

Utilisation des facteurs Nod pour la caractérisation symbiotique des rhizobiums : application aux souches d'*Acacia* et de *Sesbania* du Sénégal

Catherine BOIVIN,
Microbiologiste

Gilles LORTET,
Microbiologiste

Jean LORQUIN,
Microbiologiste

Salif BA,
Microbiologiste

Nathalie MÉAR,
Microbiologiste

Myriam FERRO,
Biochimiste

Philippe de LAJUDIE,
Taxonomie microbienne

Jean-Claude PROMÈ,
Biochimiste

Bernard DREYFUS,
Microbiologiste

Introduction

Les bactéries capables d'infecter et de former des nodosités fixatrices d'azote sur les racines ou les tiges des plantes appartenant à la famille des Légumineuses sont communément appelées rhizobiums. Une des caractéristiques principales de cette association symbiotique est sa spécificité. En effet, une souche donnée infecte un nombre limité d'espèces végétales, appelé spectre d'hôte de la bactérie. De récents progrès dans la connaissance des mécanismes aboutissant à l'infection et à la formation d'un nodule ont montré

qu'un dialogue moléculaire était à l'origine de la reconnaissance entre le symbionte bactérien et sa plante-hôte (fig. 1).

Les gènes bactériens dits de nodulation (gènes *nod*, *nol*, *noe*), qui comprennent les gènes de structure et les gènes régulateurs, jouent un rôle central dans ce dialogue. En présence d'inducteurs végétaux (flavonoïdes, bétaines), les protéines régulatrices NodD sont activées et induisent l'expression des gènes de structure (Fellay *et al.*, 1995). L'expression des gènes structuraux conduit à la production de signaux bactériens extracellulaires ou facteurs Nod, qui jouent un rôle essentiel dans le processus d'infection et l'organogenèse des nodules (Dénarié *et al.*, 1996). Tous les facteurs Nod décrits sont constitués d'un squelette de 3 à 6 résidus N-acétyl-D-glucosamine, substitué par une chaîne d'acyl au niveau de l'extrémité non réductrice et portant divers motifs structuraux aux deux extrémités de la chaîne oligosaccharidique. La nature de l'acide gras et des autres décorations dépend de la souche ou de l'espèce de rhizobium (Dénarié *et al.*, 1996).

La reconnaissance entre une protéine régulatrice NodD donnée et un ensemble particulier d'inducteurs végétaux détermine un premier niveau de spécificité dans l'interaction symbiotique. La structure des facteurs Nod, contrôlée par un ensemble de gènes *nod* dits spécifiques, détermine un deuxième niveau de spécificité. Chez de nombreuses espèces de *Rhizobium*, les gènes de nodulation sont portés par

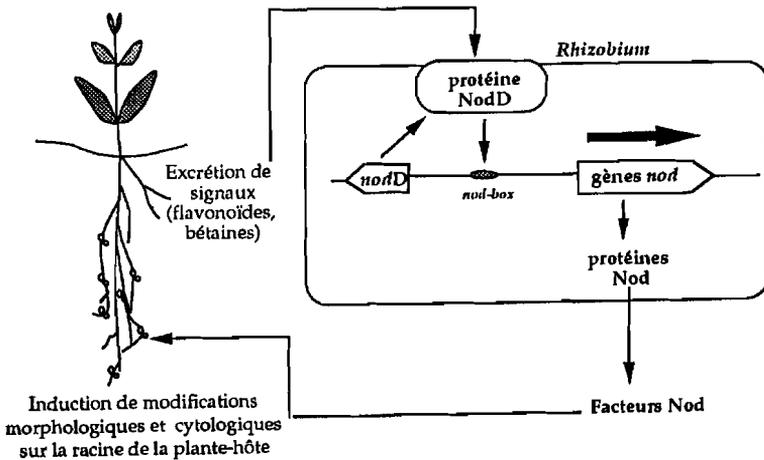


Figure 1
Echanges de signaux contrôlant
les interactions symbiotiques précoces.

des plasmides, dont le transfert entre rhizobiums pourrait être responsable de modifications du spectre d'hôte.

