

50376  
1979  
5

N° d'ordre : 777

50376  
1979  
5

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE**

Spécialité : **BIOCHIMIE**

par

Francis DELMAERE



**ETUDE DES TRANSFERTS GENETIQUES CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI  
AU MOYEN DU PLASMIDE RP<sub>4</sub>**

Soutenue le 14 septembre 1979, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury : MM.

J. GUILLAUME

Président

J.C. DERIEUX

J. KREMBEL

G. MARTIN

C. BONNIER

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE sous la direction de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME. Ses conseils judicieux, reflets de sa valeur scientifique, ont permis la réalisation de ce travail. Le moment est venu de le remercier vivement et de lui exprimer toute notre gratitude et notre profond respect.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Monsieur le Professeur J. C. DERIEUX qui a bien voulu accepté d'être le Rapporteur de cette thèse.

Notre reconnaissance s'adresse également à Messieurs les Professeurs J. KREMBEL, G. MARTIN et Monsieur le Recteur C. BONNIER de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux qui nous font l'honneur de juger ce travail.

Nous tenons à associer à cet ouvrage Messieurs M. BECHET et C. NIEL qui, grâce à leur esprit d'équipe, ont apporté une aide et une collaboration précieuses. Nous les assurons de notre amitié.

Nous remercions nos collègues du laboratoire de Microbiologie, et plus particulièrement Monsieur R. RAKOTOARISOA, pour la sympathie et la gentillesse qu'ils nous ont toujours manifestées.

Que soit également remerciée Madame P. LETOQUART qui, à divers titres, nous a apporté son aide efficace dans des conditions parfois difficiles.

Enfin, nous adressons nos remerciements à la Direction et au Personnel de l'Administration de l'Université chez qui nous avons toujours apprécié l'aide et la compréhension.

# Table des Matières

## TABLE DES MATIERES

. AVANT-PROPOS	1
. GENERALITES	5
I - La sélection de mutants chez <u>Rhizobium</u>	5
II - Les transferts de matériel génétique chez <u>Rhizobium</u>	7
1) La transformation	7
2) La transduction	8
3) La conjugaison	9
III - Les mécanismes impliqués dans la conjugaison	13
1) Introduction	13
2) Les plasmides	15
a) Définition	15
b) Propriétés générales	16
3) Les facteurs R	17
a) Classification	17
b) Transfert	17
c) Mobilisation chromosomique	19
. BUT DU TRAVAIL	22
. MATERIEL ET METHODES	24
I - Souches bactériennes	24
II - Milieux de culture	25
1) Milieux complets	25
2) Milieu minimum	27
3) Gélose molle	27
III - Solutions d'antibiotiques	27
IV - Sélection de mutants	
1) Sélection de résistants aux antibiotiques	28
2) Sélection de mutants auxotrophes	28
V - Techniques de croisement	
1) Milieu liquide	30
2) Milieu gélosé	31
3) Croisements sur filtre	32
4) Techniques communes	32

. RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIERE PARTIE	34
I - Mise en évidence du transfert du $RP_4$ chez <u>Rhizobium meliloti</u>	34
1) Obtention de souches résistantes à la tétracycline	35
2) Vérification des phénotypes de résistance	37
II - Influence du milieu de culture et de contact	39
III - Etude comparative des différentes techniques de conjugaison	40
1) Croisements en milieu liquide	41
2) Croisements sur milieu gélosé	42
3) Croisements sur filtres	43
IV - Rôle de l'agitation mécanique des cultures $R^+$ sur l'efficacité du transfert	45
1) Croisements sur milieux gélosés	47
2) Croisements sur filtres	49
V - Effet du nombre total de cellules sur le nombre de transconjuguants	49
VI - Discussion	51
DEUXIEME PARTIE	52
I - Précultures successives des transconjuguants	53
II - Croisement effectué avec une souche $R^-$ ayant déjà été en contact avec une population de cellules donatrices	54
III - Croisement avec une population réceptrice synchronisée	56
IV - Etude de la régulation des bactéries donatrices	57
1) Effet de la tétracycline sur la régulation du $RP_4$	58
2) Croisements à trois partenaires	60
V - Effet du rapport $\frac{\text{nombre de cellules donatrices}}{\text{nombre de cellules réceptrices}}$ sur le nombre de transconjuguants	64
VI - Discussion	65

TROISIEME PARTIE

69

I - Cinétiques de recombinaison	69
II - Effet de la préculture des bactéries R <sup>+</sup> en présence de tétracycline sur le transfert des gènes chromosomiques	72
III - Croisements à trois partenaires	73
IV - Discussion	74
. CONCLUSION GENERALE	75
. BIBLIOGRAPHIE	

# Avant-propos

## AVANT - PROPOS

L'utilisation des plantes de la famille des légumineuses dans les assollements précède de beaucoup la démonstration de la fixation de l'azote atmosphérique par les nodules racinaires.

Le concept de symbiose est apparu en 1888 grâce à l'isolement par BEIJERINCK de Rhizobium à partir de broyats racinaires. Cette association s'établit en trois étapes fondamentales ayant fait l'objet de nombreuses revues (1, 2, 3)

La première débute par l'attraction du Rhizobium dans la rhizosphère, conduisant à l'accrochage de la bactérie sur le poil absorbant. A chaque groupe de légumineuses correspond une espèce de Rhizobium capable de l'infecter, cette reconnaissance stricte constitue la spécificité d'hôte. Ces notions ont permis la classification des Rhizobiaceae en 7 groupes d'inoculation (tableau I), constituant encore à l'heure actuelle le seul critère taxonomique.

Espèces	Plantes - hôtes
<u>Rhizobium</u> à croissance rapide	
<u>R. léguminosarum</u>	Pisum, Cicer, Lens, Vicia
<u>R. meliloti</u>	Medicago, Melilotus
<u>R. phaseoli</u>	Phaseolus
<u>R. trifolii</u>	Trifolium
<u>Rhizobium</u> à croissance lente	
<u>R. japonicum</u>	Glycine
<u>R. lupini</u>	Lupinus, Ornithopus
<u>R. du "cowpea group"</u>	Arachis, Lotus, Vigna

Tableau I :  
Les différents groupes d'inoculation Rhizobium -légumineuses,  
d'après VINCENT (4).



Les régulations biochimiques et génétiques de ces phénomènes sont encore inconnues, mais il semble de plus en plus qu'elles mettent en jeu des interactions stéréospécifiques de type "antigène-anticorps". Certains travaux tendent à démontrer l'interaction possible entre les lipopolysaccharides bactériens et les lectines : protéines végétales à propriété antigénique (5, 6). De plus, l'exopolysaccharide bactérien semble également impliqué, en effet, certains mutants incapables de le synthétiser sont devenus par la même occasion non nodulants (7). Toutefois, aucune relation précise n'a été faite entre les différents résultats.

Ensuite la bactérie pénètre dans les tissus végétaux, elle y subit plusieurs divisions avant d'atteindre les cellules tétraploïdes par la voie du "cordon infectieux". A ce niveau, le Rhizobium se différencie en bactéroïdes, structure comparable à un sphéroplaste bactérien entouré d'une membrane de séquestration d'origine végétale. Ce changement de morphologie est accompagné de profonds bouleversements du métabolisme bactérien qui aboutissent à la formation du nodule.

L'environnement particulier à l'intérieur du nodule permet l'induction des systèmes enzymatiques responsables de la réduction de l'azote. Les réactions sont catalysées par le complexe nitrogénase, protéine d'origine bactérienne codée par les gènes "nif" (nitrogen-fixation). Les régulations qui interviennent à ce niveau sont très mal connues, toutefois, la présence dans le nodule d'une ferroprotéine (pigment rouge) ou leghémoglobine conjointement synthétisée par les deux partenaires (8) semble être une des causes du fonctionnement préférentiel de la nitrogénase en symbiose. Cependant, l'existence de certaines souches de Rhizobium fixatrices libres montre la complexité des régulations génétiques (9).

La mise en place d'une association fonctionnelle fait donc intervenir deux principes fondamentaux :

- l'infectivité, propriété de toute bactérie induisant la formation de nodules,

- l'efficience caractérise la capacité des deux partenaires à réduire l'azote atmosphérique.

L'explication des phénomènes physiologiques intervenant dans la symbiose passe par une étude génétique approfondie des régulations de l'infectivité et de l'efficience propres à chaque partenaire.

Ceci nécessite : - d'une part, l'obtention de mutants sur des caractères déterminés.

- d'autre part, la mise au point de systèmes de transfert de matériel génétique.

La culture des légumineuses présente l'avantage de constituer un apport protéique considérable tout en réduisant l'utilisation coûteuse des engrais azotés. L'amélioration des fonctions symbiotiques et leur extension à des plantes appartenant à d'autres familles constituent donc un intérêt économique de premier ordre. En pratique, l'agriculture se heurte encore à de nombreux problèmes liés aux propriétés génétiques du Rhizobium et de sa plante-hôte.

En particulier, la spécificité d'hôte, la compétitivité entre souches et la sensibilité du Rhizobium à diverses agressions représentent les obstacles principaux.

La modification de la spécificité de l'hôte végétal nécessite une intervention au niveau des génomes bactérien et végétal aussi bien par la sélection de mutants que par le transfert des gènes impliqués dans la reconnaissance bactérie-plante. La difficulté majeure réside dans l'utilisation du matériel végétal beaucoup moins facile à étudier.

Par contre, un certain nombre de travaux décrit le transfert des gènes de l'infectivité entre bactéries appartenant à des groupes d'inoculation différents (10).

L'utilisation des techniques d'inoculation à grande échelle a contribué également à une importante amélioration des rendements, par l'apport en quantité suffisante de souches mieux adaptées aux conditions écologiques ou particulièrement efficaces. L'extension de ce type de méthodes est retardée à cause des phénomènes de compétitivité entre les bactéries indigènes et la souche apportée. L'infection de la plante est,

en effet, souvent réalisée par la souche indigène plus résistante aux agressions chimiques et biologiques du sol considéré. A ce sujet, la mécanisation des techniques agricoles a introduit sur le marché divers herbicides et pesticides capables de présenter un effet bactéricide vis-à-vis de l'inoculum. A ces agressions chimiques, s'ajoute la présence des Rhizobiophages, bactériophages spécifiques du Rhizobium (11) qui peuvent présenter une agression biologique non dédaignable. La solution de ces problèmes est sans aucun doute la sélection de souches résistantes qui présentent de plus l'avantage de pouvoir être repérées plus facilement à l'intérieur du nodule, propriété particulièrement intéressante pour les études de compétitivité.

A l'heure actuelle, les travaux se multiplient afin de mieux comprendre ces divers phénomènes. Ce travail entre dans le cadre d'une étude génétique en vue de l'acquisition d'un système de transfert de gènes chromosomiques chez Rhizobium meliloti à l'aide d'un plasmide conjugatif isolé de Pseudomonas aeruginosa : le facteur RP 4. Le transfert s'effectue par conjugaison, mais le rôle exact joué par le facteur de résistance aux antibiotiques reste très obscur.

Avant d'envisager nos propres travaux nous allons étudier les résultats obtenus chez Rhizobium par les différentes techniques de transfert génétique mises au point chez Escherichia coli. Une place plus importante sera allouée aux mécanismes impliqués dans les phénomènes de conjugaison dans le but d'effectuer une étude comparative entre ces deux espèces.

# Généralités

## GENERALITES

La caractérisation d'un transfert de matériel génétique entre bactéries nécessite l'utilisation de partenaires possédant des phénotypes différents associés à des mutations les plus variées possibles. Cette condition est étroitement liée à la mise au point d'un système de mutagénèse efficace permettant la sélection de bactéries ayant des marqueurs génétiques stables et répartis sur l'ensemble du chromosome. Par conséquent, avant d'étudier les transferts chez Rhizobium, nos recherches bibliographiques se sont orientées vers les différentes techniques de mutagénèse.

### I - LA SELECTION DE MUTANTS CHEZ RHIZOBIUM

Pendant de nombreuses années, les auteurs ont transposé au Rhizobium les techniques mises au point chez Escherichia coli sans tenir compte des propriétés physiologiques particulières à la bactérie utilisée. L'obtention de mauvais résultats ne semble pas être la cause d'une propriété innée du Rhizobium qui le rendrait réfractaire aux agents mutagènes mais plutôt à une ignorance des conditions compatibles avec une bonne efficacité. Ceci explique le faible nombre de marqueurs génétiques caractérisés lors des premières études de transfert qui consistent le plus souvent en des passages de gènes concernant la résistance aux antibiotiques dont la sélection est directe par mutation spontanée.

Une étude effectuée au laboratoire montre que l'utilisation de la nitrosoguanidine permet l'obtention de mutants auxotrophes stables à des fréquences convenables (12), mais plus faibles que celles décrites chez E. coli (13). De plus, il apparaît que les phénotypes obtenus varient peu, l'agent mutagène ayant vraisemblablement des points d'impact très proches. L'utilisation de la pénicilline pour la contre-sélection offre, par ailleurs, de mauvais rendements, par contre son remplacement par la carbénicilline permet d'augmenter sensiblement l'efficacité, au moins en ce qui concerne les marqueurs d'auxotrophie (14). L'ensemble de ces travaux a amélioré de façon considérable la collection de souches auxo-

trophes, condition indispensable à l'élaboration d'une carte génétique. L'utilisation d'agents mutagènes différents (rayons U. V. ; éthyl-méthane sulfonate; etc. . . ) élargit notablement la variété des marqueurs, chaque composé ayant son propre mode d'action.

Actuellement, la difficulté essentielle reste la sélection de bactéries modifiées sur les caractères d'infectivité et d'efficience, phénotypes en relation directe avec les propriétés symbiotiques du Rhizobium. L'obtention de tels mutants relève le plus souvent du hasard et leur vérification met en œuvre des techniques fastidieuses telles que les tests de nodulation et de réduction de l'acétylène. Les travaux actuels s'orientent donc vers la découverte de relations spécifiques entre les caractères symbiotiques et des propriétés physiologiques plus faciles à déterminer. Dans ce sens, la découverte de souches exigeantes en histidine ayant perdu leur pouvoir de nodulation (15) semblait pouvoir apporter la solution mais ce type de relation apparaît de plus en plus comme une caractéristique particulière du mutant.

Par contre, la sélection de bactéries déficientes dans la synthèse d'exopolysaccharides est en mesure d'apporter de meilleurs résultats (16) si l'on admet que ces macro molécules synthétisées par Rhizobium (17) sont impliquées dans la reconnaissance bactérie-plante (18). En ce qui concerne l'efficience, les auteurs ont remarqué que l'exigence en bases nucléiques (19) ou la résistance à certains antibiotiques telle la viomycine (20) pouvaient constituer des critères de sélection de mutants négatifs mais, là encore, aucune explication génétique n'a pu être avancée. Quelque soit la technique de sélection, la détermination des phénotypes nécessite l'utilisation de la plante-hôte et l'étude d'un grand nombre de clones. L'autre facteur limitant dans la génétique du Rhizobium est la difficulté d'effectuer des transferts de matériel chromosomique à des fréquences convenables. Nous allons envisager les résultats acquis par les trois techniques principales à savoir : la transformation, la transduction et la conjugaison.

## II - TRANSFERT DE MATERIEL GENETIQUE CHEZ RHIZOBIUM

### 1) La transformation

#### a) principe

Il consiste à l'introduction d'acide désoxyribonucléique (ADN) chez une cellule bactérienne réceptrice capable d'exprimer les caractères génétiques apportés par la macromolécule issue d'une autre cellule. Ce mécanisme a été découvert en 1932 grâce à de l'ADN purifié de pneumocoques transmis à d'autres bactéries de la même espèce. Ce type de transfert nécessite plusieurs exigences de la part de deux protagonistes

\* La cellule réceptrice se trouve au moment du transfert dans un état particulier appelé "état de compétence"

\* L'acide nucléique doit présenter une pureté chimique suffisamment importante de façon à éviter les artéfacts, la stérilité est conseillée afin d'empêcher les transferts par d'autres moyens que la transformation.

\* Les marqueurs génétiques portés à la fois par l'acide nucléique et par le "chromosome" du receveur doivent être suffisamment variés et stables de façon à éliminer les phénomènes de réversion, principale cause d'erreur dans l'interprétation des résultats.

#### b) La transformation chez Rhizobium

Un grand nombre de travaux relatent le transfert de marqueurs génétiques par transformation chez Rhizobium. Les premiers datent de 1953 et concernent le passage de gènes relatifs à la spécificité d'hôte. De 1954 à 1965, les mêmes auteurs ont réalisé une série de travaux concernant des marqueurs d'auxotrophie et de résistance à la streptomycine ( 21, 22, 23, 24 ). Ces expérimentations sont aujourd'hui fortement controversées, en effet la souche réceptrice utilisée ne possède pas d'autres marqueurs que le caractère transféré et d'autre part le DNA n'est pas contrôlé au niveau de sa pureté et de sa stérilité. Ce genre de critiques peut également être adressé à d'autres travaux (25 , 26 ) réalisés avec des souches homologues qui ne diffèrent que par

le phénotype dont les auteurs testent le transfert.

Cependant en 1962, ELLIS et coll. mettent en évidence des phénomènes de transformation chez Rhizobium trifolii en utilisant du DNA stérile et une souche possédant des marqueurs génétiques stables dont les fréquences de mutation spontanée ont été déterminées (27). Enfin en 1972, RAINA et MODI ont transféré plusieurs marqueurs d'auxotrophie mais, là encore, aucune vérification n'a été effectuée (28). En résumé, l'importance qu'a prise la transformation dès le début des études génétiques chez Rhizobium semble justifiée même si les résultats doivent être examinés avec beaucoup de précaution. Très récemment l'isolement d'un facteur de compétence, capable d'induire la réceptivité des souches de Rhizobium vis-à-vis du DNA, indique que la transformation est effective chez ce genre bactérien (29).

## 2) La transduction

### a) principe

Un bactériophage tempéré peut provoquer la lyse des bactéries au contact desquelles il se trouve. Cependant, dans la population, un petit nombre de bactéries est capable de survivre en intégrant le génôme phagique dans leur chromosome : les bactéries sont devenues lysogènes. Par mutation induite ou spontanée le phage peut s'exprimer en emmenant des fragments de chromosome bactérien qu'ils transmettront à une autre bactérie lors d'une infection secondaire.

On distingue deux types de transfert par transduction :

- la transduction localisée, réalisée par des bactériophages capables de transférer qu'un seul petit fragment de chromosome.

- la transduction généralisée, plus fréquente, pour qui la probabilité de transfert est constante pour toute une série de gènes. Dans ce cas, une étude de proche en proche permet de relier les gènes et d'établir ainsi une carte génétique.



### b) la transduction chez Rhizobium

L'absence de système conjugatif connu a obligé les auteurs à s'intéresser très tôt à cette méthode de transfert. Une grande partie des travaux a été réalisée par KOWALSKI et coll. Dès 1966, ces auteurs ont transféré les gènes de résistance à la streptomycine chez R. meliloti (30, 31). Les premiers résultats concernant les gènes responsables de la biosynthèse d'acides aminés datent de 1971 (32, 33) et précédant de peu la mise en évidence de la transduction d'un gène contrôlant l'expression de la fixation de l'azote (34). Toutefois, la crédibilité des résultats peut être contestée par le manque de contrôle au cours des expérimentations. En effet, dans la plupart des cas les auteurs n'indiquent pas les fréquences de réversion des marqueurs considérés. Cependant, l'intérêt principal de ces études réside dans le fait qu'elles ont mis en évidence un système génétique original, qui, à l'heure actuelle pourrait rendre de grands services.

