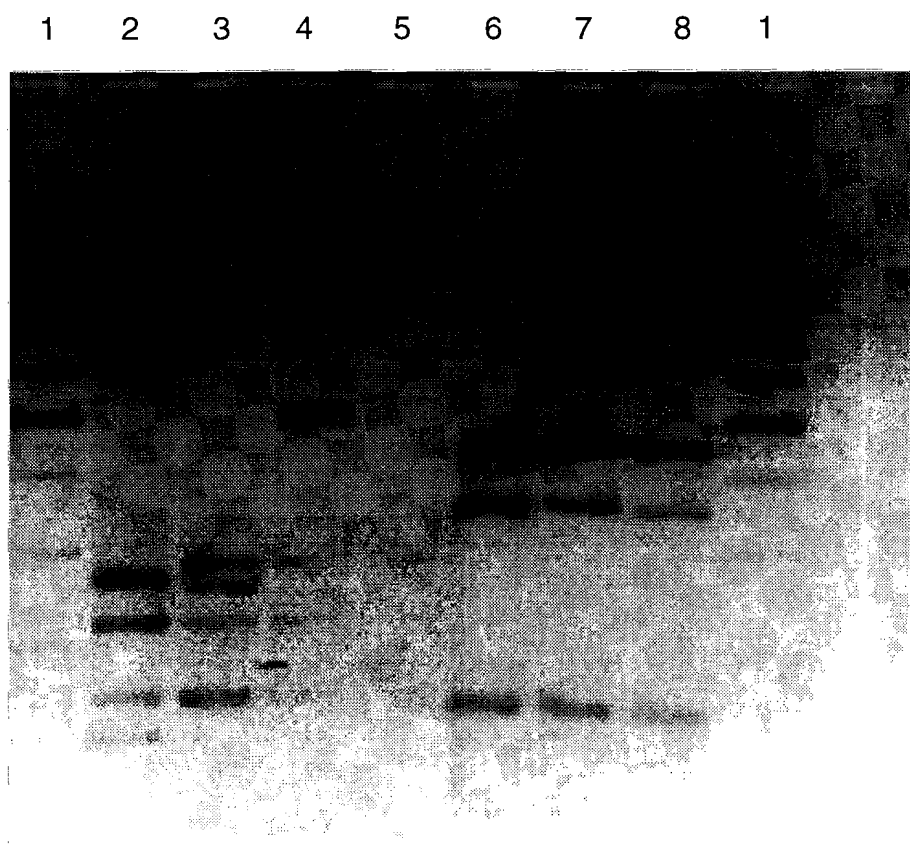


Figure 7 : Comparaison des profils de restriction du gène 16 S rRNA chez des souches de *Chamaecrista*

Puits : 1 = Marqueur de PM 100 pb ; 2 = ORS 468 ; 3 = ORS 473 ; 4 = ORS 481 ;
5 = pas de detection ; 6 = ORS 469 ; 7 = ORS 482 ; 8 = ORS 476