Les rhizobiums ne forment pas un groupe taxonomique homogène. Ils sont répartis en quatre genres différents : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Azorhizobium*. Certains d'entre eux sont phylogénétiquement plus proches de bactéries non symbiotiques comme *Agrobacterium* ou *Rhodopseudomonas* que d'autres rhizobiums (Young, 1994 ; Martinez-Roméro, 1994). Leur classification, à l'image de la taxonomie bactérienne, est basée sur une approche polyphasique qui ne retient plus les propriétés symbiotiques comme critère taxonomique (Graham *et al.*, 1991). En effet, une même légumineuse peut être nodulée par différentes espèces de rhizobiums (le soja est nodulé par *S. fredii* et *B. japonicum*) tandis qu'une même espèce peut regrouper des bactéries de spécificités d'hôte différentes (*R. leguminosarum* est divisé en trois biovars *bv. viciae*, *bv. trifolii* et *bv. phaseoli*).

L'intérêt agronomique et écologique des rhizobiums repose essentiellement sur leurs propriétés symbiotiques. Il est donc capital de pouvoir apprécier la diversité des souches sur la base de ce critère. Or, jusqu'à présent, seuls les tests de nodulation réalisés en laboratoire, longs, fastidieux et limités, permettent de classer les souches en fonction de leur spectre d'hôte. L'objectif de ce travail est de proposer une nouvelle approche, alternative aux tests de nodulation, permettant de classer les souches en fonction de leur spécificité symbiotique. Pour cela, une collection de souches isolées d'*Acacia* et de *Sesbania* a été utilisée pour rechercher des marqueurs potentiels de la spécificité d'hôte parmi les différents déterminants moléculaires de la nodulation préalablement identifiés (plasmides, inducteurs, gènes *nod*, facteurs Nod).

Matériels et méthodes

Construction de souches surproductrices

Le plasmide pA28, portant le gène *NodD1* de la souche *Rhizobium* sp. NGR234 (Price *et al.*, 1992) a été introduit dans des déri-

vés résistants à la streptomycine des souches sauvages de rhizobium par croisement triparental. Les tansconjugants ont été sélectionnés à 37 °C sur milieu YM (de Lajudie *et al.*, 1994) additionné de tétracycline (10 µg. ml⁻¹) et streptomycine (100 µg. ml⁻¹). La présence du plasmide a été vérifiée par extraction plasmidique rapide et digestion enzymatique (Sambrook *et al.*, 1989).

Détection des facteurs Nod en chromatographie sur couche mince

A partir d'une culture de nuit, les cellules surproductrices ont été diluées à une absorbance $A = 0,02$ à 600 nm dans un volume final de 2,5 ml et mises à incuber à 30° C pendant 24 h en milieu V (Lortet *et al.*, 1996) en présence de tétracycline 5 µg. ml⁻¹, d'apigénine 1 µM et d'acétate radioactif 10 µCi (¹⁴C, 56 mCi. mmol⁻¹, Amersham) ou de sulfate radioactif 10 µCi (³⁵S, 1000 mCi. mmol⁻¹, Amersham). 1 ml du surnageant bactérien des cultures radioactives a été extrait au butanol et déposé sur plaque de chromatographie (100 % octadécyl, Sigma) selon la méthode décrite par Spaink *et al.* (1992). Les composés radioactifs ont été visualisés après une semaine d'exposition en présence d'un film autoradiographique (Kodak X-OMAT K).

■ Résultats et discussion

Corrélation entre les profils chromatographiques des facteurs Nod et la spécificité d'hôte des rhizobiums

La majorité des rhizobiums à croissance rapide isolés d'*Acacia* et de *Sesbania* au Sénégal appartiennent aux espèces *Sinorhizobium saheli* (souches de *Sesbania*), *S. teranga* (souches d'*Acacia* et de *Sesbania*) ou au groupe U (souches d'*Acacia*) (de Lajudie *et al.*, 1994).

Des tests de nodulation réalisés avec une collection de ces rhizobiums ont montré que les isolats d'une même plante présentent le même spectre d'hôte, qui est différent pour les souches d'*Acacia* et celles de *Sesbania*, quelle que soit leur position taxonomique (Lortet *et al.*, 1996). Toutes les souches d'*Acacia* nodulent *A. senegal*, *A. raddiana*, *A. nilotica*, *Prosopis juliflora* et *Leucaena leucocephala*, mais aucune des espèces de *Sesbania* testée. Tous les isolats de *Sesbania* induisent des nodules fixateurs d'azote sur *S. rostrata*, *S. grandiflora* et *S. pubescens*, mais ne nodulent pas *A. senegal*, *A. nilotica*, *P. juliflora* et *L. leucocephala* et, dans certains cas, nodulent très pauvrement *A. raddiana*. Le fait que l'espèce *S. teranga* comprenne deux types de souches de spécificités d'hôte distinctes nous a conduits à la diviser en deux biovars, *acaciae* et *sesbaniae*.