### 3) La conjugaison

#### a) principe

La conjugaison nécessite un contact étroit entre deux cellules bactériennes permettant l'injection de matériel génétique de la cellule donneuse à la cellule réceptrice. La distinction entre les deux partenaires est à la fois d'ordre génétique et morphologique. En effet, la présence de DNA extrachromosomique, codant pour la synthèse de structures externes spécifiques chez la cellule donatrice, permet le transfert orienté du chromosome vers la cellule réceptrice. Les transferts par conjugaison, découverts chez Escherichia coli avec le facteur sexuel F ont été étendus aux autres genres bactériens grâce aux plasmides conjuguatifs.

Avant de voir les différents mécanismes mis en jeu nous allons envisager les différents résultats obtenus chez Rhizobium.

b) La conjugaison chez Rhizobium

Les premiers résultats, obtenus par Higashi en 1967 (10), décrivent le transfert de l'infectivité vis-à-vis du tréfle de Rhizobium trifolii à Rhizobium phaseoli. L'inhibition de la fertilité de la souche donatrice lors du traitement à l'acridine orange suggère la présence des gènes concernés sur un facteur plasmidique transférable. Depuis, un certain nombre de travaux a démenti cette hypothèse. En effet, un certain nombre de souches infectives semblent dépourvues d'ADN extrachromosomique. De même, les souches possédant un plasmide ne perdent pas l'infectivité après l'élimination de l'élément génétique considéré. Il peut donc s'agir dans ce cas, soit d'une souche particulière, soit d'un plasmide conjugatif capable de mobiliser les gènes de l'infectivité à des fréquences importantes. L'avantage présenté par cette étude réside dans le fait que les souches utilisées possèdent des marqueurs chromosomiques stables dont les fréquences de réversion ont été déterminées. En 1969, BOSE et VENKATARAMAN ( 35) ont transféré les gènes de résistance à la streptomycine et à la pénicilline mais à l'inverse des précédentes, les souches n'ont pas suffisamment été contrôlées pour que l'on puisse conclure à des phénomènes de conjugaison.

L'isolement, vers 1968, de mutants pigmentés de Rhizobium lupini a permis à Heumann et Coll d'effectuer toute une série de travaux se rapportant à la conjugaison. Cette souche présente une caractéristique intéressante, en effet, l'observation microscopique montre que les cellules bactériennes se groupent lors de la conjugaison en des amas en forme d'étoiles ("star forming Rhizobium") qui permettent, selon les auteurs, le passage du chromosome ( 36 ). La carte génétique ainsi établie concerne des caractères d'auxotrophie et de pigmentation ( 37, 38 ). Toutefois, ces travaux sont aujourd'hui fortement controversés en effet, ils ont été accompagnés d'aucune mise en évidence d'un facteur sexuel, les marqueurs utilisés sont peu nombreux et enfin, aucun des mutants décrits n'est infectieux vis-à-vis du lupin. D'autre part, l'addition dans les milieux de sélection des recombinants de faibles

quantités d'extrait de levure parait pour le moins surprenante. Les résultats semblent d'autant plus difficiles à exploiter qu'aucune comparaison n'est possible avec d'autres travaux.

En effet, notre groupe de recherches s'intéresse depuis de nombreuses années à la conjugaison chez Rhizobium meliloti sans qu'aucune reproductibilité n'ait été observée. L'obtention, dans certaines conditions de fréquences de recombinaison importantes, lors de croisements effectués par simple mélange de souches auxotrophes est sujette au hasard (39, 40) et n'est toujours pas expliquée. De plus, l'analyse des résultats est compliquée par l'apparition sur les milieux de sélection de minuscules colonies translucides (microcolonies), phénomène correspondant vraisemblablement aux bactéries auxotrophes capables de se développer faiblement en absence de leur exigence. Cet artéfact n'a jamais pu être éliminé malgré tous les essais réalisés.

L'absence de système fonctionnel semble être due à l'inexistence de polarité dans les transferts, en effet, aucun plasmide conjugatif n'a été mis en évidence chez Rhizobium. Les travaux récents se sont donc orientés vers l'introduction de tels éléments génétiques de façon à pouvoir distinguer les cellules donatrices des cellules réceptrices. Les résultats obtenus chez d'autres genres bactériens ont incité les auteurs à utiliser les facteurs de résistance du groupe P isolés de Pseudomonas aeruginosa, qui, de plus, est très proche de Rhizobium d'un point de vue phyllogénétique.

Les premiers transferts de facteur R datent de 1974 et précèdent de peu leur utilisation en conjugaison. Les résultats obtenus sont prometteurs et ont permis l'établissement de plusieurs ébauches de cartes génétiques qui, dans l'ensemble, présentent de grandes similitudes. Chez Rhizobium meliloti, MEADE et SIGNER en 1978 (41) ont pu transférer, grâce au plasmide RP 4, des gènes responsables de la synthèse d'acides aminés ou de bases nucléiques avec des fréquences voisines de

$10^{-6}$ . Par contre, ce même plasmide est décrit comme inefficace chez Rhizobium leguminosarum, BERINGER lui ayant préféré le facteur R 6845 ( 42 ) dérivé du plasmide R 68 considéré comme incapable de mobiliser le chromosome. L'utilisation du RP 4, par HEUMANN chez Rhizobium lupini est un inhibiteur de la fertilité ( 43 ) quand le plasmide est introduit dans la souche donatrice. Ce système génétique pourrait s'expliquer par la présence chez la souche mère d'un plasmide codant pour la synthèse de pili qui conduiraient à la formation d'amas en forme d'étoile ( 44 ). Ce facteur sexuel serait exclu lors de la pénétration du plasmide RP4 qui lui, serait incapable de promouvoir la mobilisation du chromosome chez Rhizobium lupini. Toutefois, l'interprétation des auteurs est fondamentalement différente, en effet, l'élimination du facteur RP 4 coïncide avec le retour de la fertilité ( 45 ), l'inhibition est donc réversible. Plutôt que de contredire les expériences de conjugaison effectuées avec les facteurs de résistance, ces conclusions montrent l'importance qu'ont ces plasmides pour les transferts génétiques chez Rhizobium. Toutefois, à l'inverse d'Escherichia coli aucune généralisation n'est possible, chaque espèce ayant des comportements différents suivant l'élément extrachromosomique. Par contre, les mécanismes impliqués dans la mobilisation du chromosome semblent être identiques à ceux décrits pour le facteur F, en effet, JOHNSTON a mis en évidence chez Rhizobium meliloti des facteurs R primes ( 46 ) ce qui laisse supposer une intégration transitoire du plasmide dans le chromosome bactérien.

En conclusion, si l'ensemble de ces travaux a l'avantage d'avoir fait surgir un système de transfert original, il reste cependant un certain nombre de points obscurs. En particulier, dans tous les cas les fréquences de recombinaison restent très faibles, ce qui constitue un obstacle à l'étude des gènes responsables de la symbiose. Et d'autre part, le manque de reproductibilité rend difficile et fastidieux les interprétations.

Ce travail ayant pour but d'entrevoir les mécanismes de la conjugaison, grâce au plasmide RP 4, chez Rhizobium meliloti, nous avons envisagé l'ensemble des connaissances actuelles sur les transferts de matériel génétique par l'intermédiaire des plasmides.

### III - LES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA CONJUGAISON

L'importance qu'ont pris les études sur les plasmides est due pour une grande partie aux découvertes anciennes du facteur sexuel F chez Escherichia coli.

#### 1) Introduction

La polarité des transferts chromosomiques chez Escherichia coli est due à l'existence chez la cellule mâle, et chez elle, seule, du facteur sexuel F. Les cellules donatrices sont ainsi nommées  $F^+$  et les cellules réceptrices  $F^-$ . L'intégration du facteur F dans le chromosome des bactéries  $F^+$  aboutit à la formation des souches Hfr (Haute Fréquence de Recombinaison) qui transfèrent de ce fait leur chromosome de façon linéaire et de manière orientée. Dans certains cas, l'épissome peut s'exciser et redonner naissance soit aux bactéries  $F^+$  soit à un nouveau type sexuel les cellules  $F'$  (F primes) si le facteur sexuel a emporté lors de l'excision un fragment du chromosome. Les différents mécanismes sont résumés sur la figure 1

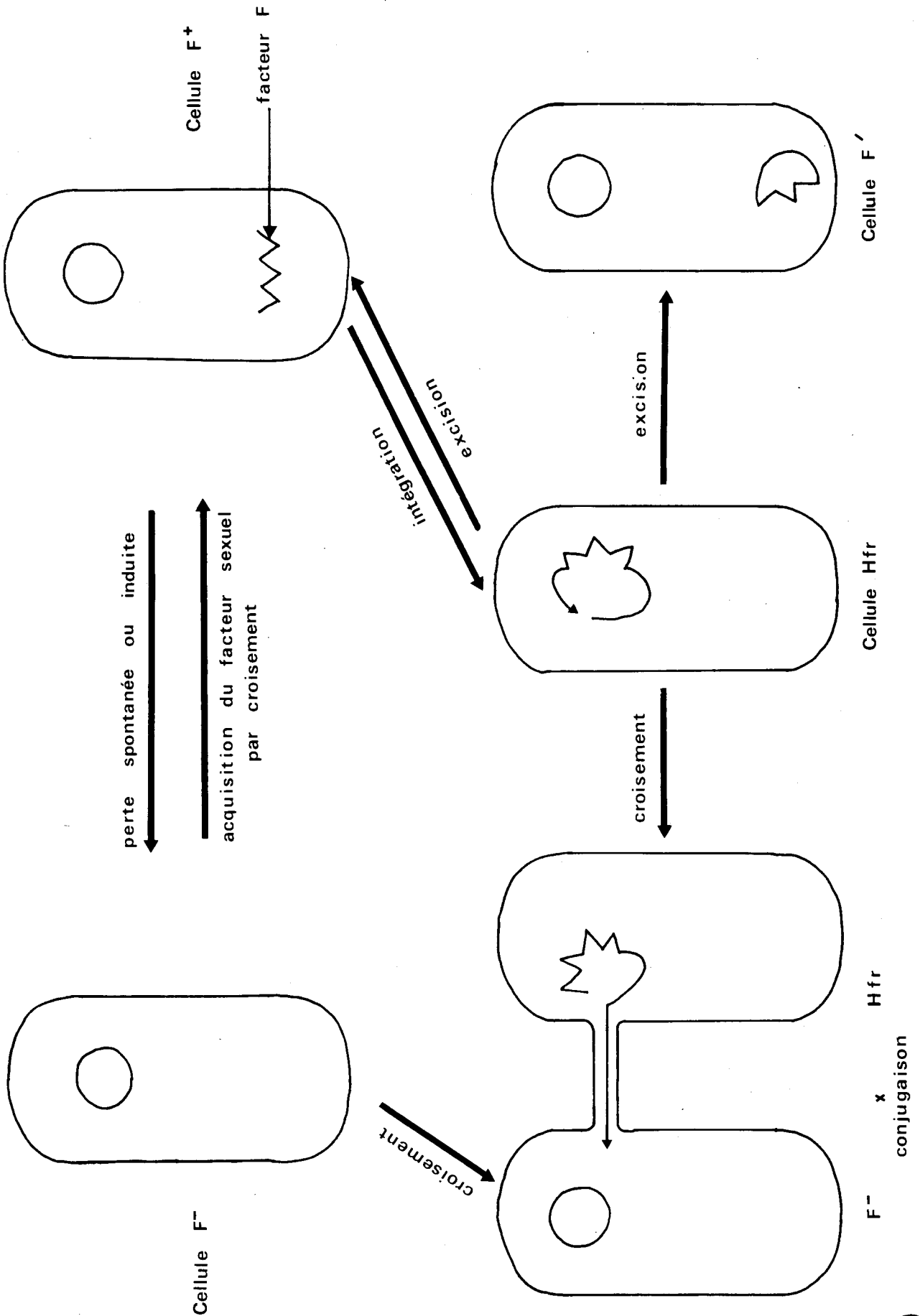


Figure 1: Les types sexuels et la conjugaison chez *E. coli* d'après J. SCAIFE (47)



Le transfert de gènes chromosomiques chez E. coli peut être obtenu de trois manières différentes résumées dans le tableau suivant

Croisement	Transfert facteur F	Transfert chromosome
$F^+ \times F^-$	haute fréquence	basse fréquence pour caractère au hasard
Hfr $\times F^-$	basse fréquence	haute fréquence transfert orienté
$F' \times F^-$	haute fréquence	haute fréquence pour caractères particuliers

La conjugaison fait donc intervenir un élément génétique extra-chromosomique qui sert, en quelque sorte, de vecteur au matériel chromosomique. Ces découvertes ont, dès lors, développé de façon considérable les recherches sur les plasmides dont les propriétés sont actuellement bien connues.

## 2) Les plasmides

### a) Définition

Les plasmides sont définis comme des molécules d'acide désoxyribonucléique extrachromosomique dotées de leur propre système de réplication. Cette définition est à distinguer de celle de l'épisome qui est capable de se répliquer soit sous forme libre, soit sous forme intégrée. Le type même de l'épisome est le facteur sexuel F, la réplication sous forme Hfr étant dirigée par le chromosome.

Parmi les plasmides, on distingue les plasmides conjugatifs capables de promouvoir le transfert de DNA des non conjugatifs ne possédant pas cette propriété.

Les facteurs de résistance (facteurs R) sont des plasmides conjugatifs ou non codant pour la résistance à diverses agressions chimiques (antibiotiques, substances toxiques minérales ou organiques, etc...).

Enfin, la mobilisation est la propriété qu'ont les plasmides d'induire le transfert de DNA auquel il n'est pas lié de façon covalente. Ces définitions sont conformes à la nomenclature récemment proposée par NOVICK et coll. (48).

### b) Propriétés générales

La taille des plasmides varie de façon générale de 1/10 au 1/100 de celle du chromosome bactérien, la composition globale en bases nucléiques étant sensiblement identique (% GC voisins). La différence essentielle par rapport au chromosome est la conformation que prennent les plasmides, en effet, ils prennent habituellement une forme superhélicoïdale double brins alors que le chromosome lors de son extraction est sous forme linéaire (49). Ces différences ont permis la mise au point de méthodes de séparation en gradient de densité ou de vitesse. La forme circulaire fermée superhélicoïdale présente en gradient de saccharose une vitesse de sédimentation supérieure à celle du chromosome (50). Par contre, l'abaissement de densité dû à la fixation de bromure d'éthidium en gradient de chlorure de Césium est plus faible dans le cas du plasmide du fait de l'encombrement stérique apporté par la double hélice. Ces techniques ont permis la mise en évidence de plasmides chez de nombreux genres bactériens, en particulier chez Rhizobium (51, 52, 53) où ces études ont pris une importance particulière. En effet, la présence de plasmides confère à la bactérie des propriétés originales non indispensables à la multiplication cellulaire (résistance aux antibiotiques, induction de tumeurs, production de bactériocines, etc...). D'autre part, dans le cas des plasmides conjugatifs, qui codent très souvent pour la synthèse de structures externes spécifiques, la modification de morphologie permet la



distinction cellule donatrice, cellule réceptrice. C'est le cas du facteur F qui induit la présence de F pili indispensables à la conjugaison chez Escherichia coli.

La présence de facteurs R chez certaines bactéries pose actuellement un problème médical important en plus de l'intérêt fondamental apporté par leur découverte.

### 3) Les facteurs R

#### a) Classification

Avant 1971, les facteurs R étaient divisés en deux classes appelées  $fi^+$  et  $fi^-$  selon leur effet sur la fertilité des souches  $F^+$  d'E. coli (54). Les facteurs  $fi^+$  (fertility inhibition  $^+$ ) inhibent la conjugaison effectuée par le facteur F et codent pour des pili sexuels analogues aux F pili à l'inverse des facteurs  $fi^-$ . Indépendamment, WATANABE et coll. ont montré que deux plasmides de la même classe ne peuvent coexister dans une même cellule (55). Ce phénomène d'incompatibilité est la base de la classification proposée par DATTA et HEDGES (56) qui montrent l'existence d'au moins quatre groupes nommés I, N, W, P correspondant à l'ancienne classe des  $fi^-$ . Cette classification a depuis été étendue, en particulier par CHABBERT (57) qui a subdivisé les  $fi^-$  en neuf groupes différents.

Le facteur RP 4, isolé de Pseudomonas aeruginosa, est classé dans le groupe P 1, subdivision du groupe P.

#### b) Transfert

Le transfert des facteurs R, analogue à celui du facteur F nécessite un contact étroit entre les deux partenaires qui ont reçu la dénomination de cellules  $R^+$  et  $R^-$ . La présence d'un facteur R détermine la synthèse de pili à la surface externe de la cellule. La mise en évidence des pili a été facilitée par la découverte de bactériophages spécifiques qui ont la propriété de s'adsorber sur ces structures, l'ensemble devenant visible en microscopie électronique (58). Le rôle des

pili reste obscur, en effet, on ne sait pas s'ils servent de canal pour le passage du DNA ou s'ils jouent un simple rôle de fixation lors de la conjugaison.

En 1973, OLSEN et SHIPLEY ont transféré le facteur R 1822 (59) de P. aeruginosa à des Entérobactéries et à des bactéries photosynthétiques. Ce plasmide du groupe P confère les résistances à la tétracycline, la kanamycine, la néomycine et la carbénicilline et est transmis à des fréquences variables suivant la souche réceptrice. Toutefois, ces expériences montrent l'importance des plasmides de ce groupe, de par leur large spécificité d'hôte. L'observation microscopique des bactéries porteuses du facteur R 1822 montre que les bactériophages PRR 1 s'adsorbent à la base des pili alors que ceux spécifiques du facteur RP 1 (bactériophages Pf<sub>3</sub>, PR<sub>3</sub> et PR<sub>4</sub>) se fixent sur toute la surface de la bactérie (60). La distinction entre ces deux plasmides du groupe P portant les mêmes caractères de résistance se fait donc au moyen de bactériophages grâce à des structures externes spécifiques différentes.

La mise en évidence du plasmide RP<sub>4</sub> en 1972 (61) a créé quelques confusions de nomenclature. En effet, les caractères de résistance du RP<sub>4</sub> sont identiques à ceux du RP<sub>1</sub> du R 1822 et du R 68, ce dernier étant souvent assimilé au RP<sub>4</sub>. La spécificité d'hôte du RP<sub>4</sub> est également très large ce qui lui donne des qualités très importantes pour les études génétiques. Sa stabilité a été démontrée chez E. Coli, Proteus, Acinetobacter (62) Neisseria, Rhodopseudomonas (63). Les mécanismes de son transfert restent très obscurs, toutefois, ils semblent faire intervenir les pili, quoique, il a été décrit comme se transférant très mal en milieu liquide (64). Les temps de croisement utilisés sont brefs, l'expression des gènes de résistance semble de même très rapide. Des études récentes dues à BARTH et coll. (65) ont tenté d'analyser le système de transfert. L'isolement de 19 mutants, incapables de promouvoir le transfert du plasmide et leur analyse ont permis d'envisager l'existence de plusieurs gènes impliqués dans la transmission. Le gène tra (transfert ability) semble situé sur deux régions distinctes séparées par le gène km (résis-

tance à la kanamycine). Les gènes sex (surface exclusion) semblent distincts des gènes tra et interviennent à la fois dans le transfert et les phénomènes d'incompatibilité. Ces travaux réalisés grâce à l'insertion du transposon 7 (Tn :: 7) montrent que la conjugaison fait intervenir des régulations génétiques importantes. L'obtention de mutants nouveaux et l'utilisation des enzymes de restriction ont permis l'établissement d'une carte génétique du RP<sub>4</sub> (66) qui fait intervenir les différents gènes responsables des propriétés de transfert.