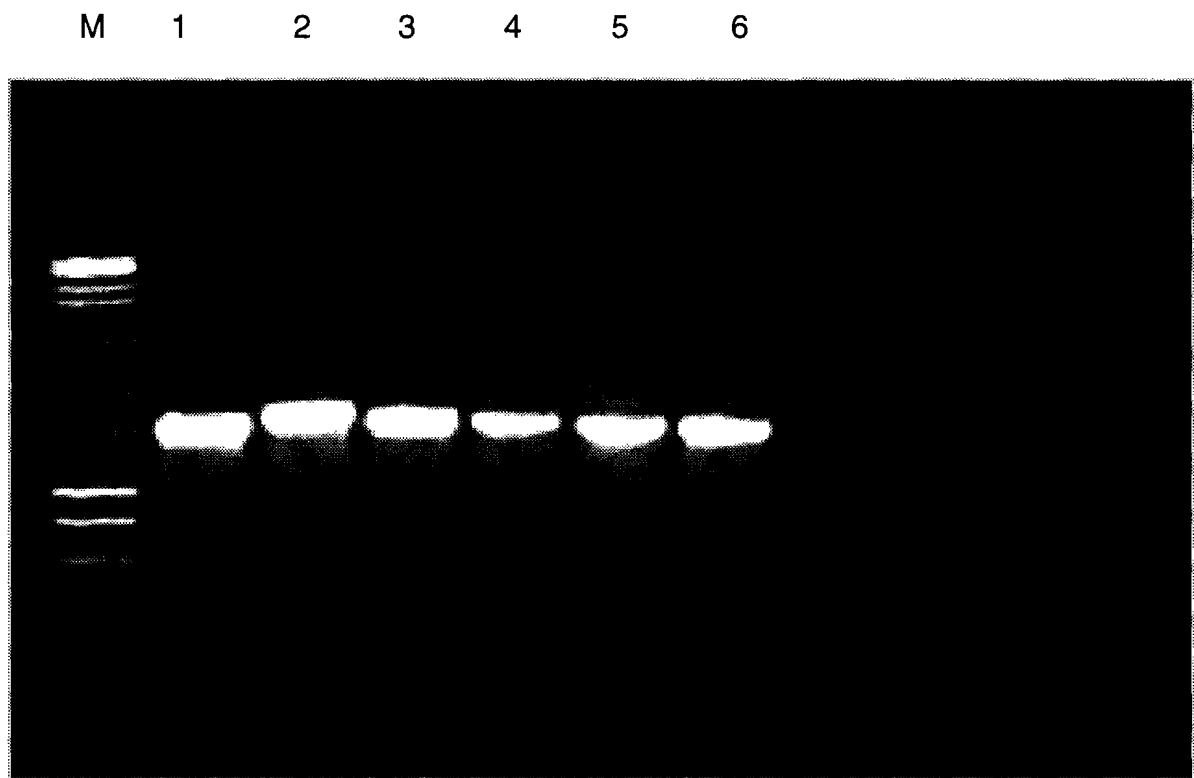


Figure 8 : Amplification du gène 16S rRNA de souches de *Chamaecrista*

Puits : M = marqueur de PM ; 1 = ORS 468 ; 2 = ORS 469 ; 3 = ORS 473 ;
4 = ORS 481 ; 5 = ORS 1322 ; 6 = ORS 1967



Figure 9 : ADN purifié provenant de l'ampliat du gène 16 S rRNA de souches de Chamaecrista (voir fig 8)

ORS 468 ; ORS 469 ; ORS 473 ; ORS 481 ; ORS 1922 ; ORS 1967

2. Analyse par PCR-RFLP des amplifiats

Laguerre *et al.*(1994) ont montré que l'on pouvait utiliser le polymorphisme du gène 16SrRNA obtenu par PCR-RFLP pour séparer les isolats de rhizobia suivant leur espèce génomique. Mais, seul un choix judicieux des enzymes de restriction permet d'obtenir des profils RFLP exploitables.

La réaction de digestion a été effectuée comme suit:

mélange(1) :

-tampon de l'enzyme 10X: 1,5 µl

-enzyme 1µl

-H₂O filtrée 6,5µl

mélange réactionnel pour chaque souche:

-produit PCR 6µl

- mélange(1) 9µl

La digestion s'est faite dans le mélange réactionnel de 15 µl. Incubation au bain-marie à 37°C pendant 2 heures et les enzymes choisies sont MSPI et HaeIII. Une électrophorèse sur gel d'agarose à 3% a été réalisé Nous avons chargé dans les puits, 15µl du mélange réactionnel + 5 µl de bleu de charge. Pour le marqueur de poids moléculaire, nous avons choisi le 100 pb DNA (Ladder). La tension appliquée a été de 80 volts et la migration, 1 heure.

Les amplifiats de 7 souches ont été digérés avec les enzymes MSPI et HaeIII. La figure 7 montre les profils obtenus après digestion par l'enzyme MSPI. On observe pour les souches ORS 468, ORS 473, ORS 482 et ORS 471 des profils différents tandis que les souches ORS 469, et ORS 476 présentent le même profil.