Des souches appartenant aux 4 groupes ainsi définis ont été rendues surproductrices de facteurs Nod par l'introduction de gènes régulateurs *NodD* hétérologues portés par des plasmides multicopie (Lortet *et al.*, 1996). Les surnageants des suspensions bactériennes cultivées en présence d'acétate marqué ont été extraits au butanol et analysés en chromatographie sur couche mince (CCM) selon la méthode décrite par Spaink *et al.* (1992) (Lortet *et al.*, 1996). L'analyse chromatographique des facteurs Nod des souches surproductrices a montré que (fig. 2) : *i*) les souches isolées d'une même plante ont des profils similaires (présence de nombreuses bandes communes); *ii*) les profils des souches d'*Acacia* sont facilement distinguables de ceux des souches de *Sesbania*, seules les souches d'*Acacia* produisant des molécules sulfatées (Lortet *et al.*, 1996). Par contre, aucune corrélation n'a pu être établie entre le spectre d'hôte d'une souche, son contenu plasmidique, la nature des inducteurs et la présence de séquences homologues à des gènes *nod* spécifiques codant des substitutions particulières des facteurs Nod. Nous proposons donc que l'analyse chromatographique des facteurs Nod soit utilisée comme méthode de classification des rhizobiums sur la base de leur spectre d'hôte. Une des premières applications pourrait être de l'associer à la taxonomie pour la description des biovars (des souches de la même espèce mais de spécificités d'hôte différentes définissent différents biovars) ainsi que pour l'analyse de la diversité symbiotique des rhizobiums en vue de la conservation de leur biodiversité.

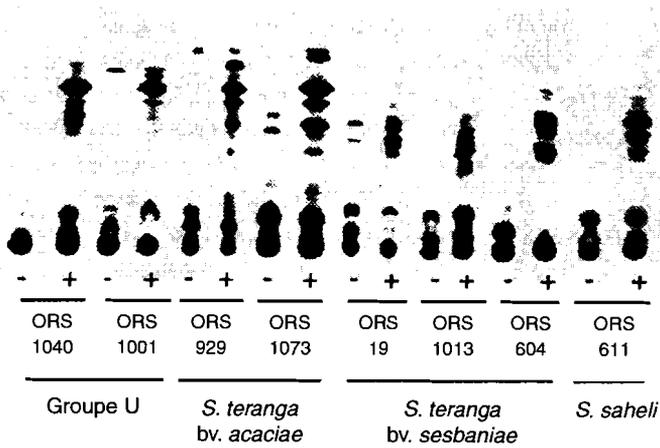


Figure 2
Séparation en chromatographie sur couche mince des facteurs Nod de souches surproductrices d'*Acacia* et de *Sesbania*; (+) induit par un flavonoïde; (-) non induit. La radioactivité est visualisée après 3 à 8 jours d'exposition avec un film Kodak X-OMAT K.

Détermination de la structure chimique des facteurs Nod

Les facteurs Nod de souches surproductrices appartenant aux espèces *S. saheli*, *S. teranga* bv. *sesbaniae*, *S. teranga* bv. *acaciae* ou au groupe U ont été purifiés par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) et leur structure déterminée par LSIMS (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry) et 1H-RMN (Proton Resonance Magnetic Nuclear) (fig. 3).

Toutes les souches produisent des molécules dont l'extrémité non réductrice porte un groupement O-carbamoyl, un groupement N-méthyl et une chaîne d'acyl en C18 : 0, C18 : 1 ou C16 : 0. Par contre, les extrémités réductrices des facteurs Nod des souches d'*Acacia* et de *Sesbania* sont très différentes : elles sont partiellement sulfatées pour les souches d'*Acacia*, et généralement doublement glycosylées (un groupement arabinose et un groupement fucose) pour les souches de *Sesbania*. L'espèce *A. caulinodans* isolée de *S. rostrata* produit des facteurs Nod de structure identique à

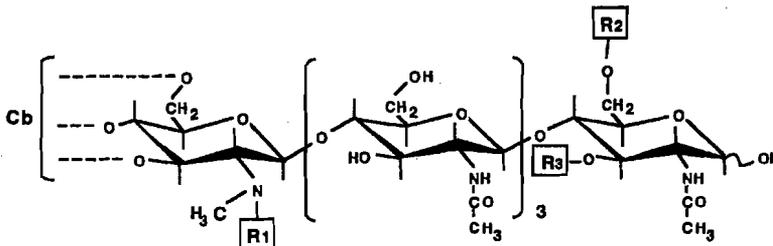


Figure 3
Représentation schématique de la structure chimique des facteurs Nod des rhizobiums d'*Acacia* et de *Sesbania* (voir tabl. 1).