En résumé, le transfert des facteurs de résistance implique la présence sur l'élément génétique considéré de gènes spécifiques lui conférant :

- la possibilité de synthétiser des pili
- les propriétés d'incompatibilité
- la synthèse du produit des gènes tra plus directement impliqués dans le transfert

### c) Mobilisation chromosomique

#### α ) études du facteur F d'E. coli

Pendant très longtemps, les auteurs ont pensé que les quelques recombinants formés lors de croisements F<sup>+</sup> x F<sup>-</sup> étaient dus à la présence dans la population F<sup>+</sup> de mutants Hfr apparus spontanément (67). En 1964, CURTISS montre que chez certaines souches F<sup>+</sup> l'intégration du facteur sexuel intervient à des fréquences non détectables ou provoque la mort des bactéries (68). Ceci permet la classification des F<sup>+</sup> en deux groupes.

F<sup>+</sup> type I qui donne naissance à des Hfr stables

F<sup>+</sup> type II chez qui l'intégration est absente ou létale (69).

Les fréquences de recombinaison obtenues à partir des deux types de souches sont parfaitement comparables. Ceci suggère donc que le transfert de gènes chromosomiques ne nécessite pas obligatoirement l'intégration stable du facteur sexuel (70). Il a été par ailleurs

démonstré que 80 à 85 % des recombinants formés lors d'un croisement  $F^+ \times F^-$  doivent être le résultat d'une intégration instable et /ou létale de F ou d'un mécanisme ne faisant pas intervenir l'intégration .

Enfin, le fait que les deux types de  $F^+$  transfèrent l'épisome de manière identique et que le chromosome est transmis de façon linéaire implique que les mécanismes font intervenir des cassures au hasard lors de la réplication. Le chromosome linéaire ainsi formé peut être alors transmis (71) indépendamment du facteur F.

L'utilisation de facteurs de résistance pour les études de conjugaison chez E. coli montre que les fréquences de recombinaison sont proportionnellement plus faibles que celles décrites avec le facteur F (72). Toutefois, l'isolement de facteurs R dérèprimés augmente considérablement le nombre de recombinants (73). Les mécanismes impliqués semblent varier en fonction du plasmide mobilisateur utilisé, en effet, certains donnent des fréquences identiques quelque soit la région du chromosome, d'autres transfèrent selon une séquence déterminée.

Toutes ces données font que certains auteurs émettent l'hypothèse que les facteurs R se comportent de façon identique au facteur F et peuvent dans certains cas s'intégrer de façon transitoire au chromosome (46). Ces intégrations s'effectueraient au niveau de régions constituées de séquences homologues selon le modèle décrit par CAMPBELL, schéma qui fait intervenir un échange de matériel génétique entre le chromosome et le plasmide (74). Enfin, le fait que des souches  $F^+$  rec A donnent naissance à des recombinants fait penser que l'intégration transitoire provoque la linéarisation du chromosome, condition qui semble indispensable à son transfert.

$\beta$  ) transfert de gènes chromosomiques chez d'autres genres bactériens.

Les études génétiques effectuées chez les bactéries autres que les entérobactéries ont presque toujours fait intervenir les facteurs de résistance, et plus particulièrement, ceux isolés de Pseudomonas aeruginosa. Les transferts de gènes chromosomiques chez cette espèce ont été décrits dès 1971 (75). L'utilisation de plasmides différents

montrent que les fréquences de recombinaison varient pour un même gène. Ceci indique que les régulations génétiques sont différentes et spécifiques ou que la mobilisation varie avec le plasmide. L'extension à d'autres espèces est rapidement intervenue.

En 1974, l'introduction du facteur RP1 chez E. coli a permis le transfert des gènes his (histidine) chez Salmonella typhimurium et Pseudomonas aeruginosa. (76). Les auteurs interprètent ces résultats par l'intégration de l'opéron histidine dans le plasmide, en effet, les fréquences de transfert plasmidique et chromosomique sont identiques. La même année, DUNICAN et TIERNEY ont transmis, à l'aide du plasmide dérégulé R1drd<sub>19</sub> les gènes de la fixation de l'azote de Rhizobium trifolii à Klebsiella aerogenes en irradiant aux U.V. la souche donatrice. Aucune explication n'a été apportée sur l'importance de l'irradiation. (77). La présence du RP<sub>4</sub> chez Agrobacterium tumefaciens est capable de promouvoir le passage des gènes responsables de la virulence (78). Enfin, TOWNER et VIVIAN (79) ont établi une ébauche de carte génétique chez Acinetobacter calcoaceticus grâce au RP<sub>4</sub>, leurs études ultérieures ont montré que le chromosome peut être transmis à partir de deux origines distinctes. Ceci suggère des régions d'interactions plasmide-chromosome variées qui modifient les propriétés mobilisatrices des plasmides. L'utilisation de plasmides différents modifie également les résultats, la spécificité est donc relativement stricte.

Les mêmes phénomènes sont rencontrés chez Rhizobium où le RP<sub>4</sub> est non mobilisateur chez R. leguminosarum (80) alors qu'il possède cette propriété chez R. meliloti (81). L'addition de séquences spécifiques peut modifier sensiblement les propriétés du plasmide en effet, le mutant R 6845 du R<sub>68</sub> permet le transfert de gènes chromosomiques (82) chez R. leguminosarum. Les fréquences de recombinaison observées sont constamment voisines de 10<sup>-6</sup>, ceci laisse

penser que le transfert est du type  $F^+ \times F^-$  et fait intervenir des interactions plasmide-chromosome au hasard. La linéarisation du chromosome n'a pas été mise en évidence dans ce type de conjugaison, par contre la sélection de R primes chez P. aeruginosa (83) et R. leguminosarum suggère une intégration possible du facteur R. L'absence de Hfr ne permet pas d'envisager une intégration stable à des fréquences convenables, ce qui confirme l'obtention de fréquences identiques quelque soit le gène considéré.

En conclusion, les transferts génétiques font dans tous les cas intervenir les plasmides dont la propriété essentielle est de pouvoir différencier des types sexuels chez les bactéries. Le transfert est dès lors orienté d'une cellule donatrice (plasmide<sup>+</sup>) à une cellule réceptrice (plasmide<sup>-</sup>). La synthèse par la cellule donatrice de structures externes spécifiques tels que les pili permet la formation de couples stables et le passage de matériel génétique. Dans certains cas, la structure du plasmide permet la mobilisation du chromosome bactérien et la recombinaison. L'intégration de l'élément extrachromosomique ne semble pas obligatoire, même si elle intervient de façon transitoire. Par contre, la linéarisation du chromosome serait une condition nécessaire à la conjugaison.

#### BUT DU TRAVAIL

-----

Après avoir testé plusieurs facteurs de résistance, notre groupe de recherches a choisi d'utiliser le plasmide  $RP_4$  qui s'exprime et se transmet parfaitement chez Rhizobium meliloti. L'obtention de faibles fréquences de recombinaison pour les gènes chromosomiques rend difficile l'étude des phénomènes génétiques liés aux fonctions symbiotiques. D'autre part, le hasard fait que lors d'expériences relativement anciennes, la conjugaison semble pouvoir intervenir en l'absence de plasmides surajoutés.

Le but de ce travail a donc été :

- 1) l'étude des conditions optimales en vue de l'amélioration du système conjugatif.
- 2) l'étude de l'impact du transfert plasmidique sur le passage des gènes chromosomiques.

Très rapidement, un certain nombre de constatations fondamentales nous ont permis d'orienter notre travail vers une étude génétique des mécanismes de transfert plasmidique qui semble faire intervenir des régulations complexes.

Enfin, la comparaison entre l'apparition des transconjuguants et des recombinants semble indiquer que le rôle du  $RP_4$  dans les phénomènes de conjugaison est relativement limité.

# Matériel et Méthodes



MATERIEL ET METHODES

I-SOUCHES BACTERIENNES

Nous avons utilisé des souches de Rhizobium meliloti toutes capables de noduler la luzerne (Medicago sativa) et deux souches d'Escherichia coli. Les origines et les phénotypes de ces bactéries sont résumés dans le tableau suivant.

nom de la souche	Origine	Phénotype
<u>Rhizobium meliloti</u>		
M <sub>9</sub> S	Isolée au laboratoire	Sauvage
M <sub>11</sub> S	" " "	"
1 - 5	C. BONNIER (Gembloux Belgique).	"
2011	J. DENARIE (Versailles)	"
2011 Str <sub>3</sub>	" "	Str <sup>R</sup>
2011 m <sub>3</sub>	Isolée au laboratoire	Str <sup>R</sup> , Try
2011 m <sub>3</sub> rif	" " "	Str <sup>R</sup> , Rif, Try
2011 m <sub>9</sub> b	" " "	Str <sup>R</sup> , Pyr, Arg
M <sub>5</sub> N <sub>1</sub>	" " "	M <sub>9</sub> S non muqueux
A <sub>1</sub>	" " "	ILv, Try
<u>Escherichia coli</u>		
J 53 (RP <sub>4</sub> )	M. VAN MONTAGU (Gent- Belgique)	Met, Pro, Ap <sup>R</sup> , Cb <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>
W3350		Sauvage

Phénotypes : \* Str<sup>R</sup>, Rif<sup>R</sup>, Ap<sup>R</sup>, Cb<sup>R</sup>, Tc<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup> = résistances aux antibiotiques, Streptomycine, Ampicilline, Carbénicilline, Tétracycline, Kanamycine

\* Try, Pyr, Arg, Ilv, Met, Pro = exigences en tryptophane, bases pyrimidiques, Arginine, Isoleucine et valine, Méthionine, Proline.

D'autre part, les transconjuguants des souches de Rhizobium meliloti ont été sélectionnés après conjugaison avec la souche J<sub>53</sub>(RP<sub>4</sub>).

Ils possèdent leurs phénotypes propres en complément de ceux apportés par le plasmide. Leur isolement a été effectué au cours de ce travail.

## II - MILIEUX DE CULTURE

### 1) Milieux complets

#### a) Milieu RC

Il est utilisé pour la préculture et la conservation des souches de Rhizobium meliloti et présente la composition suivante :

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Mg SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
Extrait de levure (Difco)	1 g
Eau distillée qsp	1 litre.

Il est ajusté à pH compris entre 7,2 et 7,5, sa stérilisation s'opère à 120 °C pendant 20 mn. La source de carbone (glucose) est additionnée à la concentration finale de 1p. cent sous forme d'une solution stérile (105 °C, 30 mn).

Pour la conservation des souches, on additionne le glycérol (2ml) stérile (105 °C, 30 mn) à 8ml d'une culture en phase exponentielle de croissance, l'ensemble est maintenu, après homogénéisation, à - 20 °C. Le milieu gélosé correspondant (RCG) est obtenu par addition de 12 g/litre

de Bacto Agar (Difco), sa stérilisation s'effectue dans les mêmes conditions que le milieu liquide. Il est utilisé pour les numérations des souches et la sélection des transconjuguants après addition des antibiotiques indispensables.

b) Milieu TY

Sa composition est définie comme suit :

CaCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	1,3 g
Extrait de levure (Difco)	3 g
Tryptone (Difco)	5 g
Eau distillée qsp	1 litre

Le pH est ajusté entre des valeurs de 7,2 à 7,5, sa stérilisation s'effectue pendant 20 mn à 120°C.

Ce milieu est requis pour les précultures des souches en vue de la réalisation de croisements qui sont effectués sur le milieu solide correspondant (12 g/l de Bacto Agar Difco).

c) Milieu NB

Extrait de viande (LIEBIG)	1 g	
Extrait de levure	2 g	
Peptone	5 g	
NaCl	5 g	
Eau distillée qsp	1 litre	pH : 7,4

Son utilisation se limite aux croisements Escherichia coli - Rhizobium meliloti réalisés en milieu liquide.

## 2) Milieu minimum

La base du milieu à la composition suivante :

$K_2HPO_4$                     0,5 g

$NH_4NO_3$                     0,5 g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$             0,2 g

Eau distillée qsp        1 litre.

Le pH est ajusté entre 7,2 et 7,5 avant l'autoclavage (120°C, 20 mn).

Pour les précultures des souches et la sélection des recombinants, on incorpore le glucose à la concentration finale de 1p. cent et les vitamines H et B<sub>1</sub> aux concentrations respectives de 0,5 µg/ml et 0,01 µg/ml.

Le milieu est éventuellement gélosé à l'aide de 15 g/litre de Bacto Agar (Difco).

La solution de base est utilisée pour les dilutions.

## 3) Gélose molle

Cette gélose contient 7,5 g de Bacto Agar (Difco) par litre d'eau bidistillée et est répartie à raison d'environ 4 ml par tube. Sa stérilisation s'effectue à 120°C pendant 20mn.

Elle est utilisée pour la réalisation des numérations.

## III - SOLUTIONS D'ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques, si nécessaire, sont préparés et additionnés aux concentrations suivantes.

La dihydrostreptomycine SPECIA est additionnée à la concentration de 400 µg/ml (0,16 ml d'une solution stérile titrant 250 mg/ml).

La rifampicine est ajoutée à raison de 0,5 ml d'une solution à 20 mg/ml par flacon de 100 ml de milieu (concentration finale : 100 µg/ml).

La sélection des transconjuguants se fait sur milieux contenant 10 µg/ml de Tétracycline (Diamant).

La carbénicilline, l'ampicilline et la kanamycine ont été utilisés sous forme de disques (Institut Pasteur Production) imprégnés de quantités déterminées de chacun des antibiotiques.

#### IV - SELECTION DE MUTANTS

Deux types de mutants ont été utilisés d'une part des résistants aux antibiotiques, d'autre part des mutants auxotrophes.

##### 1) Sélection de résistants aux antibiotiques

Ce chapitre concerne essentiellement la sélection de souches résistantes à la rifampicine en effet, le caractère Str<sup>R</sup> est porté par la souche 2011 Str<sub>3</sub> point de départ de tous les auxotrophes décrits dans ce travail.

Les bactéries sont cultivées en milieu complet RC jusqu'en fin de phase exponentielle puis 0,1 ml ou 1 ml de cette suspension est étalé sur des boîtes de Petri contenant du milieu RC gélosé amené à différentes concentrations en antibiotique. Les clones apparus subissent alors une purification par isolements successifs sur milieu RCG puis vérifiés pour leur phénotype.

##### 2) Sélection de mutants auxotrophes

L'essentiel de la collection de mutants du laboratoire a été réalisé par mutagénèse à la nitrosoguanidine, la technique est la suivante. La souche est précultivée dans le milieu RC glucosé, en phase exponentielle, cette préculture sert à inoculer 15 ml du même milieu

de façon à obtenir une densité optique de 0,05. A une densité optique de 0,8, on centrifuge 10,6 ml de la culture (le culot est repris dans le même volume de tampon Tris-maléique (M pH = 6,65). A ce niveau est effectuée une première numération. Les 10 ml de suspension bactérienne restant sont additionnés à 10 ml d'une solution de nitrosoguanidine à 1,5 mg/ml. L'ensemble est placé 30 mn sous agitation à 30 °C puis centrifugé. Le culot est repris dans 10 ml de milieu R, centrifugé puis remis en suspension dans 10 ml de R glc. H. B<sub>1</sub>. Dès lors, la numération qui s'ensuit permet la détermination du pourcentage de survivants. La suspension est alors mise en agitation 6 heures à 30 °C avant d'opérer à la contre-sélection. Celle-ci s'effectue pendant 36 heures en présence de pénicilline (environ 3 000 UI/ml) de saccharose (0,2 g/ml) et de Mg SO<sub>4</sub> (0,01 mM) sous agitation à 30 °C. L'ensemble est ensuite centrifugé, le culot est repris dans 8 ml de milieu R puis numéré. Les résultats de la numération permettent d'évaluer la zone dans laquelle doivent être effectués les étalements sur milieu complet RCG en vue de la sélection de bactéries auxotrophes opérée par la méthode des répliques de LEDERBERG (84). Les présumés mutants sont ensuite cultivés dans le milieu RC, la suspension bactérienne obtenue est ensuite centrifugée et lavée dans le milieu R. La détermination des phénotypes s'effectue en étalant cette suspension sur différents milieux minima complétés par les différentes exigences possibles (Acides aminés, Bases nucléiques, Vitamines).

Il faut noter que de sensibles variations peuvent affecter cette méthode en fonction des nécessités. En particulier, la contre-sélection à la pénicilline peut être plus ou moins longue, le temps de 36 h étant donné à titre indicatif. L'enrichissement en mutants auxotrophes est relativement faible dans ces conditions, le remplacement de la pénicilline par la carbénicilline peut apporter de meilleurs résultats.

V - TECHNIQUES DE CROISEMENT

1) Milieu liquide

a) Croisement E. coli - R. meliloti

La souche d'E. coli J<sub>53</sub> (RP<sub>4</sub>) est précultivée dans le milieu NB, celle de R. meliloti dans TY jusqu'à l'obtention de suspensions bactériennes titrant environ  $1 \times 10^9$  cellules viables/ml.

On effectue ensuite les mélanges suivants :

Témoin Rhizobium : 1 ml NB  
1 ml TY  
2 ml Rhizobium

Témoin E. coli : 1 ml E. coli  
3 ml TY

Croisement : 1 ml E. coli  
1 ml TY  
2 ml R. meliloti

Ces trois suspensions cellulaires sont incubées en bain -marie statique à 34 °C durant 3 heures. Elles sont ensuite diluées et chaque souche est numérotée sur les milieux de sélection convenables. Chaque témoin est étalé sur le milieu de sélection des transconjuguants afin de déterminer les fréquences d'apparition de mutants spontanés. Les transconjuguants obtenus sont purifiés par isolement sur boîte de Pétri puis repris en vue de leur conservation à - 20°C en milieu glycérolé. Leurs phénotypes sont à chaque fois vérifiés et comparés à ceux de la souche mère correspondante.

b) croisements R. meliloti - R. meliloti

Le principe est le même que pour les croisements E. coli R. meliloti, toutefois les cultures des souches s'effectuent en milieu TY fructosé à 1 p. cent. Les croisements peuvent s'effectuer, soit en bain-marie statique, soit sous faible agitation (100 rpm) de façon à permettre une meilleure oxygénation. Les temps de contact varient en fonction des nécessités de la manipulation.

2) milieu gélosé

Les souches de R. meliloti sont précultivées jusqu'en phase exponentielle dans le milieu TY fructosé puis cultivées dans le même milieu pendant 16 h pour la souche donatrice et 24 h pour la souche réceptrice. Dans ces conditions, la première suspension est en phase exponentielle et la seconde en début de phase stationnaire (conditions décrites comme optimales pour ce type de croisement).

On effectue alors les mélanges suivants :

Témoin souche donatrice : 1 ml suspension  
1 ml TY Fru

Témoin souche réceptrice : 1 ml suspension  
1 ml TY Fru

Croisement : 1 ml souche donatrice  
1 ml souche réceptrice.

On répartit 1 ml de chacun de ces mélanges à la surface d'un milieu TY fructosé gélosé, l'incubation s'effectue dans une étuve à 34 °C. A la fin du croisement, les boîtes de Pétri sont noyées par 5 ml de milieu minimum R, grattées à l'étableur de verre et rincées à nouveau par 5 ml de R. Les 10 ml de suspension sont centrifugés, le culot est repris par un minimum de milieu R (en général 2 ml).