Une analyse avec l'enzyme HaeIII a été effectuée avec un nombre plus élevé de souches; les résultats ne sont pas encore exploités. Cependant, pour une analyse phylogénétique plus poussée, il est nécessaire de tester un nombre plus important d'enzymes (judicieusement choisies).

3. Séquençage des produits de PCR

L'analyse des séquences du 16S rRNA des souches ont donné les résultats suivants:

-la souche ORS1922 est proche de *Bradyrhizobium* sp (type G, type H, type L), *B. japonicum* (LMG 6138 typique) et *B. lupini* avec des taux de similarité de 99% si on considère les 458 premières paires de bases.

-la souche ORS1967: taux de similarité de 100% avec *Bradyrhizobium* sp.(type G, type H), *B. japonicum* (LMG6138 type) et *B. lupini* et 99% avec *Bradyrhizobium*. sp (type L) pour les 460 premières paires de bases.

-la souche ORS468: taux de similarité de 100% avec *Agrobacterium tumefaciens*(biovarI), 98% avec *Agrobacterium tumefaciens* (LMG196), 97% avec *A. rubi* (LMG156) et 99% avec *Rhizobium* sp N220 pour les 515 premières paires de bases.

-la souche ORS473: taux de similarité de 98% avec *Bradyrhizobium japonicum* et de 99% avec *Bradyrhizobium* sp. (type B et type N) pour les 420 premières paires de bases.

-la souche ORS481: taux de similarité de 98% avec *Bradyrhizobium japonicum* et 99% avec *B. sp*(type B) pour les 480 premières paires de bases.

-la souche ORS469: taux de similarité de 98% avec *Paenibacillus azotofixans* pour les 468 premières paires de bases, mais pourrait vraisemblablement être une contamination.

Un arbre phylogénétique a été construit à partir de ces résultats

4. Amplification du gène *nodA* des souches séquencées

Nous avons amplifié le gène *nodA* chez les quelques souches séquencées.

La méthode d'amplification ou "Touch Down" que nous avons choisie pour amplifier le gène *Nod* est un cycle de PCR particulier permettant l'amplification du fragment-cible (pour favoriser la bande spécifique) en utilisant deux valeurs de température d'hybridation différentes au cours du même cycle PCR avant la dernière phase d'élongation.

Les conditions de PCR ont été:

20 cycles à une température de 65°C ensuite 25 cycles avec une diminution de température à 55°C.

Le gène nod A a déjà été séquencée pour quelques souches de Rhizobium. Ces séquences sont accessibles dans Genbank.

Le couple d'amorces nodA1F / nodAB1R que nous avons choisi pour amplifier le gène nodA de nos souches a été défini à partir d'un alignement multiple sur l'ensemble de ces séquences. Ce sont des amorces dégénérées c'est à dire qui peuvent donner plusieurs possibilités d'associations de régions plus ou moins conservées.

Il a été en outre démontré que le gène nod A, gène commun à tous les rhizobia, pouvait constituer un bon marqueur moléculaire pour estimer la spécificité de nodulation d'une souche bactérienne.

Parmi les souches testées, seule la souche ORS 481A montre un produit d'amplification de la taille de 650 pb environ. Les autres souches n'ont rien donné (figure 10). Afin de vérifier la nodulation, ces souches ont été testées sur plantes-hôtes. les résultats obtenus montrent ces souches induisent une nodulation chez les plantes testées sauf les souches ORS469 et ORS468.