celle des facteurs Nod des *Sinorhizobium* de *Sesbania* (Mergaert *et al.*, 1997). Par ailleurs, *R. tropici*, qui peut noduler *A. senegal*, synthétise des facteurs Nod de structure très proche de celle de nos souches d'*Acacia* (Poupot *et al.*, 1993). Ces résultats montrent que les similitudes ou les différences observées entre les profils chromatographiques reflètent des homologies ou des variations dans la structure des facteurs Nod et confirment donc la relation étroite existant entre la spécificité d'hôte et la structure des facteurs Nod, indépendamment de la taxonomie. Par ailleurs, les caractéristiques structurales uniques des souches de *Sesbania* (*S. saheli*, *S. teranga* *bv. sesbaniae*, *A. caulinodans*) témoignent d'une très forte pression de sélection de la part de la plante-hôte.

Plante-hôte	Souche ou espèce	Substitutions		
		R1	R2	R3
<i>Acacia</i>	<i>S. teranga</i> <i>bv. acaciae</i>	C18 : 1, C18 : 0	SO ₃ H	H
<i>Acacia</i>	<i>Rhizobium</i> sp. ORS1001	C18 : 1, C18 : 0	SO ₃ H	H
<i>Sesbania</i>	<i>S. saheli</i>	C18 : 1, C16 : 0	Fuc	D-Ara
<i>Sesbania</i>	<i>S. teranga</i> <i>bv. sesbaniae</i>	C18 : 1, C16 : 0	Fuc	D-Ara

Tableau 1
Structure chimique des facteurs Nod des rhizobium isolés d'*Acacia* et de *Sesbania* au Sénégal. Seule la structure des facteurs Nod prépondérants est donnée dans ce tableau. La position du groupement carbamoyl n'est pas précisément déterminée (C-3, C-4 ou C-6 de l'extrémité non réductrice). Fuc = fucose; Ara = arabinose; Substitutions R1, R2, R3 : voir figure 3.

Homogénéité des profils chromatographiques des facteurs Nod d'isolats d'*Acacia raddiana* de positions taxonomiques variées

Pour confirmer l'intérêt de l'analyse chromatographique des facteurs Nod dans la caractérisation symbiotique des rhizobiums, une collection de souches récemment isolées d'une même espèce végétale, *A. raddiana*, a été étudiée. L'analyse électrophorétique des protéines cellulaires totales (SDS-Page) a montré que toutes les souches isolées d'*A. raddiana* au Sénégal se répartissent en 11 groupes taxonomiques différents (de Lajudie, résultats non publiés). Une quinzaine de souches réparties dans les différents groupes ont été modifiées par l'introduction du gène *NodD1* de *Sinorhizobium* sp. NGR234 cloné sur un plasmide multicopie (cf matériels et méthodes). A une exception près, toutes les souches surproductrices présentent des profils extrêmement proches (fig. 4). L'homogénéité obtenue est supérieure à celle des profils de souches isolées de diverses espèces d'*Acacia* ou maintenues en laboratoire depuis de nombreuses années. Ces résultats suggèrent que, dans des conditions où les bactéries sont en compétition, la plante exerce une pression de sélection en faveur des souches, produisant une population de fac-

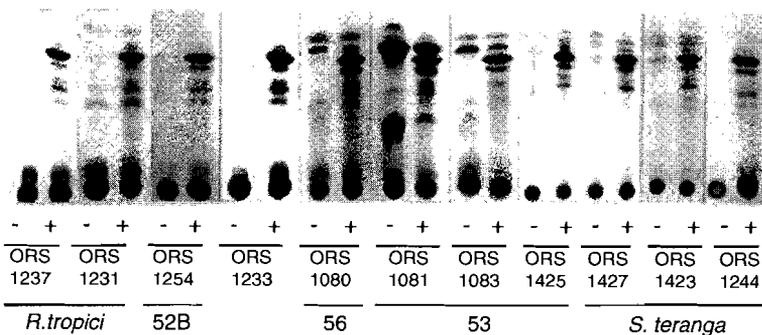


Figure 4

Séparation en chromatographie sur couche mince des facteurs Nod de souches surproductrices d'*Acacia raddiana*. (+) : induit par un flavonoïde ; (-) : non induit. La radioactivité est visualisée après 3 à 8 jours d'exposition avec un film Kodak X-OMAT K.

52B, 53 et 56 représentent des numéros de groupe taxonomique.

teurs Nod présentant des particularités structurales bien définies. Une telle technique de caractérisation globale des facteurs Nod pourrait donc être intéressante pour le suivi du pouvoir de nodulation des inoculums.