Dans le cas de croisements réalisés en vue de la sélection de recombinants, on procède à un lavage supplémentaire par le milieu minimum avant d'effectuer les dilutions. Chaque partenaire est alors numéré sur les milieux convenables, les milieux de sélection des transconjugants et des recombinants sont utilisés à la fois pour les témoins et les croisements.

### 3) Croisements sur filtres

Le début du protocole expérimental est identique à celui décrit dans le chapitre précédent. Après avoir effectué les mélanges, on filtre sur membrane (SARTORIUS :  $\varnothing$  35 mm, porosité 0,2  $\mu$ m) stérile déposée sur appareil de filtration (SARTORIUS réf. : SM 113 06,25 mm  $\varnothing$ ) le volume du mélange est fixé à 1 ml de façon à éviter le colmatage possible dans le cas de l'utilisation de suspensions très denses. Le filtre est ensuite déposé stérilement à la surface d'un milieu TY fructosé gélosé. Après incubation à 34 °C, la membrane est reprise, placée dans un tube à centrifugation contenant 5 ml de milieu R, puis homogénéisée au vortex. Après centrifugation, le culot est homogénéisé dans un minimum de milieu R puis dilué et étalé sur les différents milieux de sélection. Comme dans le cas de croisements sur milieu gélosé, la sélection des recombinants requiert un lavage supplémentaire en milieu minimum.

### 4) Techniques communes

Dans tous les cas les numérations s'effectuent par incorporation de 0,1 ml de la dilution appropriée dans 4 ml de gélose molle maintenue liquide à environ 50 - 55 °C. Le mélange est déposé et réparti à la surface du milieu gélosé adéquat.

Les lectures sont faites après 48 h d'incubation à 30 °C dans le cas des transconjugants et des souches mères, l'apparition des recombinants n'intervient qu'après 5 à 6 jours.

Il est convenu d'utiliser le vocabulaire suivant :

Fréquence de transfert par rapport

$$\text{au } R^+ = \Delta/R^+ = \frac{\text{Nombre de transconjuguants/ml}}{\text{Nombre de donneurs/ml}}$$

Fréquence de transfert par rapport

$$\text{au } R^- = \Delta/R^- = \frac{\text{Nombre de transconjuguants/ml}}{\text{Nombre de receveurs/ml}}$$

Cette terminologie est transposée au recombinant sous la forme

$$\Delta_{\text{rec}}/R^+ \text{ et } \Delta_{\text{rec}}/R^- .$$

Les fréquences de réversion et d'apparition de mutants spontanés sont calculées suivant le même principe.

# Résultats et Discussion

## PREMIERE PARTIE

Le transfert de gènes chromosomiques effectué par l'intermédiaire d'un plasmide conjugatif est décrit comme se réalisant en deux étapes fondamentales :

-La mobilisation du chromosome par le plasmide qui requiert des séquences homologues sur les deux éléments génétiques.

-Le transfert plasmidique proprement dit qui, dans le cas d'une mobilisation effective, s'accompagne du transfert de gènes chromosomiques.

Si l'on considère que la mobilisation s'effectue avec une fréquence constante, propriété due aux caractéristiques mêmes du facteur de résistance et de sa cellule hôte, l'étape limitante de la conjugaison est alors le transfert plasmidique.

Dans le cas du facteur F d'*Escherichia coli*, il a été démontré que les fréquences optimales étaient obtenues dans des conditions de culture et de contact déterminées. La première partie de ce travail consiste en l'étude du transfert du plasmide RP<sub>4</sub> en fonction de différents paramètres en rapport avec les propriétés génétiques et physiologiques du plasmide et de sa cellule hôte.

### I - MISE EN EVIDENCE DU TRANSFERT DU RP<sub>4</sub> CHEZ RHIZOBIUM

#### MELILOTI.

Le plasmide RP<sub>4</sub> porte les gènes de résistance à la tétracycline (Tc), la kanamycine (Km), la carbénicilline (Cb) et l'ampicilline (Ap). Si le transfert concerne l'ensemble du plasmide, la cellule réceptrice ou transconjuguante doit acquérir la totalité des phénotypes de résis-

tance, la sélection peut donc s'effectuer indifféremment avec l'un ou l'autre des antibiotiques. Pour des raisons pratiques, nous avons réalisé une collection de souches résistantes à la tétracycline en utilisant la souche d'E. coli J<sub>53</sub> (RP<sub>4</sub>) comme bactérie donatrice. L'obtention d'une collection importante de R. meliloti porteurs du facteur de résistance doit permettre l'étude par conjugaison d'un grand nombre de couples cellule donatrice-cellule réceptrice, condition nécessaire à la réalisation de transferts de matériel chromosomique.

1) Obtention par conjugaison de souches résistantes à la tétracycline.

Les essais effectués en milieu liquide concernent quelques souches de la collection du laboratoire. Les résultats exprimés dans le tableau 3 montrent, qu'après 3 h de contact, la plupart des fréquences de transfert sont comprises entre  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  au moins en ce qui concerne la souche 2011 et ses mutants auxotrophes. Un cas particulier est intéressant à signaler, il s'agit de la souche M<sub>5</sub> N<sub>1</sub> et de son mutant A<sub>1</sub>. En effet, dans ces conditions expérimentales, ces bactéries sont incapables de recevoir ou d'exprimer le caractère considéré. Cette constatation a été confirmée par trois essais et semble être une particularité des souches.

Afin de déterminer si cette propriété est fonction des conditions expérimentales ou de la nature réceptrice, nous avons effectué le croisement sur membranes en ayant soin d'utiliser, comme bactérie donatrice, un mutant auxotrophe de la souche 2011 Str<sub>3</sub> (2011 m<sub>9</sub> b (RP<sub>4</sub>)). Les fréquences obtenues après 5 h de contact (tableau 4) restent très inférieures à celles obtenues dans les mêmes conditions avec d'autres souches de R. meliloti

Souche réceptrice	Fréquences de transfert par rapport au R <sup>+</sup>
M <sub>9</sub> S	3,2 x 10 <sup>-5</sup>
M <sub>11</sub> S	2,3 x 10 <sup>-5</sup>
1-5	1,5 x 10 <sup>-5</sup>
2011 Str <sub>3</sub>	3,6 x 10 <sup>-6</sup>
2011 m <sub>3</sub>	1,8 x 10 <sup>-5</sup>
2011 m <sub>9</sub> b	6,9 x 10 <sup>-5</sup>
M <sub>5</sub> N <sub>1</sub>	< 10 <sup>-8</sup>
A <sub>1</sub>	< 10 <sup>-8</sup>

Tableau 3 : Obtention de souches résistantes à la tétracycline par conjugaison à partir d'E. coli J53 (RP<sub>4</sub>).

Croisement de 3 h à 34°C en milieu liquide sans agitation.

Milieux utilisés Souches testées	RC glc Tc	Rglc H B <sub>1</sub>	Rglc HB <sub>1</sub> Tc	Fréquences
	2011 m <sub>9</sub> b (RP <sub>4</sub> )	1,1 x 10 <sup>9</sup>	10	
M <sub>5</sub> N <sub>1</sub>	10	1,2 x 10 <sup>-10</sup>	10	10 <sup>-9</sup>
Croisement	7 x 10 <sup>8</sup>	7,5 x 10 <sup>9</sup>	1,1 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>-5</sup>

Tableau 4 : Croisement 2011 m<sub>9</sub>b (RP<sub>4</sub>) x M<sub>5</sub>N<sub>1</sub> réalisé sur membranes (5 h à 34°C). Les résultats expriment le nombre de bactéries/ml, calculées à la fin du contact.



Cependant, ces expériences montrent que la souche  $M_5N_1$  est capable de recevoir et d'exprimer le caractère de résistance à la tétracycline à partir d'un autre Rhizobium et en milieu solide. Ceci semble indiquer que cette bactérie possède, soit des structures externes particulières, soit un plasmide qui aurait la propriété d'exclure le  $RP_4$ . Cette seconde hypothèse est peu vraisemblable, en effet, BECHET (85) a montré que le plasmide indigène cohabite avec le  $RP_4$  chez le transconjugant  $M_5N_1$  ( $RP_4$ ). Il n'y a donc pas d'incompatibilité entre les deux éléments génétiques. Enfin, il est exclu qu'il s'agisse de phénomènes de restriction en effet, la souche  $M_5N_1$  est un mutant non muqueux de  $M_9S$ , bactérie recevant le plasmide aux mêmes fréquences que les souches 2011. La modification de la synthèse d'exopolysaccharides, liée au caractère de muquosité, affecterait, par contre, les structures externes des bactéries qui peuvent intervenir dans les phénomènes de conjugaison.

En règle générale, Rhizobium meliloti est donc capable d'exprimer les gènes de résistance à la tétracycline portés par le plasmide  $RP_4$  à des taux qui sont fonction des bactéries et des conditions expérimentales. Afin de déterminer si la totalité des gènes est exprimée, nous avons comparé les résistances des souches mères et des transconjugants correspondant vis-à-vis des quatre antibiotiques.

## 2) Vérification des phénotypes de résistance

La technique consiste à déposer, sur un tapis bactérien (environ  $10^7$  bactéries) étalé sur un milieu complet gélosé, des disques imprégnés de doses connues d'antibiotiques. Les résultats (tableau 5) sont exprimés en millimètres et désignent le diamètre de la zone d'inhibition déterminée après 24 h d'incubation à 30°C.

Si, dans l'ensemble, la résistance à la tétracycline s'exprime totalement chez tous les transconjugants, il persiste une ambiguïté pour

certaines souches à l'égard de la carbénicilline et de l'ampicilline. Les souches mères présentent une sensibilité faible vis-à-vis de ces antibiotiques, l'augmentation de résistance due à la présence du plasmide est alors faible et peu significative. Toutefois, les résultats obtenus avec la kanamycine semblent indiquer que le transfert concerne l'ensemble des gènes portés par le plasmide. Ces problèmes peuvent s'expliquer par le manque de stabilité des  $\beta$ -lactamines, fragilité qui limite leur utilisation pour des études génétiques.

Dans cette étude, la sélection des transconjugants est donc effectuée en présence de tétracycline, antibiotique pour lequel les différences de sensibilité entre cellules  $R^+$  et  $R^-$  sont les plus importantes.

Souche	Antibiotiques			
	Tc	Km	Ap	Cb
$M_9S$	25	11	-	4
$M_9S (RP_4)$	7	4	0	0
$M_{11}S$	19	10	6	3
$M_{11}S (RP_4)$	4	3	0	0
1 - 5	19	10	13	10
1 - 5 ( $RP_4$ )	7	4	4	6
2011 Str <sub>3</sub>	17	9	4	4
2011 Str <sub>3</sub> ( $RP_4$ )	5	2	3	4
2011 m <sub>3</sub>	22	5	17	10
2011 m <sub>3</sub> ( $RP_4$ )	4	0	10	6
2011 m <sub>9b</sub>	20	8	1	0
2011 m <sub>9b</sub> ( $RP_4$ )	2	1	0	0
$M_5N_1$	20	11	-	-
$M_5N_1 (RP_4)$	4	4	-	-

**Tableau 5** : Sensibilité des souches de *R. meliloti* et des transconjugants correspondants vis-à-vis des antibiotiques. Les résultats désignent le diamètre de la zone d'inhibition exprimé en mm.



Un autre problème peut être évoqué, en effet les différences de sensibilité entre la souche mère 2011 Str<sub>3</sub> et son mutant 2011 m<sub>3</sub> vis-à-vis des β-lactamines n'ont pu être expliquées. Il semble qu'à ce niveau, on retrouve l'importance des structures externes des bactéries du genre Rhizobium dans leur métabolisme. La sélection d'un mutant auxotrophe s'accompagne, en effet, très souvent de propriétés nouvelles qui semblent pourtant indépendantes. Pour les différentes raisons déjà exprimées, nous avons étudié l'influence des conditions expérimentales sur le transfert du plasmide.

## II - INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE ET DE CONTACT

Chez Rhizobium, le milieu de culture utilisé influence fortement l'orientation des métabolismes. En particulier, Rhizobium meliloti réagit très différemment suivant qu'on lui fournit du glucose ou du fructose. Dans le premier cas, la dégradation aboutit à l'excrétion d'acide 2 céto-gluconique qui acidifie fortement le milieu de culture (86). En présence de fructose, les bactéries synthétisent de fortes quantités d'exopolysaccharides. Ces propriétés peuvent influencer la formation des transconjugants, ces sources de carbone orientant le métabolisme, soit vers l'anabolisme, soit vers le catabolisme.

Les précultures sont effectuées dans les milieux liquides correspondant au milieu gélosé sur lequel les filtres seront déposés. Le croisement s'effectue entre la 2011 (RP<sub>4</sub>) et un mutant résistant à la rifampicine sélectionné à partir de la 2011 m<sub>3</sub> (2011 m<sub>3</sub> rif). On étudie (tableau 6) l'effet à court terme (1 h) et à long terme des deux monosaccharides sur la production de transconjugants (2011 m<sub>3</sub> rif (RP<sub>4</sub>)).

Pour des temps de croisement courts (1 h), le glucose semble être la meilleure source de carbone, le milieu complet seul ou additionné de fructose donne des résultats voisins. Par contre, après 24 h de contact, la production de transconjugants est meilleure sur milieu TY fructosé ou non. La fréquence de transfert sur milieu glucosé est constante entre 1 h et 24 h.

Temps de contact	Milieux	Nombre de R <sup>+</sup>	Nombre de Transconjugants	Fréquence de transfert/R <sup>+</sup>
1 heure	TY	1,6 x 10 <sup>8</sup>	4,6 x 10 <sup>4</sup>	2,9 x 10 <sup>-4</sup>
	TY glc	2,7 x 10 <sup>8</sup>	9,4 x 10 <sup>5</sup>	3,5 x 10 <sup>-3</sup>
	TY fru	8 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	1,3 x 10 <sup>-4</sup>
24 heures	TY	5,4 x 10 <sup>9</sup>	1,8 x 10 <sup>8</sup>	3,3 x 10 <sup>-2</sup>
	TY glc	2,5 x 10 <sup>9</sup>	3,5 x 10 <sup>6</sup>	1,4 x 10 <sup>-3</sup>
	TY fru	1 x 10 <sup>9</sup>	4,8 x 10 <sup>7</sup>	4,8 x 10 <sup>-2</sup>

Tableau 6 : Effet des milieux utilisés pour la préculture et le contact des bactéries sur le transfert du RP<sub>4</sub>  
Croisement 2011 (RP<sub>4</sub>) x 2011 m<sub>3</sub> rif.

L'acidification provoquée par la dégradation du glucose semble donc néfaste au transfert plasmidique. Par contre, l'effet du fructose est neutre quelque soit le temps de contact. La présence de fructose dans les milieux de préculture diminue de façon sensible les temps de génération, pour des raisons pratiques (croissance plus rapide), nous avons donc réalisé toutes les études sur milieu fructosé.

### III - ETUDE COMPARATIVE DES DIFFERENTES TECHNIQUES DE CONJUGAISON

Les transferts de matériel génétique peuvent s'effectuer, soit en milieu liquide, soit sur support solide. Le milieu liquide a été décrit pour le transfert du facteur F chez Escherichia coli, plasmide qui code pour la synthèse de pili nécessaire à "l'arrimage" des deux partenaires. Dans le premier chapitre, nous avons montré que le plasmide RP<sub>4</sub> pouvait être transmis à Rhizobium en milieu liquide si la cellule donatrice est la souche J<sub>53</sub> (RP<sub>4</sub>). Ce facteur de résistance a, par ailleurs, été

décrit (87) comme codant pour la synthèse de pili courts et trapus susceptibles de jouer un rôle dans les phénomènes de conjugaison. Toutefois, chez Rhizobium, tous les travaux parus à ce jour ont été réalisés sur support solide, le plasmide ayant été décrit comme non transmissible en milieu liquide.

### 1) Croisements en milieu liquide

Dans un premier temps, nous avons repris la technique utilisée pour les croisements entre E. coli et R. meliloti, à savoir à 34°C sans agitation. Dans ces conditions, quelque soit le temps de contact, le transfert n'a pas pu être mis en évidence, les fréquences sont toujours inférieures à  $10^{-6}$  et trop voisines des fréquences d'apparition de mutants spontanés pour pouvoir conclure à un transfert faible. On peut interpréter ces résultats en remarquant que la suspension bactérienne réalisée pour le croisement est trop dense et ne permet pas, en l'absence d'agitation, une oxygénation suffisante pour l'expression des gènes.

A la vue de ces résultats, nous avons repris les mêmes conditions expérimentales, mais en offrant au mélange une légère agitation rotative (environ 100 rpm), une agitation importante pouvant nuire à l'établissement des contacts. Les résultats présentés au tableau 7 ont été obtenus dans ces conditions.

L'écart de deux puissances, constaté entre les fréquences déterminées au temps zéro et au temps 48 h, permet de conclure à un transfert effectif du  $RP_4$  dans ces conditions. Toutefois, l'efficacité reste très faible et les temps de contact sont trop importants pour pouvoir envisager l'utilisation de cette technique pour les études de transfert des gènes chromosomiques.

Temps de contact	Nombre de R <sup>+</sup>	Nombre de R <sup>-</sup>	Nombre de Trc	$\Delta / R^+$
0	$5 \times 10^8$	$4 \times 10^9$	$1,2 \times 10^2$	$2,4 \times 10^{-7}$
1/2 h	$5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^9$	$1,2 \times 10^2$	$2,4 \times 10^{-7}$
1 h	$5,2 \times 10^8$	$3,5 \times 10^9$	$3 \times 10^2$ ;	$5,8 \times 10^{-7}$
6 h	$5,2 \times 10^8$	$5 \times 10^9$	$2,1 \times 10^3$	$4 \times 10^{-6}$
24 h	$1 \times 10^9$	$1 \times 10^{10}$	$7 \times 10^3$	$7 \times 10^{-6}$
48 h	$2 \times 10^9$	$3 \times 10^{10}$	$2 \times 10^4$	$1 \times 10^{-5}$

Tableau 7 : Cinétique de croisement en milieu liquide entre 2011 (RP<sub>4</sub>) et 2011 m<sub>3</sub> rif. Les résultats sont exprimés en bactéries par millilitre.  $\Delta / R^+$  : fréquence par rapport aux cellules donatrices. Trc = transconjugants.

Ceci peut s'expliquer par une séparation des couples, due à l'agitation, avant le transfert du plasmide. Dès maintenant, il apparaît donc que la condition primordiale est le contact étroit et durable entre les partenaires, condition qui ne peut vraisemblablement pas être réalisée par les pili spécifiques du RP<sub>4</sub>.

## 2) Croisement sur milieu gélosé

C'est la technique la plus couramment utilisée par les auteurs pour le transfert de gènes chromosomiques chez Rhizobium. L'utilisation de milieux gélosés légèrement déshydratés (préincubation des boîtes de Pétri, 1 nuit à 34°C) permet l'élimination rapide de la phase liquide, donc d'assurer un contact rapide entre les partenaires. D'autre

part, les bactéries sont en contact direct avec le milieu nutritif et la surface d'échange avec l'air est suffisamment importante pour assurer une oxygénation convenable.

Les cinétiques d'apparition des transconjugants permettent de diviser le transfert en deux étapes fondamentales (figure 2) :

- Dans les six premières heures, s'effectuent le transfert et l'expression des gènes portés par le plasmide. Au cours de cette période les fréquences passent de  $10^{-8}$  à  $10^{-3}$  par rapport au nombre de cellules donatrices. Toutes les bactéries réceptrices ne sont donc pas infectées en même temps. Ce transfert progressif peut s'expliquer, soit par des rencontres étalées dans le temps, soit par l'existence, dans le cycle cellulaire de l'un des partenaires, d'un état qui favorise le transfert.