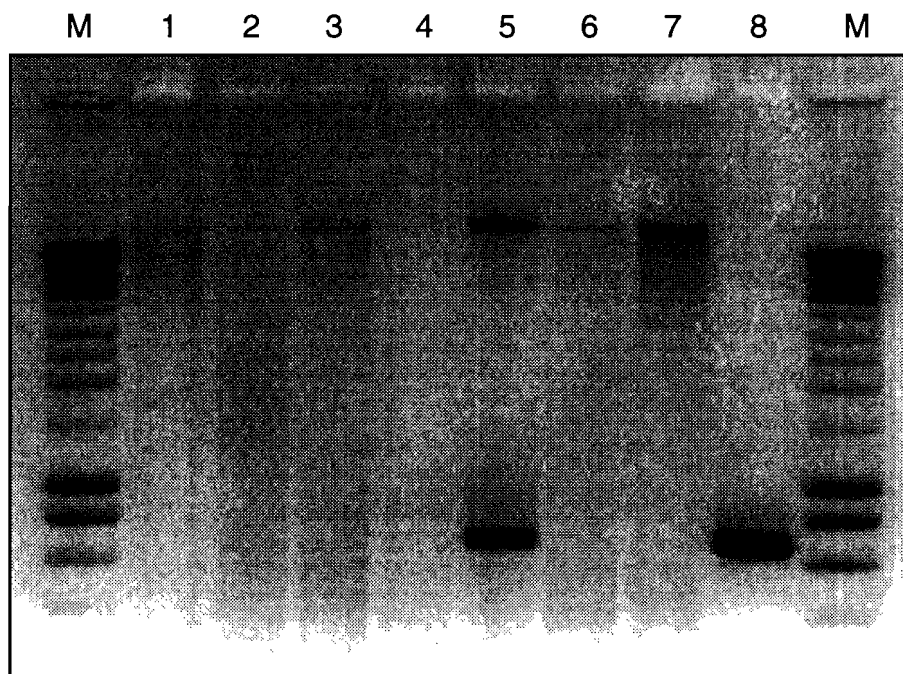


Figure 10 : Gel d'électrophorèse montrant l'amplification du gène Nod A chez les souches de *Chamaecrista*

Puits : M = marqueur de PM ; 1 = ORS 468 A ; 2 = ORS 469 ;
 3 = ORS 473 ; 4 = T (-) ; 5 = ORS 481 A ; 6 = ORS 1922 ;
 7 = ORS 1967 ; 8 = T (+)

ATGCAAGTCGAGCGGGCGTAGCAATACGTCAGCGGCAGACGGG
TGAGTAACGCGTGGGAACGTACCTTTTGGTTCGGAAC
AACACAGGGAACTTGTGCTAATACCGGATAAGCCCTTACGGG
GAAAGATTTATCGCCGAAAGATCGGCCCGCGTCTGAT
TAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTA
GCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTG
AGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCG
TGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTGCGGGA
AGATAATGACGGTACCGCAAGAATAAGCCCCGGCTA
ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCAAGGGGGCTAGCGTTG
CTCGGAATCACTGGCGTAAAGGGTGC

Séquence du 16S rRNA de la ORS 1922

ATGCAAGTCGAGCGGGCGTAGCAATACGTCAGCGGCAGACGGG
TGAGTAACGCGTGGGAACGTACCTTTTGGTTCGGAAC
AACCAGGGAACTTGGGCTAATACCGGATAAGCCCTTACGGG
GAAAGATTTATCGCCGAAAGATCGGCCCGCGTCTGAT
TAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTA
GCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTG
AGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG
TGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTGCGGGA
AGATAATGACGGTACCGCAAGAATAAGCCCCGGCTA
ACTTCGTGCCAGCAGCCGCG

Séquence du 16S rRNA de la souche ORS 473

CTTAACACATGCAAGTCGAACGCCCCGCAAGGGGAGTGGCAGA
CGGGTGAGTAACGCGTGGGAACATACCCTTTCCTGCG
GAATAGCTCCGGGAACTGGAATTAATACCGCATACGCCCTACG
GGGGAAAGATTTATCGGGGAAGGATTGGCCCCGCGTT
GGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGAT
CCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGC
CGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCG
GAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCG
GCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAG
CGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGG
CGGATATTAAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGCTC

