

Chapitre 3

Criblage phénotypique et moléculaire du partenaire symbiotique : *Rhizobium* - plante hôte.

3.1. Criblage phénotypique

Les méthodes phénotypiques sont celles qui ne sont pas directement basées sur l'ADN ou l'ARN. Elles font appel principalement aux caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries en utilisant des techniques standardisées. Dans la majorité des laboratoires de microbiologie les tests phénotypiques classiques sont utilisés pour l'identification et constituent la base de la description formelle des taxa. Le développement des systèmes miniaturisés et automatisés tels que les API ou BIOLOG, la généralisation du traitement des données par ordinateur et l'analyse numérique ont rendu plus aisée la classification des microorganismes par l'approche phénotypique. Cependant pour certains groupes de bactéries, le manque de caractéristiques phénotypiques pose souvent des problèmes pour leur description ou leur différenciation. Dans ces cas, les méthodes génétiques ou chimiotaxonomiques sont nécessaires pour identifier de manière sûre les souches. Actuellement les techniques phénotypiques les plus couramment utilisées par les microbiologistes sont :

3.1.1. L'analyse phénotypique classique

Elle concerne la caractérisation des microorganismes par une série de tests sur la base de critères de vitesse de croissance, de pH, de tolérance à la salinité ou à d'autres facteurs de l'environnement, croissance en présence de substrats donnés. Cette analyse phénotypique est classique et constitue la base de la microbiologie.

3.1.2. Les systèmes commerciaux

Ce sont des systèmes miniaturisés (Galerie API, BIOLOG...). Il s'agit d'une batterie de tests de caractérisation de microorganismes en présence de substrats (croissance, activité enzymatique...). Très pratiques d'utilisation et performants, ces systèmes permettent de créer des bases de données intéressantes. Cependant ils restent coûteux, et leur fabrication n'est pas assurée dans le temps.

3.1.3. La composition des parois cellulaires

Cette approche peut servir pour caractériser les bactéries mais elle est utilisée plutôt pour les bactéries à gram-positif, car la composition de leur paroi contient une variabilité d'éléments informatifs (Schleifer et Kandler 1972).

3.1.4. FAME (« fatty acid methyl ester ») ou analyse des acides gras cellulaires

Les acides gras sont les composants majoritaires des lipides cellulaires. Étant donné la variabilité de longueur de leur squelette lipidique, de la position de la double liaison ou aussi la variabilité des groupes de substitution présents sur leur chaîne, leur utilisation en taxonomie de prokaryotes a donné de bons résultats (Jones et Krieg 1984; Suzuki et al. 1993).

3.1.5. SDS-PAGE (« sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis ») des protéines cellulaires totales

Une cellule bactérienne contient plus de 2000 protéines différentes. Cela constitue une source d'information importante. La méthode SDS-PAGE consiste en l'extraction des protéines cellulaires totales que l'on fait ensuite migrer sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. On obtient ainsi des profils caractéristiques de chaque souche bactérienne.

3.1.6. MLEE (« multilocus enzyme electrophoresis »)

La technique MLEE est présentée par Selander et al. (1986) comme méthode puissante pour l'étude des populations de bactéries d'une même espèce ainsi que pour l'étude taxonomique. La discrimination entre les isolats se fait sur la base de variations de la mobilité électrophorétique de certaines enzymes bactériennes (allozymes = variante de la même enzyme codée par le même gène mais par des allèles différents). En effet, la variation de

mobilité observée est due à une différence dans la séquence d'acides aminés de l'enzyme et donc reflète une différence dans la séquence des paires de bases du gène codant pour cette enzyme. Au cours de l'analyse par MLEE, les enzymes bactériennes sont extraites et chargées sur gel d'amidon (qui permet un meilleur découpage des bandes que le gel de polyacrylamide).

Ensuite les bandes sont mises dans des solutions pour révéler la présence ou l'absence d'une enzyme. Dans le cas où l'enzyme est présente, sa mobilité est comparée pour les différents isolats.

3.2. Criblage moléculaire (génotypiques)

Il s'agit de techniques qui ciblent directement les molécules d'ADN et d'ARNr. Elles sont actuellement les méthodes dominantes de la taxonomie moderne. Ceci est la conséquence des progrès technologiques, mais également et surtout du fait que la nouvelle conception de la taxonomie est qu'elle doit refléter les similarités entre les génomes. La classification des bactéries basée sur les acides nucléiques présente plusieurs avantages : (i) le concept de l'espèce bactérienne est possible, (ii) cette classification ne subira pas des modifications fréquentes ou radicales, (iii) des systèmes d'identification fiables peuvent être établis après la classification des microorganismes, (iv) l'information obtenue est utile pour comprendre l'évolution des différents groupes bactériens et comment les arranger selon leurs relations de parenté.

3.2.1. Détermination du pourcentage guanine + cytosine (% G + C)

Le premier élément des acides nucléiques à avoir été utilisé en taxonomie est le pourcentage (mol %) de bases guanine et cytosine (Johnson 1984). Ce pourcentage varie chez les bactéries de 25 % à 75 %. Deux organismes proches phylogénétiquement ont des valeurs de mol % G + C voisines, mais deux organismes qui ont les mêmes valeurs de mol % G + C ne sont pas nécessairement proches phylogénétiquement. Cette valeur de mol % G + C est généralement donnée dans la description d'une nouvelle espèce, d'autant qu'il est nécessaire de la déterminer pour définir les conditions d'hybridation ADN:ADN.

3.2.2. L'hybridation ADN:ADN

La valeur d'hybridation entre les ADN totaux de deux souches est un indicateur de la similarité des séquences entre génomes entiers (De Ley et al. 1970; Grimont et al. 1980).