La deuxième étape correspond à un infléchissement de la courbe et on assiste à une saturation de la population de bactéries réceptrices. En effet, dans aucun des cas, on n'a observé une infection totale, les fréquences calculées par rapport aux cellules  $R^-$  restent constamment inférieures à 10 p. cent quelque soit le temps de contact.

En conclusion, l'immobilité des cellules sur un support solide permet un transfert bien plus efficace qu'en milieu liquide ce qui confirme le rôle limité des pili dans les phénomènes de transfert du  $RP_4$ .

### 3) Croisements sur filtres

Cette fois le mélange est déposé par filtration sur une membrane stérilisante, l'immobilisation instantanée des bactéries permet dès lors un contact convenable. Chaque cellule est susceptible d'être en contact étroit avec une autre dans des conditions stables. Le dépôt de la membrane sur un milieu gélosé permet d'apporter les substances

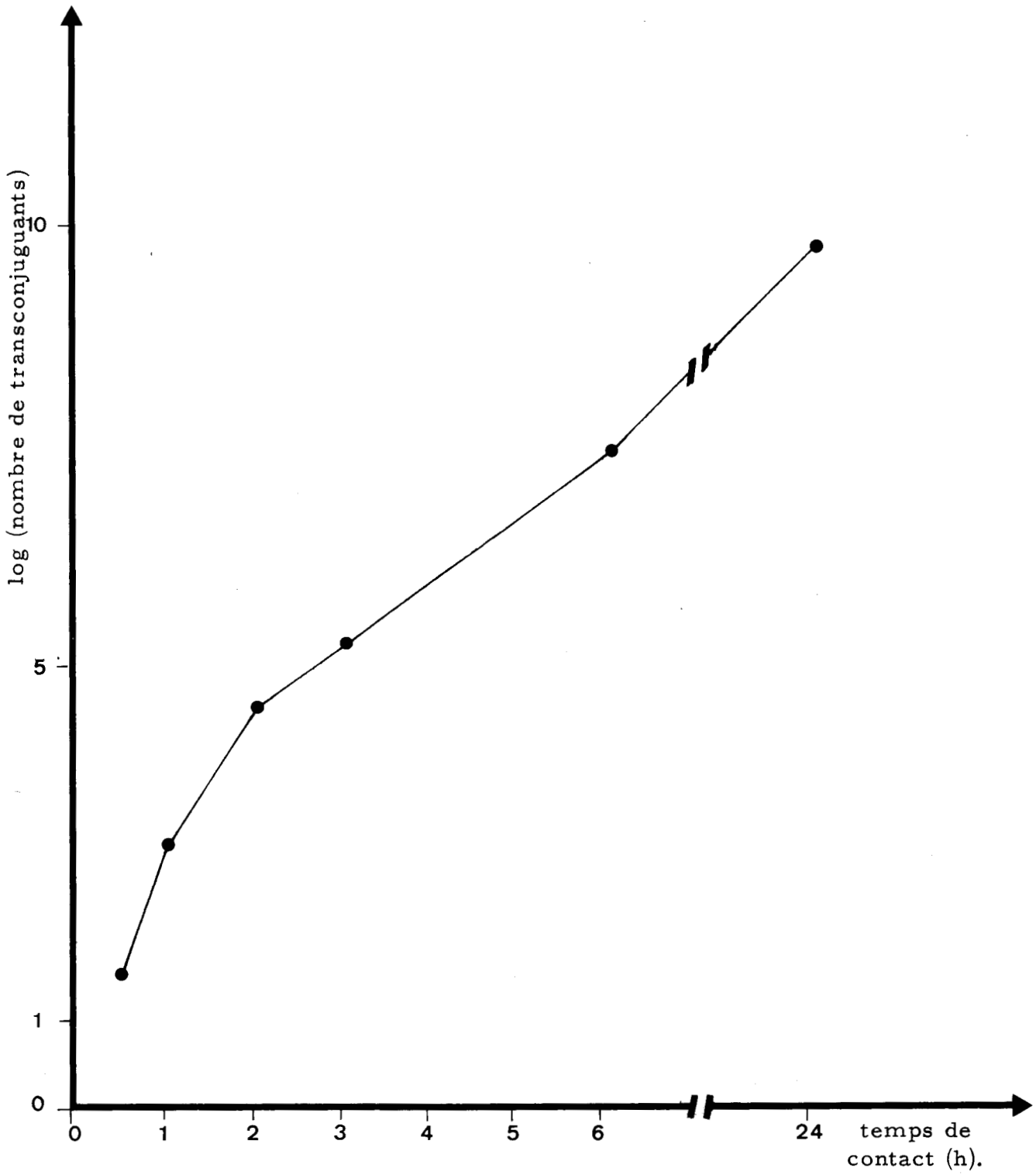


Figure 2 : Cinétique de croisement 2011(RP<sub>4</sub>) x 2011 m<sub>3</sub> rif effectué sur milieu gélosé (T Y fru).



nutritives nécessaires à l'expression des gènes.

La réalisation d'une cinétique (figure 3) montre que le profil de la courbe est semblable à celui établi pour les croisements sur milieux gélosés. Ceci suggère que les mécanismes mis en jeu sont identiques pour les deux techniques. Toutefois, il apparaît un important décalage dans le temps. En effet, le transfert débute dès les quinze premières minutes, le maximum est atteint en environ trois heures. Ceci peut s'expliquer par un contact meilleur entre les bactéries donatrices et les bactéries réceptrices étant donné la suppression totale de la phase liquide. D'autre part, cette méthode présente l'avantage d'offrir une reproductibilité meilleure du fait de la répartition indentique des bactéries, sur une surface constante, d'une manipulation à une autre. De plus, la récupération des cellules bactériennes après croisement est beaucoup moins fastidieuse et plus quantitative, condition importante pour les études de transfert de gènes chromosomiques. Enfin, comme dans la méthode précédemment décrite, l'utilisation de temps de contact longs ne permet pas une infection des cellules réceptrices supérieure à 10 p. cent.

En conclusion, en plus de l'avantage de la reproductibilité, la technique de croisement sur membranes permet un transfert convenable du  $RP_4$  en des temps brefs. Ceci montre une fois de plus le faible rôle que jouent les pili dans l'accrochage des par-tenaires, rôle que nous avons envisagé de façon plus précise.

#### IV - ROLE DE L'AGITATION MECANIQUE DES CULTURES $R^+$ SUR L'EFFICACITE DE TRANSFERT

Les études effectuées chez Escherichia coli montrent que l'agitation violente d'une culture de bactéries  $F^+$  ou Hfr inhibent de manière importante leur fertilité. La microscopie électronique rend compte de la présence, à la surface de ces bactéries, de structures

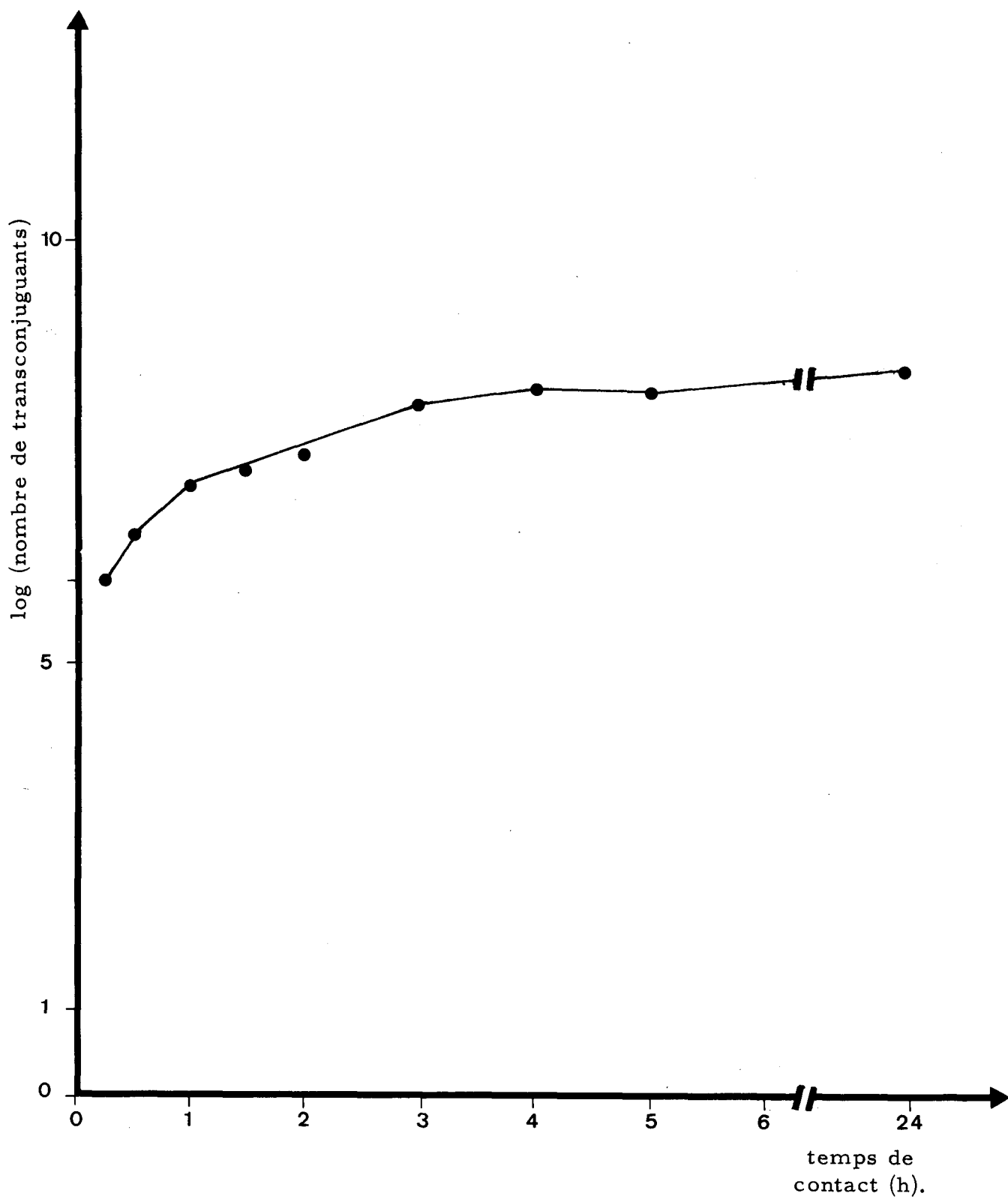


Figure 3 : Cinétique de croisement  $2011(RP_4) \times 2011m_3$  rif  
effectué sur membranes





filiformes qui jouent vraisemblablement un rôle de reconnaissance entre la cellule mâle et la cellule femelle (88). Par la suite, la rétraction des F pili dans la cellule donatrice contribuerait à rapprocher les deux cellules jusqu'à ce qu'un contact intime permette le transfert.

La démonstration de la présence de pili spécifiques du  $RP_4$ , grâce aux bactériophages, n'a pas été accompagnée jusqu'alors d'une étude de leur effet sur le transfert du plasmide qui code pour leur synthèse. Nous avons remarqué déjà dans les chapitres précédents que leur rôle devait être limité, en effet, ils ne permettent pas un transfert convenable en milieu liquide. Leur suppression, par agitation mécanique, est maintenant envisagée en milieux gélosés et sur membranes.

#### 1) Croisements sur milieux gélosés

La technique consiste à prélever dans la culture des cellules  $R^+$  un aliquot qui permettra la réalisation d'un croisement à partir de cellules donatrices intactes, le reste est homogénéisé au vortex durant une minute.

Les deux lots de bactéries sont mélangés à volume égal à deux parties de suspension de cellules réceptrices provenant d'une même culture.

Les résultats présentés au tableau 8 sont le reflet d'une expérimentation mais ils ont été confirmés par d'autres, réalisés avec des lots de cellules différents.

On note que, pour des temps de contact inférieurs ou égaux à 6 heures, le nombre de transconjugants et les fréquences sont constamment inférieurs dans le cas où la suspension de cellules  $R^+$  a été préalablement homogénéisée. Le faible écart observé (environ un facteur de 5) ne peut être confirmé que par sa reproductibilité, Il est vraisemblablement dû à une diminution faible du nom-

de pili. En effet, leur structure (courts et trapus) les rend relativement peu fragiles en même temps que peu efficaces pour l'accrochage des partenaires. Après 24 h de contact, quelque soit le lot de cellules mâles, les fréquences de transfert sont voisines et inférieures à 10 p. cent par rapport au nombre de cellules réceptrices.

Temps de contact	Croisement	Nombre de R <sup>-</sup>	Nombre de Transconj.	Fréquence/R <sup>-</sup>
30 mn	1	$8 \times 10^9$	$5 \times 10^3$	$6,2 \times 10^{-7}$
	2	$8 \times 10^9$	$1,9 \times 10^3$	$2,4 \times 10^{-7}$
2 h 30	1	$1 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^{-5}$
	2	$1 \times 10^{10}$	$5,3 \times 10^4$	$5,3 \times 10^{-6}$
6 h	1	$1,5 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^{-4}$
	2	$1,5 \times 10^{10}$	$8,2 \times 10^5$	$5,5 \times 10^{-5}$
24 h	1	$1,2 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^{10}$	$9,2 \times 10^{-2}$
	2	$1,2 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{10}$	$8,3 \times 10^{-2}$

Tableau 8 : Effet de l'homogénéisation de la population de cellules donatrices sur la formation des transconjugants  
 - croisement 1 : non homogénéisé  
 - croisement 2 : homogénéisé  
 souches utilisées : 2011 (RP<sub>4</sub>) x 2011 m<sub>3</sub> rif.



## 2) Croisements sur filtres

Les résultats, non présentés dans ce travail, sont moins nets et ne permettent pas une différenciation entre les deux types de cellules  $R^+$ . Le fait que le support soit dans cette méthode entièrement solide rend le rôle des pili beaucoup moins important. Comme chez E. coli, ces structures externes auraient donc un rôle de reconnaissance entre la cellule donatrice et la cellule réceptrice, mais pas d'effet sur le passage du DNA entre les deux bactéries. En effet, si le DNA passait par la voie du pilus, la diminution due à l'homogénéisation devrait être plus importante lors des croisements effectués en milieu solide. Afin d'augmenter au maximum les contacts cellulaires, nous avons donc étudié l'effet de la variation du nombre total de cellules (déposées par filtration sur la membrane) sur le nombre de transconjugants.

## V - EFFET DU NOMBRE TOTAL DE CELLULES SUR LE NOMBRE DE TRANSCONJUGUANTS

Cette étude effectuée sur membrane tient compte du fait que, sur un tel support, les bactéries sont incapables de se mouvoir. Par conséquent, la réalisation d'un transfert convenable est fonction de l'espace régnant entre chaque bactérie. D'autre part, une concentration trop importante peut induire des phénomènes d'asphyxie néfastes à l'expression des gènes reçus par la cellule femelle. Pour éviter tout artéfact, nous avons maintenu le rapport cellules donatrices sur cellules réceptrices constant.

Après précultures des deux souches, les suspensions sont donc concentrées par centrifugation de façon à obtenir une densité optique de 100 pour les souches 2011 (RP<sub>4</sub>) et 2011 m<sub>3</sub> rif. Ces deux cultures sont ensuite mélangées à volume égal et diluées. On filtre 1 ml de chaque dilution, le croisement effectué à 34 °C pendant 4 h, on compare pour chaque croisement le nombre absolu de transconjugants et les fréquences de transfert calculées par rapport au nom-



bre de bactéries donatrices (tableau 9).

Les fréquences montrent que l'efficacité est maximale pour des quantités de cellules correspondant aux dilutions comprises entre  $10^{-1}$  et  $10^{-3}$ . Dans ces conditions, le nombre de bactéries est compris entre  $10^8$  et  $10^{10}$  cellules viables. Les contacts sont alors maxima et permettent une bonne efficacité. Pour des concentrations supérieures, il semble qu'il y ait saturation, les bactéries ne pouvant plus puiser leurs substances nutritives. Pour des valeurs inférieures, les contacts sont insuffisants : le transfert devient inefficace.

Dilution par rapport à la suspension de départ.	Nombre de Transconjuguants	Fréquence par rapport aux bactéries $R^+$
1	$1,3 \times 10^8$	$3 \times 10^{-3}$
$5 \times 10^{-1}$	$9 \times 10^7$	$2,5 \times 10^{-3}$
$10^{-1}$	$2 \times 10^8$	$2,9 \times 10^{-2}$
$5 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^8$	$4,3 \times 10^{-2}$
$10^{-2}$	$3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^{-2}$
$5 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^7$	$2,5 \times 10^{-2}$
$10^{-3}$	$2,3 \times 10^6$	$1,9 \times 10^{-2}$
$5 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^5$	$6,4 \times 10^{-3}$
$10^{-4}$	$9,3 \times 10^2$	$3,7 \times 10^{-4}$

Tableau 9 : Effet du nombre total de bactéries en présence sur le nombre de transconjuguants  
 La suspension de départ titre environ  $10^{11}$  bactéries de chaque type ( $R^+$  et  $R^-$ ).

Ceci confirme l'importance des contacts et de l'oxygénation dans les phénomènes de conjugaison.

## VI - DISCUSSION

Rhizobium meliloti est capable de recevoir et d'exprimer le facteur de résistance  $RP_4$ , soit en milieu liquide à partir d'E. coli J<sub>53</sub>( $RP_4$ ), soit à partir d'une souche de Rhizobium en milieu solide.

Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que le transfert nécessite de la part de la bactérie donatrice une importante quantité d'énergie que Rhizobium ne peut puiser en milieu liquide statique. L'agitation permet un transfert faible : les couples étant séparés avant que le passage des gènes ne soit effectué. Le rôle des pili codés par le plasmide  $RP_4$  est limité, leur structure ne permettant pas un accrochage solide entre les bactéries. Par contre, ils favorisent la reconnaissance entre bactérie mâle et bactérie femelle en créant des structures externes différentes.

Comme chez Escherichia coli, le transfert est sous l'influence du métabolisme intermédiaire (89). En effet, la présence de glucose inhibe à long terme la formation des transconjugants alors que le fructose ne présente aucun effet.

Enfin, il est apparu au fil des études que l'infection de la population  $R^-$  n'est jamais totale. Les fréquences de transfert n'excèdent jamais 10 p. cent quelque soit les conditions expérimentales. Ceci suggère donc une régulation particulière de la conjugaison qui peut être fonction du plasmide et/ou des bactéries donatrices et réceptrices. Nous avons essayé d'expliquer ce phénomène en tenant compte des principes fondamentaux étudiés chez E. coli

## DEUXIEME PARTIE

Si un transfert plasmidique ne se fait pas à 100 p. cent, la régulation peut être effectuée :

- par le plasmide lui-même
- par la bactérie donatrice
- par la bactérie réceptrice.

Si la régulation est due au plasmide, le phénomène observé chez Rhizobium doit pouvoir se transposer aux autres genres bactériens. Il s'agirait en quelque sorte d'une répression des gènes portés par la macromolécule qui affecterait, en particulier, les gènes responsables du transfert.

D'autre part, le contrôle négatif est susceptible d'être effectué par la bactérie réceptrice sous deux formes :

- . soit le plasmide est transféré à 100 % mais il ségrège rapidement à 90 %
- . soit seulement 10 % des bactéries réceptrices sont capables de recevoir.