Séquence du 16SrRNA de la souche ORS468

CATGCAAGTCGAGCGGGCGTAGCAATACGTCAGCGGCAGACGG
GTGAGTAACGCGTGGGAACGTACCTTTTGGTTCGGAA
CAACACAGGGAAACTTGTGCTAATACCGGATAAGCCCTTACGG
GGAAAGATTTATCGCCGAAAGATCGGCCCGCGTCTGA
TTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCAGT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACT
GAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGC
GTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTGCGGG
AAGATAATGACGGTACCGCAAGAATAAGCCCCGGCT
AACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGGCTAGCGT
TGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGCGGG
TCTTTAAGTCAGGGGTGAAATCCTGGAGCTCAACTCAGAACTGC
CTTTGATACTGAAGATCTTGAGTT

Séquence du 16S rRNA de la souche ORS481

TGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGGGTTGTTAGAAGCTTGCTT
CTAAACAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
AGGCAACCTGCCCACAAGACAGGGATAACTACCGGAAACGGTA
GCTAATACCCGATACATCCTTTTCCTGCATGGGAGAA
GGAGGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTGTGGATGGGCCTGCG
GCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCT
CTGTTGCCAGGGAAGAACGTCTTGTAGAGTAACTGCTACAAGAG
TGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCCGCGGTAA

Séquence du 16S rRNA de la souche ORS469

IV. Conclusion et perspectives

Ce stage a été bénéfique à plus d'un titre. Il nous a permis de nous familiariser, de nous initier à certaines techniques de biologie moléculaire que nous avons eu à développer et de mieux les comprendre. Il nous a surtout permis d'initier un travail portant sur la caractérisation moléculaire par PCR-RFLP par l'étude du polymorphisme de l'ADNr 16S des rhizobiums de *Cassieae*, groupe encore mal connu

Les résultats que nous avons obtenus sont préliminaires et assez provisoires et doivent être approfondis en reprenant et en affinant certaines analyses et techniques déjà utilisées. Par exemple, les résultats des séquençages bien que montrant des taux de similarité élevés (de l'ordre de 98 à 100%) pour les 515 premières paires de bases, ne sont que partielles. Il est important donc de faire un séquençage total du 16SrRNA afin de définir les relations génétiques entre les différentes espèces de *Rhizobium* nodulant les *Cassieae*.

V. Références bibliographiques

Laguerre, G., Allard, M. R., Revoy, F., and Amarger, N. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1; 56-63.

Norman, P. 1995. Utilisation des séquences 16S pour le positionnement phylgénétique d'un organisme inconnu. *Oceanis* . Vol. 21. pp 31-56.

Mullis, K.B. et Faloona, F. 1987. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biologie* 51,263-273.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlith, H. A. and Aruhein, N. 1985. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

Annexes

Annexe 1: Contrôle de la présence d'ADN après extraction

a) Préparation du gel de contrôle

<u>Grand gel</u>		<u>Petit gel</u>
gel d'agarose	1%	1%
Agarose	type II	type II
TAE (1 X)*	120 ml	75 ml
BET	2 gouttes	1 goutte

* Généralement le TAE disponible est à 50 X. Prendre donc 20 ml de TAE 50 x pour 1 litre d'eau ultra pure pour avoir TAE 1 X.

** Le BET est à ajouter après avoir fondu l'agarose au four microonde 2 à 3mn

b) mode opératoire

- migration : 30 mn à 1 h, 120 volts

- mélange à déposer sur le gel : 1 ml d'ADN + 4 ml H₂O +

3 ml de bleu de charge + 5 ml de marqueur de poids moléculaire Smart.

Annexe 2: tampon d'électrophorèse

TAE: Tris-Acétate-EDTA (TAE à 50X)

Tris-Base	242g
acide acétique glacial	(57,1ml)
EDTA	100ml (0,5 M, pH 8,0)
H ₂ O	QSP 1000ml. Stérilisation: 20 mn à 120°C

TBE: Tris-Borate-EDTA(TBE à 10X)

Tris-Base 108g

Acide borique 55g

EDTA 40ml (0,5M, pH 8,0)

EDTA à 0,5M, pH 8,0 : dissoudre 93,075g de EDTA dans 300 ml d'H₂O, ajuster le pH à 8 avec des cristaux de soude, ajuster le volume d'eau jusqu'à 500 ml et filtrer la solution(0,2 µm)