3.2.3. La caractérisation plasmidique

La caractérisation plasmidique consiste à déterminer le nombre et la taille des plasmides dans une cellule bactérienne.

3.2.4. Le séquençage de l'ADNr 16S et d'autres gènes

Les ARN ribosomiques (5S, 16S et 23S) constituent un outil de choix pour étudier les relations phylogénétiques grâce à sa présence chez toutes les bactéries, sa fonction constante et la présence de zones très conservées ainsi que des parties à séquences variables.

3.2.5. La méthode LMW (« low molecular weight ») RNA « staircase electrophoresis »

La méthode LMW a été décrite par Höfle (1988) et améliorée par Velázquez et al. (1998). Les molécules d'ARN de faible poids moléculaire sont extraites, et comprennent trois classes : l'ARNr 5S et les classes 1 et 2 d'ARNt. La séparation de ces molécules par électrophorèse à gradient de voltage croissant (augmentation de 50 V chaque 10 min, de 100 à 2300 V) sur gel de polyacrylamide résulte en des profils caractéristiques de chaque souche étudiée (Cruz-Sanchez et al. 1997). Les bandes situées dans la zone correspondant à l'ARNr 5S sont communes pour les souches appartenant au même genre et donc caractéristiques de celui-ci. La zone des profils correspondant à la sous-classe 2 des ARNt donnerait des informations au niveau spécifique, alors que la zone de profils correspondant à la sous-classe 1 des ARNt donnerait des informations à un niveau infraspécifique (Velázquez et al. 1998).

3.2.6. Les méthodes de typage basées sur la PCR

Les méthodes de typage génétique utilisent des techniques qui permettent de subdiviser le microorganisme étudié en un nombre distinct de types génotypiques. La PCR a permis le développement de nombreuses techniques de typage génétique qui ont l'intérêt d'être universelles, simples et rapides. Elles ont beaucoup servi pour la description de nouveaux taxons de BNL. Nous énumérons les techniques les plus couramment employées.

3.2.7. PCR-RFLP ou polymorphisme de fragments de restriction

Dans la méthode PCR-RFLP, la PCR est combinée avec les enzymes de restriction. L'ADNr 16S ou 23S avec ou sans l'IGS (espace intergénique entre les gènes d'ADNr 16S et 23S), ou bien d'autres gènes impliqués dans la symbiose ou la fixation d'azote, sont amplifiés avec des amorces universelles définies en alignant les séquences disponibles. Le produit de la PCR est ensuite digéré par des enzymes de restriction. Cette technique fournit principalement des profils spécifiques .

3.2.8. AFLP (« amplified fragment length polymorphism »)

L'AFLP est une approche moléculaire pour explorer le polymorphisme de séquences représentatives d'un génome entier. Elle a été décrite par Zabeau et Vos (1993).

L'ADN génomique total est digéré par des enzymes de restriction de deux sortes : une qui reconnaît un site de coupure fréquent (4 bases d'ADN) et une autre qui reconnaît un site de coupure rare (6 à 8 bases). Ensuite il y a ligation des fragments de restriction avec deux adaptateurs dont les extrémités 3' sont complémentaires aux sites de restriction et contenant une base différente pour empêcher la restriction d'avoir lieu de nouveau. Cette étape est suivie d'une amplification sélective des fragments de restriction par l'utilisation d'amorces homologues aux adaptateurs et contenant chacun deux ou trois bases sélectives à leur extrémité 3'. De ce fait, une partie seulement des fragments de restriction sera amplifiée. Le marquage au ³²P ou au fluorochrome de l'amorce correspondant au site rare de coupure permet de visualiser les bandes par autoradiographie.

3.2.9. RAPD (Random amplification of polymorphic DNA) ou AP-PCR (« arbitrarily primed PCR »)

La technique RAPD appelée aussi AP-PCR a été introduite en 1990 (Williams et al. 1990; Welsh et McClelland 1990). Le principe de la méthode est d'effectuer des réactions de PCR avec une seule amorce dont la séquence est courte (9 à 10 pb) et choisie au hasard. Le nombre de sites correspondant à l'amorce utilisée peut varier d'une souche à une autre au sein de la même espèce. Après séparation des produits de PCR sur gel d'agarose, on obtient un profil de bandes caractéristique de la souche étudiée. Le choix des amorces est empirique.

3.2.10. REP-PCR (« repetitive extragenic palindromic » ou « repetitive element PCR »)

La méthode de REP-PCR a été introduite par Versalovic et al. (1991). Le but de cette méthode est de caractériser des souches bactériennes par des profils électrophorétiques obtenus en amplifiant des séquences répétitives appelées séquences REP.

3.2.11. MLSA (« multi locus sequence analysis »)

La méthode MLSA a été proposée par Maiden et al. (1998). Les auteurs soulignent que cette technique, à l'inverse de la majorité des techniques de typage dont les résultats ne sont pas comparables entre différents laboratoires, donne des résultats qui peuvent être comparés entre les laboratoires. En effet, il s'agit de choisir un certain nombre de gènes ancillaires (« housekeeping genes ») et de déterminer leurs séquences. Chaque souche est ainsi caractérisée par un ensemble de séquences correspondant aux gènes choisis. Cette technique s'apparente à la technique MLEE (que nous décrivons plus loin) en ce qui concerne le pouvoir discriminant, en ce sens qu'elle cible directement sur les séquences des gènes, alors que la MLEE utilise la mobilité électrophorétique des produits de ces gènes. Les dendrogrammes construits à partir de matrices de similarité par la MLSA sont généralement concordants avec ceux obtenus par la MLEE (Maiden et al. 1998).