Enfin, l'un ou l'autre ou les deux partenaires sont sensibles à un état particulier que l'on appelle état de compétence, qui ne permet le transfert qu'à une période donnée du cycle cellulaire.

Ce chapitre se propose d'envisager chacune de ces hypothèses en discutant les résultats expérimentaux obtenus.

## I - PRECULTURES SUCCESSIVES DE TRANSCONJUGUANTS

L'hypothèse la plus vraisemblable semble être celle de la ségrégation. En effet, en absence d'antibiotique, dont la résistance est codée par le plasmide, les bactéries sont susceptibles de perdre le facteur de résistance n'en ayant pas besoin pour survivre.

Une souche R<sup>+</sup>, au cours des générations, peut donc perdre sa résistance à la tétracycline. La souche 2011 (RP<sub>4</sub>) est donc précultivée deux fois sur milieux TY fructosé et sur TY fructosé complémenté de tétracycline. En fin de phase exponentielle, on procède à une numération des deux lots de cellules en présence ou en absence de tétracycline.

Les résultats concernent la souche 2011 (RP<sub>4</sub>) et sont présentés au tableau 10.

Milieux de numération. \ Milieux de pré-culture	TY Fru	TY Fru Tc
RCG glc	2,4 x 10 <sup>9</sup>	2,5 x 10 <sup>9</sup>
RCG glc Tc	2,4 x 10 <sup>9</sup>	2,4 x 10 <sup>9</sup>

Tableau 10: Numération de la souche 2011 (RP<sub>4</sub>) sur milieux avec ou sans tétracycline après pré-culture dans les mêmes conditions.

Les résultats sont exprimés en bactéries viables/ml.

Dans ces conditions, on remarque que quelque soit le milieu de préculture, le nombre de bactéries résistantes à la tétracycline est égal au nombre total des bactéries. Par conséquent, si la ségrégation existe elle intervient à des fréquences très faibles qui ne peuvent expliquer les phénomènes décrits plus haut.

D'autre part, si 90 p. cent des bactéries ségrégaient très rapidement, pour des temps de contact très longs, les ségrégants devraient être capables de recevoir à nouveau le plasmide. Or, il apparaît, lors des cinétiques, que les fréquences n'évoluent plus après 24 h. de croisement. L'hypothèse de la ségrégation est donc peu vraisemblable. Par contre, la population de bactéries réceptrices est susceptible de posséder 90 p. cent des bactéries incapables de recevoir le  $RP_4$  pour des raisons génétiques. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons contrôlé la population  $R^-$  après contact avec une souche  $R^+$ .

## II - CROISEMENT EFFECTUE AVEC UNE SOUCHE $R^-$ AYANT DEJA ETE EN CONTACT AVEC UNE POPULATION DE CELLULES DONATRICES.

Cette vérification est effectuée pour deux raisons fondamentales :

- Dans une population de cellules réceptrices on peut avoir des bactéries qui, pour des raisons génétiques, sont incapables de conjuguer.
- Après un premier contact avec les cellules donatrices, les 90 p. cent des bactéries n'ayant pas exprimé le plasmide ont cependant gardé en mémoire dans leur génôme des caractères les rendant incapables de recevoir.



Nous avons donc effectué un croisement entre 2011 (RP<sub>4</sub>) et 2011 m<sub>3</sub>rif. Après 24 h de contact, on étale un aliquot sur milieu sélectif permettant la croissance des bactéries réceptrices. Après incubation 48 h à 30°C, on reprend cinq clones sensibles à la tétracycline. Ces bactéries sont mises en croissance dans le milieu TY fructosé et sont soumises à un second contact avec la souche 2011 (RP<sub>4</sub>). Si ces cellules ont totalement perdu la possibilité de conjuguer l'une des hypothèses énoncées précédemment est, dès lors, vérifiée. Les résultats (tableau 11) donnent les valeurs des fréquences obtenues pour un seul clone, les autres apportant des résultats semblables. Le témoin correspond à un croisement effectué avec la même culture de bactéries R<sup>+</sup> et une population R<sup>-</sup> obtenue par inoculation de bactéries provenant du tube de conservation.

Croisement	Nombre de R <sup>-</sup>	Nombre de Transconjuguants	Fréquence
Témoin	1,8 x 10 <sup>9</sup>	7,1 x 10 <sup>5</sup>	3,9 x 10 <sup>-4</sup>
Essai	2,9 x 10 <sup>9</sup>	1,7 x 10 <sup>6</sup>	5,9 x 10 <sup>-4</sup>

Tableau 11 : Comparaison des fréquences obtenues avec une population réceptrice ayant été en contact (croisement essai) ou non (croisement témoin) avec une population R<sup>+</sup>

Dans les deux cas, les fréquences sont voisines, le contact préalable avec les bactéries donatrices n'affecte donc pas la faculté de recevoir et d'exprimer le plasmide. Dans une population R<sup>-</sup>, chaque bactérie possède donc les mêmes potentialités, la régulation intervient donc en cours de contact et n'est pas due à une propriété innée de 90 p. cent des bactéries Rhizobium.

La seule hypothèse maintenant plausible est celle d'un état de compétence qui affecte les cellules réceptrices. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des essais de synchronisation de bactéries réceptrices, en espérant que les cinétiques de transfert montrent une période préférentielle pour l'expression des gènes de résistance.

### III - CROISEMENT AVEC UNE POPULATION RECEPTRICE SYNCHRONISEE

La synchronisation d'une culture bactérienne permet d'obtenir toutes les cellules dans un même état de croissance.

La réplication et la division cellulaire s'effectuent alors au même moment pour toutes les bactéries. Si le transfert nécessite un état particulier, il doit alors se réaliser en bloc à une période déterminée du cycle de réplication.

Ces essais ont été effectués à l'aide de la souche 2011 m<sub>3</sub> rif exigeante en tryptophane. Après culture en milieu TY fructosé, la suspension bactérienne est centrifugée, lavée deux fois, et reprise en milieu R glc HB<sub>1</sub>. Après 8 h de contact qui permettent la fin du cycle de réplication pour toutes les cellules, on additionne à la culture une solution stérile d'extrait de levure qui permet le redémarrage de la croissance. Après deux à trois générations, cette culture est mélangée à une suspension de cellules donatrices (20 11 (RP<sub>4</sub>)) afin d'effectuer une cinétique de transfert. Les résultats sont résumés au tableau 12a.

Deux constatations peuvent être faites. D'une part, la synchronisation semble effective (nombre de cellules aux temps 30 mn et 1 h comparables) et d'autre part, il semble que le transfert ne s'effectue pas en masse. En effet, le taux de transconjugants obtenu après 30 mn est trop important ou trop faible pour pouvoir conclure à un état de compétence particulier des bactéries réceptrices.

Temps de contact	R <sup>+</sup>	R <sup>-</sup>	Transconjuguants	Fréquence/R <sup>-</sup>
30 mn	2,8 x 10 <sup>8</sup>	1,8 x 10 <sup>8</sup>	3 x 10 <sup>3</sup>	1,7 x 10 <sup>-5</sup>
1 h	4 x 10 <sup>8</sup>	1,9 x 10 <sup>8</sup>	7 x 10 <sup>3</sup>	3,7 x 10 <sup>-5</sup>
6 h	8,6 x 10 <sup>9</sup>	3,4 x 10 <sup>8</sup>	4,8 x 10 <sup>6</sup>	1,4 x 10 <sup>-2</sup>

Tableau 12a: Croisement 2011 (RP<sub>4</sub>) x 2011 m<sub>3</sub>rif. La cellule réceptrice a subi un essai de synchronisation.

Si la régulation du transfert plasmidique fait intervenir la population R<sup>-</sup>, il faut envisager d'autres mécanismes, en effet, ni la ségrégation, ni l'état de compétence ne peuvent expliquer, seuls, les fréquences de 10 p. cent constamment observées lors des croisements. Nous envisagerons maintenant un certain nombre de propriétés des bactéries donatrices susceptibles d'apporter des arguments supplémentaires.

#### IV - ETUDE DE LA REGULATION DES BACTERIES DONATRICES

L'étude des plasmides et épisomes montre que la plupart d'entre eux subit une répression, contrôle négatif qui empêche la présence d'un nombre trop important de copies dans la cellule hôte. Les mécanismes font vraisemblablement intervenir un répresseur, en effet, il a été possible de sélectionner des plasmides dérèprimés pour leur transfert. La sélection, le plus souvent, s'effectue par conjugaisons successives qui diminuent le taux de répresseur dans les cellules bactériennes. Ces mutants ont alors la propriété de transférer le plasmide à haute fréquence.

Dans d'autres cas, le plasmide est totalement réprimé, son transfert est impossible sans l'induction par des substances en rapport avec les gènes portés par l'élément génétique.

Dans un premier temps, nous avons envisagé l'effet de la tétracycline sur la régulation du  $RP_4$ . Ensuite, la réalisation de conjugaison avec trois partenaires devrait permettre l'obtention de transferts à haute fréquence.

#### 1) Effet de la tétracycline sur la régulation du $RP_4$

Ces études ont été réalisées dans un but de sélectionner par l'antibiotique des bactéries qui portent de façon certaine le  $RP_4$ . En effet, quand ces expériences ont été réalisées, nous n'étions pas certains des conclusions relatives à la ségrégation. D'autre part, la présence de tétracycline dans le milieu de préculture est susceptible d'induire la réplication du plasmide et son expression donc d'augmenter de façon sensible la concentration des produits des gènes responsables du transfert.

La technique consiste à effectuer la préculture de la souche 2011 ( $RP_4$ ) sous deux conditions, soit en absence, soit en présence de tétracycline. Les deux cultures sont ensuite centrifugées et reprises dans le milieu TY fructosé de façon à éliminer les traces d'antibiotique. Dans les deux cas, la souche réceptrice provient de la même culture. Nous exprimons dans ce chapitre les résultats obtenus par conjugaison sur membranes, mais il faut signaler qu'ils ont également été obtenus sur milieux gélosés (tableau 1~~b~~). Les manipulations ont été effectuées pour des temps de contact variables.

Les faibles différences observées entre les deux conditions (facteur d'environ 2) ne peuvent être interprétées que pour deux raisons :

- Les manipulations ont été reproduites quatre fois
- La variation s'effectue toujours dans le même sens.

Temps de contact	Nombre de Transconjugants		Fréquences par rapport au R <sup>-</sup>	
	Croisement 1	Croisement 2	Croisement 1	Croisement 2
30 mn	$4,5 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-3}$
3 h	$8,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$6,5 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-2}$
5 h 30	$2,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	$3 \times 10^{-2}$	$17 \times 10^{-2}$
6 h	$2,6 \times 10^8$	$4 \times 10^8$	$2,6 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^{-2}$

Tableau 12b: Effet de la tétracycline sur la transfert du RP<sub>4</sub>

Croisement 1 : R<sup>+</sup> précultivé sur TYFru

Croisement 2 : R<sup>+</sup> précultivé sur TYFru Tc

Souches : 2011 (RP<sub>4</sub>) x 2011 m<sub>3</sub> rif.

Les fréquences sont toujours supérieures quand la souche donatrice est précultivée en présence de l'antibiotique.

Plusieurs interprétations de ce phénomène sont possibles :

- La présence de tétracycline correspond à une obligation pour les cellules d'exprimer les gènes, on assiste donc à une induction de l'ensemble du plasmide.
- l'induction s'exprime par une augmentation du nombre de copies du plasmide dans les cellules donatrices qui se traduit par une probabilité plus importante de transfert.

Aucune de ces hypothèses n'a pu être éliminée par les différentes expérimentations, mais elles prouvent toutefois qu'une régulation spécifique s'effectue bien au niveau des cellules donatrices.

## 2) Croisements à trois partenaires

Certains plasmides se comportent comme des éléments déréprimés chez la souche réceptrice qui vient d'accueillir l'élément génétique. En effet, la bactérie n'exprime pas immédiatement l'ensemble des gènes en particulier le retard mis pour la synthèse du répresseur permet de supprimer le contrôle négatif des gènes responsables du transfert. Dans cette hypothèse, en effectuant un croisement entre deux bactéries, l'addition d'une troisième après un temps de contact déterminé doit influencer les fréquences de transfert et le nombre de transconjugants de cette troisième bactérie par rapport à un croisement où les trois partenaires sont mélangés au temps zéro. Dès à présent, il faut remarquer les difficultés présentées par ce type d'études au point de vue technologique. En effet, l'efficacité de transfert est en partie fonction des conditions physiologiques des bactéries, paramètres très difficiles à contrôler et qui apportent des variations très importantes d'une manipulation à une autre.

Pour ces études, nous avons employé le système suivant. La souche donatrice est la 2011m<sub>3</sub> (RP<sub>4</sub>), la souche intermédiaire la souche 2011, la bactérie réceptrice est le mutant résistant à la rifampicine de 2011m<sub>3</sub>. Dans ces conditions, nous avons fait varier les paramètres suivants :

- le temps de contact entre les souches 1 (2011m<sub>3</sub>(RP<sub>4</sub>)) et 2 (2011),
- le temps de contact entre les souches 1 + 2 et la bactérie réceptrice (2011m<sub>3</sub>rif).

Les résultats exprimés au tableau 14 présentent le croisement que l'on peut schématiser de la façon suivante :

$$\begin{array}{cc} [2011 m_3 (RP_4) \times 2011] & \times 2011 m_3 \text{rif} \\ \text{contact I} & \text{contact II} \end{array}$$

Temps de contact I	2011 m <sub>3</sub> (RF <sub>4</sub> )	2011	2011 m <sub>3</sub> rif	2011 (RF <sub>4</sub> )	2011 m <sub>3</sub> rif (RF <sub>4</sub> )
1/4 h	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$4,8 \times 10^8$	$7,9 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
1/2 h	$1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$4,4 \times 10^8$	$9,7 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$
1 h	$1,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$	$5 \times 10^8$	$2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^6$
2 h	$1,5 \times 10^8$	$2 \times 10^9$	$5 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$
4 h	$2 \times 10^8$	$3,3 \times 10^9$	$4,1 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$	$1,4 \times 10^6$

Tableau 13 : Croisement à trois partenaires: Contact entre les deux premières bactéries variable (contact I)  
Le temps de contact pour la troisième est fixe (30 mn).



Le contact I varie de 1/4 h à 4 h, après ce premier croisement, les bactéries sont remises en suspension, on additionne la souche 2011 m<sub>3</sub> rif, ce mélange est filtré, la membrane est maintenue pendant 30 mn à 34°C (contact II). Chaque type bactérien est numéroté à la fin de la manipulation.

Ces résultats montrent que le nombre de transconjugants des deux souches réceptrices de départ (2011 et 2011 m<sub>3</sub> rif) varie peu. Il est surprenant d'avoir peu de différence entre 15 mn et 4 h de contact pour les numérations de 2011 (RP<sub>4</sub>). Il faut donc admettre que l'addition de la souche 2011 m<sub>3</sub> rif permet le retransfert entre bactéries réceptrices pour obtenir des fréquences quasi-constantes. En effet, le contact I produit des transconjugants 2011 (RP<sub>4</sub>) qui, lors de l'addition de la souche 2011 m<sub>3</sub> rif, seraient capables de transférer à haute fréquence le plasmide RP<sub>4</sub> au R<sup>-</sup> restants. La réaction en chaîne qui s'ensuit explique que les fréquences de transfert ne sont pas fonction du temps de contact entre les deux bactéries initiales. Ceci confirmerait l'hypothèse d'une dérépression possible dont la disparition provoque très rapidement l'arrêt des phénomènes de conjugaison. La dérépression des transconjugants de la souche 2011 m<sub>3</sub> rif empêche de déterminer les temps de contact nécessaires à un transfert convenable entre 2011 (RP<sub>4</sub>) et 2011 m<sub>3</sub> rif, paramètre particulièrement intéressant pour la réalisation de transferts de gènes chromosomiques.

La dérépression des transconjugants, immédiatement après le transfert du plasmide, a été confirmée par l'expérience suivante. On réalise trois croisements (tableau 14).

- Croisement 1 : contact de 3 heures pour les trois souches
- Croisement 2 : contact 2 h 45 pour 2011 m<sub>3</sub>(RP<sub>4</sub>) et 2011  
la souche 2011 m<sub>3</sub> rif étant additionnée après  
le premier croisement, pendant 15 mn.
- Croisement 3 : contact de 3 h entre 2011 m<sub>3</sub>(RP<sub>4</sub>) et 2011.



Croisement	2011 m <sub>3</sub> (RP <sub>4</sub> )	2011	2011 m <sub>3</sub> rif	2011 (RP <sub>4</sub> )	2011 m <sub>3</sub> rif (RP <sub>4</sub> )
1	$2,9 \times 10^8$	$2,7 \times 10^9$	$4,7 \times 10^8$	$3 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$
2	$4,4 \times 10^8$	$2,7 \times 10^9$	$5,6 \times 10^8$	$8 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$
3	$3,4 \times 10^7$	$2,5 \times 10^8$	-	$4,7 \times 10^6$	-

Tableau 14 : Numération des transconjugants dans différentes conditions

Croisement 1 : 2011 m<sub>3</sub> (RP<sub>4</sub>) x 2011 x 2011 m<sub>3</sub> rif 3 h.

Croisement 2 : [ 2011 m<sub>3</sub> RP<sub>4</sub> x 2011 ] x 2011 m<sub>3</sub> rif  
2 h 45 15 mn

Croisement 3 : 2011 m<sub>3</sub>(RP<sub>4</sub>) x 2011 3 h.



On numère dans tous les cas les souches de départ et les transconjuguants.

Les nombres de transconjuguants de 2011m<sub>3</sub> rif après 3 h de contact avec les deux autres bactéries ou après 15 mn avec les bactéries donatrices issues du croisement initial sont très voisins. Les fréquences obtenues sont celles correspondant à la saturation. Il est donc possible d'obtenir un transfert convenable en 15 mn, les fréquences calculées par rapport à la souche réceptrice ne sont pas augmentées ( < 10 %).

Enfin, il faut signaler que l'étude des variations du temps de contact de la souche 2011 m<sub>3</sub> rif avec les deux autres partenaires a fourni des résultats très disparates, impossibles à interpréter. Il est donc possible, dans certaines conditions, d'obtenir des bactéries donatrices déréprimées, la dérépression semble disparaître très rapidement et ne permet pas l'obtention de fréquences de transfert plus élevées. Dès à présent, on peut affirmer que les mécanismes de transfert mettent en jeu des régulations strictes à la fois chez la bactérie donatrice et chez la bactérie réceptrice. Pour parfaire ces études, nous avons étudié l'effet de la variation du rapport R : 
$$\frac{\text{nombre de bactéries donatrices}}{\text{nombre de bactéries réceptrices}}$$

V - EFFET DU RAPPORT  $\frac{\text{nombre de cellules donatrices}}{\text{nombre de cellules réceptrices}}$  SUR LE

NOMBRE DE TRANSCONJUGUANTS.

Chez E. coli les cellules réceptrices ne peuvent recevoir du matériel génétique que si elles se trouvent dans un état particulier appelé état de compétence. Il a été démontré que dans une telle population bactérienne, environ une cellule sur dix est capable de recevoir et d'exprimer les gènes transférés (90). Dans ces conditions, le transfert est maximal quand le rapport est voisin de 1/10 si toutes les bactéries dona-

trices sont fertiles. Les chapitres précédents ont montré que les fréquences maximales sont comprises entre 1 et 10 p. cent, et que l'état de compétence des cellules réceptrices n'intervient pas seul dans les régulations du transfert.