Conclusion

Le développement d'une méthode de caractérisation symbiotique des rhizobiums basée sur l'analyse des facteurs Nod, simple, standardisable et permettant une analyse globale du potentiel de nodulation d'une souche donnée présenterait un grand intérêt à la fois dans le domaine fondamental et dans le domaine appliqué. Elle permettrait :

- i)* d'introduire un paramètre « nodulation » dans la classification taxonomique actuelle des rhizobiums.
- ii)* de pouvoir apprécier la diversité symbiotique des rhizobiums et donc de conserver des souches présentant des potentiels de nodulation différents.
- iii)* de disposer d'outils permettant d'évaluer la stabilité de caractères symbiotiques dans le sol.

Remerciements

Ce travail a été financé en partie par la Commission de la Communauté Européenne (Contrat TS3 CT93 02 32), par le Bureau des Ressources génétiques et par le programme Microbiologie AIPINRA.

Bibliographie

DE LAJUDIE (P.), WILLEMS (A.),
POT (B.), DEWETTINCK (D.),
MAESTROJUAN (G.), NEYRA (M.),
COLLINS (M. D.), DREYFUS (B. L.),

KERSTERS (K.), 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.
- DENARIE (J.), DEBELLE (F.), PROMÉ (J. C.), 1996 - Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors : signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann. Rev. Biochem.*, 65 : 503-535.
- FELLAY (R.), ROCHEPEAU (P.), RELIC (B.), BROUGHTON (W. J.), 1995 - "Signals to and emanating from Rhizobium largely control symbiotic specificity." In Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases, Vol. 1 : Prokaryotes. (U. S.) Singh, (R. P.) Singh, (K.) Kohmoto éds. Pergamon/Elsevier Science Ltd., Oxford, 199-220.
- GRAHAM (P. H.), SADOWSKY (M. J.), KEYSER (H. H.), BARNET (Y. M.), BRADLEY (R. S.), COOPER (J. E.), DE LEY (D. J.), JARVIS (B. D. W.), ROSLYCKY (E. B.), STRIJDOM (B. W.), YOUNG (J. P. W.), 1991 - Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41 : 582-587.
- LORTET (G.), MEAR (N.), LORQUIN (J.), DREYFUS (B.), DE LAJUDIE (P.), ROSENBERG (C.), BOIVIN (C.), 1996 - Nod Factor Thin-Layer Chromatography profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of rhizobial strains : Application to *Sinorhizobium saheli*, *S. teranga* and *Rhizobium* sp. *stams* isolated from *Acacia* and *Sesbania*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 9 : 736-747.
- MARTINEZ-ROMERO (E.), 1994 - Recent developments in Rhizobium taxonomy. *Plant Soil*, 161 : 11-20.
- MERGAERT (P.), FERRO (M.), DHAËZE (W.), VAN MONTAGU (M.), HOLSTERS (M.), PROMÉ (J. C.), 1997 - Nod factors of Azorhizobium caulinodans strain ORS571 can be glycosylated with an arabinosyl group, a fucosyl group, or both. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 10 : 683-687.
- POUPOT (R.), MARTINEZ-ROMERO (E.), PROMÉ (J. C.), 1993 - Nodulation factors from Rhizobium tropici are sulfated or non sulfated chitopentasaccharides containing an N-methyl-N-acylglucosaminyl terminus. *Biochem.*, 32 : 10430-10435.
- PRICE (N. P. J.), RELIC (B.), TALMONT (F.), LEWIN (A.), PROMÉ (D.), PUEPKKE (S. G.), MAILLET (F.), DENARIE (J.), PROMÉ (J. C.), BROUGHTON (W. J.), 1992 - Broad-host-range Rhizobium species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. *Mol. Microbiol.*, 6 : 3575-3584.
- SAMBROOK (J.), FRITSCH (E. F.), MANLATS (T.), 1989 - Molecular cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- SPAINK (H. P.), AARTS (A.), STACEY (G.), BLOEMBERG (G. V.), LUGTENBERG (B. J. J.), KENNEDY (E. P.), 1992 - Detection and separation of Rhizobium and Bradyrhizobium Nod metabolites using thin-layer chromatography. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5 : 72-80.
- YOUNG (J. P. W.), 1994 - "All those new names : an overview of the molecular phylogeny of plant-associated bacteria." In Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions, (M. J.) Daniels, (J. A.) Downie, (A. E.) Osbourn éds. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands : 73-80.