Nous avons donc fait varier le rapport R de 100 à 1/100 en examinant l'apparition des transconjuguants après un contact de 6 h. Les résultats sont visualisés par le tableau 15 et la figure 4.

On constate, à la vue des résultats, que le maximum est atteint pour des valeurs du rapport voisines de 1. Que le rapport augmente ou diminue, les fréquences sont voisines de  $10^{-2}$  par rapport à la bactérie ajoutée en défaut. Ceci laisse préjuger que, ni l'état de compétence de la souche réceptrice, ni l'état de la souche donatrice n'interviennent seuls dans les régulations du transfert.

## VI - DISCUSSION

L'ensemble des résultats exprimés dans ce chapitre nous permet d'apporter plusieurs conclusions.

D'une part, il ne nous a pas été possible d'améliorer de façon sensible la fréquence de transfert par rapport à la bactérie réceptrice. Le taux maximal reste constamment inférieur à 10 p. cent.

D'autre part, la régulation du transfert s'effectue de manière complexe et est la résultante de plusieurs paramètres. L'addition de tétracycline dans le milieu de préculture de la cellule R<sup>+</sup> offre la possibilité d'augmenter l'efficacité du transfert. Toutefois, il faut noter que la régulation n'est pas du type tout ou rien comme il est décrit chez certains genres bactériens. En effet, des travaux récents ont montré que chez Bacteroides, le plasmide codant pour la résistance à la tétracycline ne se transfère que si les cellules (91)

$$R^+ / R^-$$

Croisement 6 h.

Nombre $R^+$	Nombre $R^-$	Rapport	Transconjuguants	Fréquence/ $R^+$	Fréquence/ $R^-$
$9,8 \times 10^7$	$5,2 \times 10^9$	1/50	$4,8 \times 10^6$	$4,9 \times 10^{-2}$	$0,1 \times 10^{-4}$
-	$1,6 \times 10^9$	-	$4 \times 10^6$	-	-
$3,7 \times 10^8$	$3,5 \times 10^9$	1/9,5	$1,1 \times 10^7$	$2,9 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-3}$
$9 \times 10^8$	$4,5 \times 10^9$	1/5	$1,5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^{-2}$	$3,4 \times 10^{-3}$
$3,7 \times 10^9$	$3 \times 10^9$	1,2	$5,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-2}$
$5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	3	$4,5 \times 10^7$	$9,2 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-2}$
$6 \times 10^9$	$5 \times 10^8$	12	$1,7 \times 10^7$	$2,5 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-2}$
$6,5 \times 10^9$	$3,8 \times 10^8$	17	$1,4 \times 10^7$	$2,1 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^{-2}$

Tableau 15 :

Effet du rapport:  $\frac{\text{Nombre de } R^+}{\text{Nombre de } R^-}$  sur les fréquences de transfert.



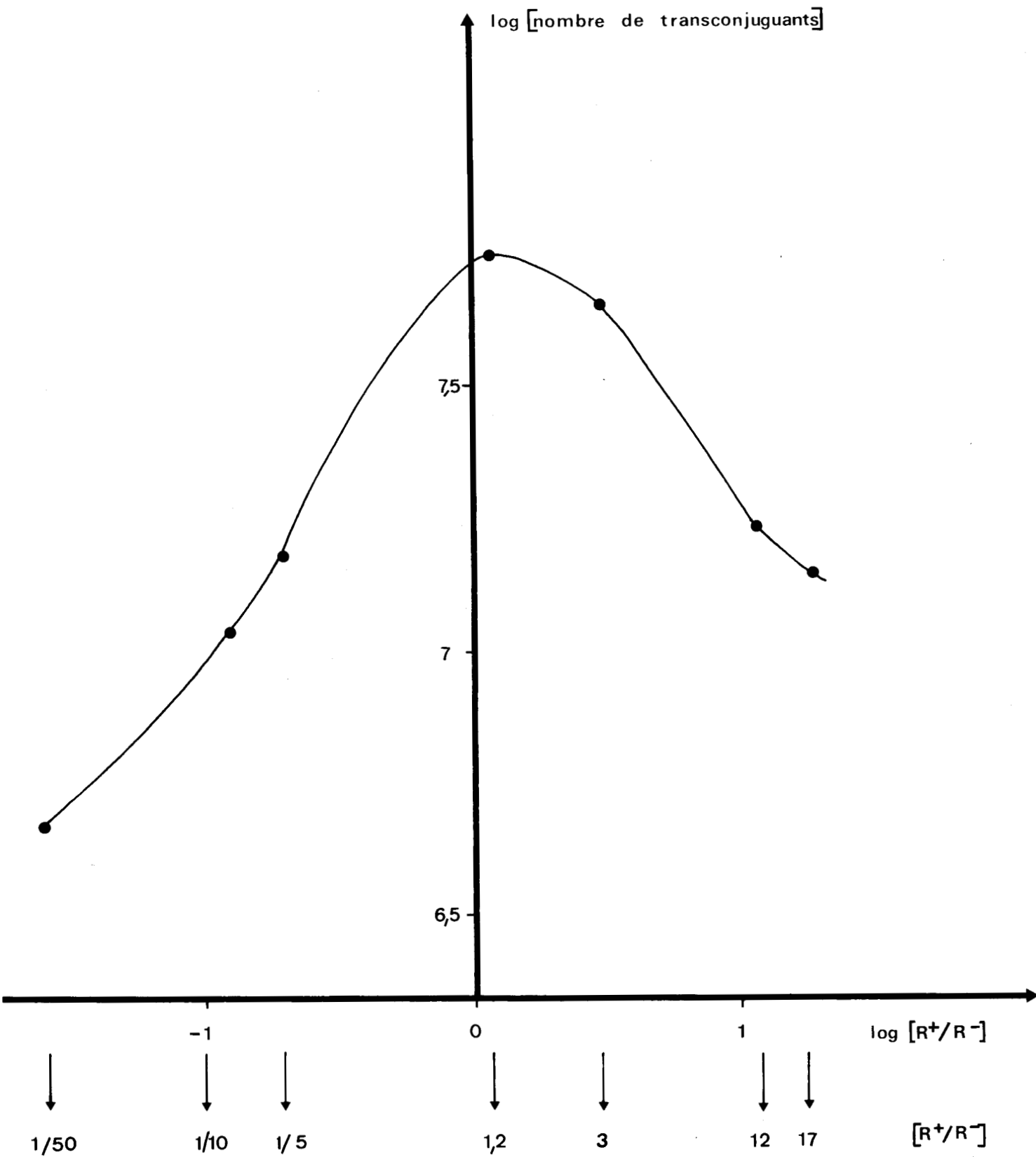


Figure 4 : Effet du rapport  $R^+/R^-$  sur la production des transconjugants. Croisement 2011 ( $RP_4$ ) x 2011 $m_3$  rif effectué sur membranes (temps de contact = 6 h).



donatrices ont été préalablement mises en contact avec l'antibiotique. Le nombre de générations augmentant, il a été possible, dans ces conditions, d'isoler des plasmides qui maintiennent leur possibilité de transfert. Le système du type  $RP_4$  est fondamentalement différent par le fait que l'induction par la tétracycline est très faible et n'exige pas un nombre de générations défini.

Enfin, les études de synchronisation et de l'effet du rapport, nombre de cellules donatrices, sur nombre de cellules réceptrices, ont montré que, si l'état de compétence intervient, il met en jeu les deux partenaires.

En conclusion, le plasmide  $RP_4$  constitue un système d'études génétiques intéressant pour Rhizobium, afin de déterminer son rôle dans le transfert des gènes chromosomiques, nous avons comparé les transferts plasmidiques et chromosomiques en tenant compte des résultats acquis lors des deux premières parties.

### TROISIEME PARTIE

---

Comme il a été énoncé précédemment, l'étape limitante du transfert chromosomique peut être le passage du plasmide. L'amélioration des conjugaisons par l'intermédiaire du  $RP_4$  doit alors être liée à un transfert convenable du plasmide. La comparaison des deux phénomènes est très importante d'un point de vue fondamental, en effet, certains auteurs ont décrit le plasmide  $RP_4$  comme un élément conjugatif mais non mobilisateur (92). Il est, dès lors, indispensable de déterminer le rôle du  $RP_4$  dans la conjugaison chez Rhizobium.

Nous avons repris trois types de techniques :

- les cinétiques de passage et d'expression
- les précultures des cellules donatrices en présence de tétracycline
- les conjugaisons à trois partenaires.

La comparaison des résultats doit permettre d'avancer des hypothèses quand au rôle du transfert plasmidique vis-à-vis de la recombinaison chromosomique. Tous les croisements ont été réalisés sur membranes à partir des souches 2011( $RP_4$ ) et 2011  $m_3$  rif. On sélectionne les recombinants sur le caractère tryptophane.

#### I - CINETIQUES DE RECOMBINAISON

---

Si les deux phénomènes sont liés, il faut s'attendre à obtenir des cinétiques semblables, un maximum de transfert plasmidique se traduisant par un taux de recombinants optimal. La difficulté de cette technique repose sur le fait que les fréquences de recombinaison sont voisines de  $10^{-6}$ , il faut donc utiliser des marqueurs

d'auxotrophie très stables. D'autre part, l'apparition sur les boîtes de sélection de minuscules colonies translucides rend complexe l'interprétation des résultats.

Les cinétiques sont réalisées à partir de cellules pré-cultivées sur milieu TY fructosé, la membrane est déposée sur le milieu correspondant gélosé. A chaque croisement, on réalise les témoins nécessaires de façon à déterminer les fréquences d'apparition de mutants spontanés.

Les résultats sont décrits au tableau 16 et visualisés sur la figure 5. Ils montrent qu'après 30 mn de contact les fréquences sont :  $9 \times 10^{-6}$  pour le caractère tryptophane et de  $1 \times 10^{-5}$  pour le caractère de résistance à la tétracycline, si on les exprime par rapport à la bactérie donatrice. Après 6 h de conjugaison la fréquence pour le  $RP_4$  est passée à  $6 \times 10^{-3}$ , tandis que celle pour le caractère d'auxotropie est de  $2,4 \times 10^{-6}$ . La figure 5 montre une nette dissociation entre l'apparition des transconjugants et des recombinants. Ceci peut s'interpréter de deux façons :

- soit les transferts sont indépendants, le plasmide n'agissant que sur la reconnaissance bactérie donatrice, bactérie réceptrice,
- soit la passage plasmidique s'accompagne d'une très faible mobilisation, l'essentiel du transfert s'effectuant entre bactérie réceptrice transconjugante dérèprimée et les autres  $R^-$ .

Donc, dans tous les cas, une augmentation importante du nombre de transconjugants n'implique pas une recrudescence du taux de recombinants.



Temps de contact	Nombre de Transconjuguants	Nombre de Recombinants	$\Delta(RP_4)/R^+$	$\Delta rec/R^+$
30 mn	$2,8 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$1 \times 10^{-5}$	$9 \times 10^{-6}$
1 h	$7 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$2,3 \times 10^{-5}$	$7,3 \times 10^{-6}$
6 h	$4,8 \times 10^6$	$2,1 \times 10^3$	$6 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-6}$

Tableau 16 : Cinétique de transfert du plasmide  $RP_4$  et du gène tryptophane entre deux souches de Rhizobium meliloti.

Croisement : 2011 ( $RP_4$ ) x 2011  $m_3$  rif.

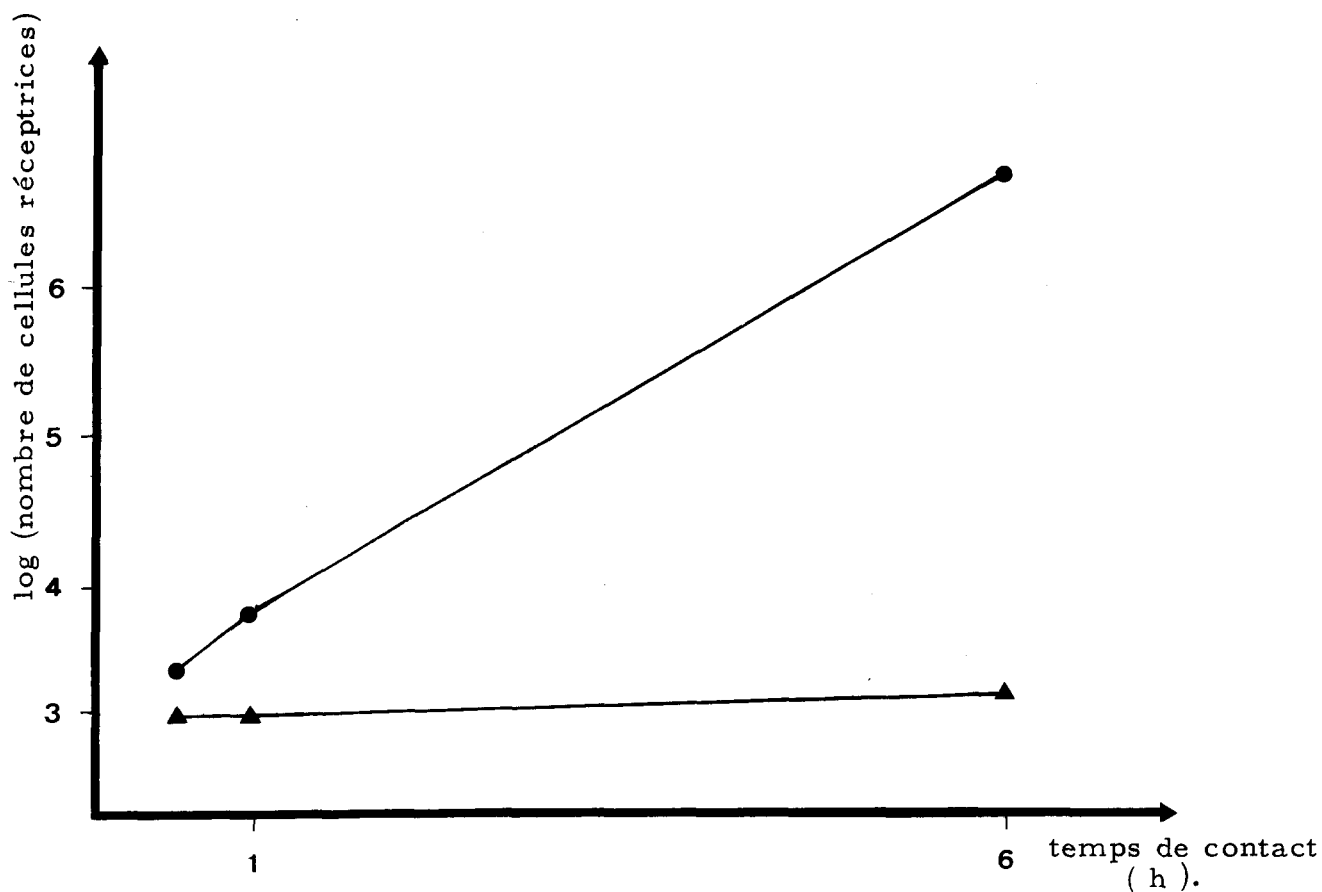


Figure 5 : Cinétique de transfert du plasmide  $RP_4$  et du gène tryptophane entre deux souches de Rhizobium meliloti.

Croisement : 2011 ( $RP_4$ ) x 2011  $m_3$  rif.

● Transconjuguants.

▲ Recombinants.



II - EFFET DE LA PRECULTURE DES BACTERIES R<sup>+</sup> EN PRESENCE DE TETRACYCLINE SUR LE TRANSFERT DES GENES CHROMOSOMIQUES.

L'augmentation du nombre de transconjugants avec la tétracycline correspond en quelque sorte à une dérépression partielle du transfert plasmidique. Si la mobilisation du chromosome par le facteur RP<sub>4</sub> reste constante dans le temps, la tétracycline doit présenter le même effet vis-à-vis de la production de recombinants. En effet, en règle générale, la sélection de plasmides mobilisateurs déréprimés apporte des augmentations notables des fréquences de recombinaison (93).

Cette étude a été effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites pour les transconjugants.

Les résultats (tableau 17) sont exprimés en fréquences calculées par rapport à la bactérie réceptrice et concernent un temps de contact de 6 h. Ils montrent et confirment l'induction du transfert plasmidique par la tétracycline. Par contre, les fréquences de recombinaison pour le gène tryptophane sont voisines et très faibles dans les deux cas.

Les fréquences de recombinaison voisines de  $10^{-7}$  ne peuvent être interprétées comme un transfert de gènes chromosomiques que parce que les témoins donnent les fréquences suivantes :

- . Témoin R<sup>+</sup> : apparition de str rif ;  $6 \times 10^{-10}$
- . Témoin R<sup>-</sup> : réversion sur le caractère tryptophane :  $6 \times 10^{-10}$ .

Condition	Nombre de R <sup>-</sup>	Transconjuguants	Recombinants	Fréquence	
				Rec	Trc
0	$9 \times 10^9$	$2,7 \times 10^8$	$9,5 \times 10^2$	$1 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-2}$
Tc	$7 \times 10^9$	$9,2 \times 10^8$	$7,8 \times 10^2$	$1 \times 10^{-7}$	$13 \times 10^{-2}$

Tableau 17 : Effet de la tétracycline sur la production de transconjuguants et de recombinants . Croisement 2011 (RP<sub>4</sub>) x 2011m<sub>3</sub> rif.

Rec : Recombinants

Trc : Transconjuguants.

Un écart de trois puissances élimine l'interprétation des clônes apparus sur milieu minimum comme des révertants. Ces résultats constituent donc une seconde dissociation entre la formation des transconjuguants et des recombinants. Enfin, l'hypothèse émise vis-à-vis de la dérèpression nous a invitée à examiner la formation de recombinants lors de croisements à trois partenaires.

### III - CROISEMENTS A TROIS PARTENAIRES

Nous avons examiné l'impact du temps de contact pour la souche réceptrice 2011 m<sub>3</sub> rif avec le résultat d'une première conjugaison réalisée entre 2011 m<sub>3</sub> (RP<sub>4</sub>) et 2011. L'utilisation comme souche donatrice de départ de 2011 m<sub>3</sub> (RP<sub>4</sub>) permet d'éliminer les recombinaisons entre cette bactérie et celle susceptible de former des recombinants (2011 m<sub>3</sub> rif). En effet, les auxotrophies portées par ces deux bactéries sont identiques, la recombinaison fait, dès lors, intervenir obligatoirement la souche intermédiaire.

Les résultats ( ) montrent une fois encore que la formation des transconjuguants est fonction du temps alors que le transfert de gènes chromosomiques n'évolue pratiquement plus après 15 mn de contact. La dérèpression affecte donc uniquement le transfert plasmidique, les gènes chromosomiques étant constamment à une fréquence de  $10^{-6}$ .

#### IV - DISCUSSION

En général, il faut noter que les conditions expérimentales qui influent sur la production des transconjuguants n'affectent pas les fréquences de recombinaison. Quelles que soient les conditions expérimentales, la formation de recombinants intervient à une fréquence de  $10^{-6}$ . Ceci confirme les résultats des auteurs (41) et laisse à penser que le rôle du plasmide  $RP_4$  chez Rhizobium meliloti est relativement limité. En effet, BECHET et MAOUI, au laboratoire, ont sous certaines conditions, obtenu des fréquences de transfert voisines ou supérieures sans l'utilisation de plasmides conjugatifs. Rhizobium meliloti posséderait donc un potentiel génétique qui le rendrait capable de conjuguer, le plasmide  $RP_4$  lui offrant la différenciation bactérie mâle, bactérie femelle. Ces études auraient mérité d'être complétées par d'autres mais on se heurte constamment aux problèmes déjà énoncés à savoir :

- des fréquences de recombinaison très faibles
- l'apparition de colonies parasites
- une technologie longue et fastidieuse.

Les résultats obtenus avec ce plasmide conjugatif confirment cependant les travaux de certains auteurs. En particulier, l'absence d'une mobilisation effective par le  $RP_4$  n'a pas permis l'isolement de R prime chez R. leguminosarum (46) alors que le facteur  $R_{6845}$  permet la sélection de bactéries porteuses de tels éléments génétiques.

# Conclusion Générale

## CONCLUSION GENERALE

La première partie de ce travail nous a montré que Rhizobium meliloti est capable de recevoir et d'exprimer les gènes portés par le facteur de résistance  $RP_4$ . Dans la plupart des cas, la formation de transconjugants peut s'effectuer en milieu liquide à partir de la souche d'Escherichia coli J53 ( $RP_4$ ). Par contre, la conjugaison entre deux souches de Rhizobium nécessite un support solide (milieu gélosé ou membrane filtrante). De même, les transconjugants  $M_5N_1$  ( $RP_4$ ) ne peuvent être obtenus en milieu liquide, leur production se fait, par ailleurs, à des fréquences plus faibles que celles obtenues avec les autres souches de Rhizobium dans les mêmes conditions. Le rôle des pili a été confirmé, en effet, l'homogénéisation des bactéries donatrices provoque une diminution de l'efficacité de transfert. Ce rôle est toutefois limité, en effet, d'une part la conjugaison en milieu liquide nécessite des conditions statiques et, d'autre part, les fréquences de transfert obtenues en milieu solide ne sont pas fortement affectées par l'agitation mécanique des bactéries donatrices.

L'obtention d'une saturation à 1 p. cent de transconjugants par rapport aux cellules réceptrices nous a montré que la régulation du transfert est très stricte et ne permet jamais une infection totale. Cette propriété n'est pas une caractéristique du Rhizobium, le même phénomène étant observé lors de croisements entre deux souches d'E. coli. Par contre, les mécanismes semblent faire intervenir plusieurs paramètres dépendant des propriétés physiologiques et génétiques de deux partenaires et du plasmide. Si ces régulations font intervenir un état de compétence, celui-ci affecte les deux cellules. En effet, tous les résultats indiquent que l'état de compétence de la cellule R<sup>-</sup>

n'intervient pas seul dans les régulations. L'hypothèse d'une ségrégation très rapide du  $RP_4$  n'est pas vraisemblable, en effet, l'augmentation des temps de contact ne modifie pas les fréquences de transfert du plasmide.

Les mécanismes mettent également en jeu les régulations propres au  $RP_4$ . L'addition de tétracycline (antibiotique dont la résistance est portée par l'élément plasmidique) à une culture de bactéries donatrices stimule les propriétés de transfert de ces cellules. Ce phénomène parfaitement reproductible peut être assimilé à une faible dérèpression de l'ensemble des gènes portés par le plasmide. La régulation du transfert par cet antibiotique a également été mise en évidence, chez *Bactéroïdes*, chez qui le facteur de résistance n'est transférable qu'après plusieurs générations en présence de tétracycline. En plus, de l'intérêt fondamental apporté par ces études, les régulations par la tétracycline posent un problème médical, le traitement par une telle substance provoquant une dissémination des caractères de résistance à travers toute la faune intestinale. Dans le cas du  $RP_4$ , les mécanismes sont différents dans le sens que la régulation ne subit pas la loi de tout ou rien. Toutefois, il nous a semblé intéressant de voir l'effet de la tétracycline sur la production de recombinants chez *R. meliloti*. Les résultats montrent une dissociation nette entre les deux types de transfert. En ce qui concerne la tétracycline, l'augmentation du nombre de transconjuguants ne s'accompagne pas d'un effet comparable vis-à-vis des recombinants. La "dérèpression" du transfert plasmique n'affecte donc pas la mobilisation du chromosome. Les mêmes constatations peuvent être faites avec les cinétiques d'apparition, en effet, il semble que les fréquences de recombinaison restent constantes après environ 1 h de contact.

Enfin, la dérégulation qui semblait être effective lors de la réalisation de croisements à trois partenaires n'est visible que sur le nombre de transconjuguants et n'affecte pas les fréquences de recombinaison.

En conclusion, il semble que le rôle du plasmide RP<sub>4</sub> dans la conjugaison chez Rhizobium est différent de celui décrit habituellement. Plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- le plasmide aurait pour rôle de fournir une polarité aux croisements, à savoir de permettre la reconnaissance cellule donatrice, cellule réceptrice et de permettre ainsi l'injection orienté du chromosome.
- le plasmide aurait la possibilité, grâce à des séquences homologues, de provoquer pour une intégration transitoire la linéarisation du chromosome, cette condition semblant indispensable à la conjugaison
- la mobilisation du chromosome serait fonction des conditions physiologiques de la cellule donatrice, et non pas une propriété propre au plasmide.

NB : En marge de ce travail, nous avons collaboré à une étude de l'utilisation du lactose chez Rhizobium meliloti (94) ayant fait l'objet d'une publication soumise au Journal of General Microbiology (95).



# Bibliographie

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) DART P. J. (1974) The infection process. The Biology of nitrogen fixation (A. Quispel, Editor) *Frontiers of Biology*, 33 : 381 -429.
- (2) DIXON R. O. D. (1969) Rhizobia. *Ann. Rev. Microbiol.*, 23 : 137-158.
- (3) LJUNGGREN H. (1969) Mechanism and pattern of Rhizobium invasion into leguminous root hairs. *Physiol. Plant.*, Suppl. V : 1 - 82.
- (4) VINCENT J. M. (1974) Root nodule symbioses with Rhizobium. The biology of nitrogen fixation (A. Quispel, Editor) *Frontiers of Biology*, 33, 265-341.
- (5) DAZZO F. B. and HUBBELL (1975) Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the Rhizobium clover association. *Appl. Microbiol.*, 30 : 1017-1033
- (6) WOLPERT J. S., ALBERSHEIM P. (1976). Host-symbiont interactions. I. The lectins of legumes interact with the O -antigen-containing lipopolysaccharides of their symbiont Rhizobia. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 70 : 729-737.
- (7) SANDERS R. E., CARLSON R. W. and ALBERSHEIM P. (1978) A Rhizobium mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion. *NATURE* - 271 : 240-242.
- (8) CUTTING J. A. and SCHULMAN H. M. (1971) The biogenesis of leghemoglobin. The determinant in the Rhizobium -legume symbiosis for leghemoglobin specificity. *Biochim. Biophys. Acta*, 229 : 58-62.
- (9) KEISTER D. L. (1975) Acetylen reduction by pure cultures of Rhizobia *J. Bacteriol.*, 123 : 1265-1268.
- (10) HIGASHI S. (1967) Transfer of clover infectivity of Rhizobium trifolii to Rhizobium phaseoli as mediated by an episomic factor. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 13 : 391-403.
- (11) KRSMANOVIC S. et WERQUIN M. (1973). Etude des bactériophages de Rhizobium meliloti. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, série D, 2745.
- (12) NIEL C. (1975). Etude de la mutagénèse chez Rhizobium meliloti. Diplôme d'Etudes Approfondies (Université des Sciences et Techniques de Lille).

- (13) ADELBERG E. A., MANDEL M. and CHEN G. C. C. (1965). Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl- N' nitro - N - nitrosoguanidine in Escherichia coli K 12. Biochem. Biophys. Res. Comm., 18: 788-795.
- (14) KLAPWIJK P. M., JONGE A. J. R., SCHILPEROORT R. A. and RÖRSCH A.(1975). An enrichment technique for auxotrophs of Agrobacterium tumefaciens using a combination of carbenicillin and lysozyme. J. Gen. Microbiol., 91 : 177-182.
- (15) LORKIEWICZ Z. and MELKE A. (1970). Infectiveness of the histine dependant mutant of Rhizobium trifolii . Acta Microbiol. Polon., ser. A, 2 : 75-77.
- (16) SANDERS R. E., CARLSON R. W. and ALBERSHEIM P. (1978). A Rhizobium mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion. Nature , 271 : 240-242.
- (17) COURTOIS B. (1975). Etude des polyosides de Rhizobium. Thèse de 3ème Cycle -(Université des Sciences et Techniques de Lille).
- (18) WULLSTEIN L. H., BRUENING M. L., WULLSTEIN B. M. and SHERWOOD M. (1975). Isolation and partial characterisation of DNA in capsular preparations of Rhizobium trifolii. Physiol. Plant., 35 : 129-134.
- (19) DENARIE J. (1969). Une mutation provoquant l'auxotrophie pour l'Adénine et la perte du pouvoir fixateur d'azote chez Rhizobium meliloti. Compt. Rend. Acad. Sci., Série D, 269 : 2464.
- (20) HENDRY G. S. and JORDAN D. C. (1969) Ineffectiveness of viomycin-resistant mutants of Rhizobium meliloti. Can. J. Microbiol., 15 : 671-675.
- (21) BALASSA G.(1963). Genetic transformation of Rhizobium. Bacteriological Reviews, 27 : 228-241.
- (22) BALASSA R. (1960). Transformation of a strain of Rhizobium lupini Nature , 188 : 246-247.
- (23) BALASSA R. and GABOR M. (1961). Transformation in nodule bacteria. Mikrobiologiya, 30 : 396-400.
- (24) BALASSA R. and GABOR M. (1965). Transformation of streptomycin markers in rough strains of Rhizobium lupini . Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 11 : 330-337.
- (25) MARECKOVA H.(1969). Transformation in Rhizobium japonicum . Archiv. Mikrobiol., 68 : 113-115.

- (26) ZELAZNA-KOWALSKA I. and LORKIEWICZ (1971). Transformation in Rhizobium trifolii : VI. Correlation between streptomycin resistance and infectiveness in Rhizobium trifolii Acta Microbiol. Polon. Ser A, 3 : 11-20.
- (27) ELLIS J. , KALZ G. G. and DONCASTER J. J. (1962). Transformation in Rhizobium trifolii. Can. J. Microbiol. , 8 : 835-840.
- (28) RAINA J. L. and MODI (1972). Deoxyribonucleate binding and transformation in Rhizobium japonicum. J. Bacteriol. , 111 : 356-360.
- (29) DANDEKA A. M. , VASAVADA H. A. and MODI (1978). Partial Purification of a competence factor from Rhizobium Japonicum. Arch. Microbiol. , 118 : 253-256.
- (30) KOWALSKI M. (1966). Transduction in Rhizobium meliloti. Microbial genetics Bulletin, 25 : 9-10.
- (31) KOWALSKI M. (1968). Transduction of streptomycin resistance by Rhizobium meliloti phages. Microbial. genetics Bulletin, 29 : 16.
- (32) KOWALSKI M. (1971). Transduction in Rhizobium meliloti Plant and Soil, Special volume : 63-66.
- (33) SIK T. and OROSZ I. (1971) . Chemistry and genetics of Rhizobium meliloti phage 16-3. Plant and Soil, Special volume : 57-62.
- (34) KOWALSKI M. and DENARIE J. (1972). Transduction d'un gène contrôlant l'expression de la fixation de l'azote chez Rhizobium meliloti. Compt. Rend. Acad. Sci. , Série D, 275 : 141-144.
- (35) BOSE P. and VENKATARAMAN G. S. (1969). Recombination in Rhizobium leguminosarum. Experientia, 25 : 772.
- (36) HEUMANN W. (1968). Conjugation in star forming Rhizobium lupini. Mol. Gen. Genet. , 102 : 132-144.
- (37) HEUMANN W. , PUHLER A. and WAGNER E. (1971). The two transfer regions of the Rhizobium lupini conjugation . I Fertility transfer factor elimination and one way transfer . Mol. Gen. Genet. , 113 : 308-315.
- (38) HEUMANN W. , MAYER F. and PUHLER A. (1970). Conjugation in star forming bacteria. Abstracts. First International Symposium Genetics of Industrial Microorganisms. Prague, p. 322.
- (39) BECHET M. (1973). Diplôme d'Etudes Approfondies - Université des Sciences et Techniques de Lille.

- (40) MAOUI K. (1977). Recherches sur la conjugaison chez Rhizobium meliloti. Diplôme d'Etudes Approfondies - Université des Sciences et Techniques de Lille.
- (41) MEADE and SIGNER E. (1977). Genetic mapping of Rhizobium meliloti. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 74 : 2076-2078.
- (42) BERINGER J. E. and HOPWOOD D. A. (1976). Chromosomal recombination and mapping in Rhizobium leguminosarum Nature, 264 : 291-293.
- (43) PUHLER H., BURKARDT J. and HEUMANN W. (1972). Genetic experiments with the Pseudomonas aeruginosa R factor RP<sub>4</sub> in Rhizobium lupini. J. Gen. Microbiol., 73 : 26.
- (44) HEUMANN W. und MARX R. (1964). Feinstruktur und funktion der fimbrien bei dem sternbildenden Bakterium Pseudomonas echninoides. Arch. Mikrobiol., 47 : 325-337.
- (45) PUHLER A. and BURKARDT H. J. (1978). Fertility inhibition in Rhizobium lupini by the resistance plasmid RP<sub>4</sub>. Mol. Gen. Genet., 162 : 163 - 171.
- (46) JOHNSTON A. W. B., SETCHELL S. M. and BERINGER J. (1978). Interspecific crosses between Rhizobium leguminosarum and R. meliloti : Formation of Haploid recombinants and of R-primes. J. Gen. Microbiol., 104 : 209-218.
- (47) SCAIFE J. (1967) Episomes . Ann. Rev. Microbiol., 21 : 601-638.
- (48) NOVICK R., CLOWES R., COHEN S., CURTISS III R., DATTA N., and FALKOW S. (1976). Uniform nomenclature for bacterial plasmids : a proposal. Bacteriological Reviews, 40 : 168-189.
- (49) WORCEL A. and BURGI E. (1972). On the structure of the folded chromosome of Escherichia coli . J. Mol. Biol., 71 : 127-147.
- (50) CLOWES R. (1972). Molecular structure of bacterial plasmids. Bacteriological Reviews, 36 : 361 -405.
- (51) NUTI M. P., LEDEBOER A. M., LEPIDI A. A. and SCHILPEROORI R. A. (1977). Large plasmids in different Rhizobium species. J. Gen. Microbiol., 100 : 241-248.

- (52) KLEIN G. E. , JEMISON R. A. and MATTHYSSE A. G. (1975)  
Physical evidence of a plasmid in Rhizobium japonicum.  
Experientia, 31 : 532-533.
- (53) BECHET M. et GUILLAUME J. B. (1978) . Mise en évidence  
d'ADN extrachromosomique chez Rhizobium meliloti. Can J.  
Microbiol. , 24 : 960-966.
- (54) WATANABE T. , NISHIDA H. , OGATA C. , ARAI T. and SATO S.  
(1964). Episome mediated transfer of drug resistance in  
Enterobacteriaceae. VII. Two types of naturally occurring R factor.  
J. Bact. , 88 : 716-726.
- (55) WATANABE T. (1967). Infections drug resistance. Sci. Amer.  
219 : 19
- (56) DATTA N. and HEDGES R. W. (1971). Compatibility groups among  
fi<sup>-</sup> R factors. Nature, 234 : 222.
- (57) CHABBERT Y. A. , SCAVIZZI M. R. , WITCHITZ J. L. , GERBAUD G. R.  
and BOUANCHAUD D. H. (1972). Incompatibility groups and the clas-  
sification of fi<sup>-</sup> resistance factors. J. Bacteriol. 112 : 666-675.
- (58) BRADLEY D. E. (1972) Shortening of a Pseudomonas aeruginosa pili  
after RNA phage adsorption. J. Gen. Microbiol. , 72 : 303-319.
- (59) OLSEN R. H. and SHIPLEY P. (1973) . Host range and properties of  
the Pseudomonas aeruginosa R factor R1822. J. Bacteriol. , 113 :  
772-780.
- (60) BRADLEY D. E. (1974). Adsorption of bacteriophages specific for  
Pseudomonas aeruginosa R factors RP<sub>1</sub> and R 1822. Biochem.  
Biophys. Res. Comm. , 57 : 893-900.
- (61) SAUNDERS J. R. and GRINSTED J. (1972). Properties of RP<sub>4</sub> an R fac-  
tor which originated in Pseudomonas aeruginosa S8. J. Bacteriol. ,  
112 : 690-696.
- (62) TOWNER K. J. and VIVIAN A. (1976). RP<sub>4</sub> mediated conjugation in  
Acinetobacter calcoaceticus. J. Gen. Microbiol. , 93 : 355-360.
- (63) MILLER L. and KAPLAN S. (1978). Plasmid transfer and expression  
in Rhodopseudomonas sphaeroides. Arch. Biochem. Biophys. , 187 :  
229-234.
- (64) DENNISON S. and BAUMBERG S. (1975). Conjugational behaviour of  
N plasmids in Escherichia coli K<sub>12</sub>. Mol. Gen. Genet. , 138 : 323 -  
331.
- (65) BARTH P. T. , GRINTER N. J. and BRADLEY D. E. (1978). Conjugal  
transfer system of plasmid RP<sub>4</sub> : Analysis by transposon 7 insertion.  
J. Bacteriol. , 133 : 43-52.

- (66) BARTH P. T. and GRINTER N. J. (1977). Map of plasmid  $RP_4$  derived by insertion of transposon C. *J. Mol. Biol.*, 113: 455-474.
- (67) JACOB F. and WOLLMAN E. L. (1961). Sexuality and the genetics of bacteria. Academic Press, Ed. New York and London.
- (68) CURTISS R. (1964). A stable partial diploid strain of Escherichia coli. *Genetics*, 50 : 679-694.
- (69) CURTISS R. and RENSHAW J. (1965). Fertility factor attachment in  $F^+$  strains of Escherichia coli. *Genetics*, 52 : 438-439.
- (70) CURTISS R. and STALLIONS D. R. (1969). Probability of F integration and frequency of stable Hfr donors in  $F^+$  populations of Escherichia coli K<sub>12</sub>. *Genetics*, 63 : 27-38.
- (71) CURTISS R. and RENSHAW J. (1969). Kinetics of F transfer and recombinant production in  $F^+ \times F^-$  matings in Escherichia coli K<sub>12</sub>. *Genetics*, 63 : 39-52.
- (72) MEYNELL E. and DATTA N. (1966). The relation of resistance transfer factors to the F factor of Escherichia coli K<sub>12</sub>. *Genet. Res.*, 7 : 134-140.
- (73) COOKE M. and MEYNELL E. (1969). Chromosomal transfer mediated by de-repressed R factors in  $F^-$  Escherichia coli K<sub>12</sub>. *Genet. Res.*, 14 : 79-87.
- (74) CAMPBELL A. M. (1962). Episomes. *Advan. Genet.*, 11 : 101-145.
- (75) STANISICH V. A. and HOLLOWAY B. W. (1971). Chromosome transfer in Pseudomonas aeruginosa mediated by R factors. *Genet. Res.*, 17 : 169-172.
- (76) OLSEN R. H. and GONZALEZ C. (1974). Escherichia coli gene transfer to unrelated bacteria by a histidine operon -  $RP_1$  drug resistance plasmid complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 59 : 377 - 385.
- (77) DUNICAN L. K. and TIERNEY A. B. (1974). Genetic transfer of nitrogen fixation from Rhizobium trifolii to Klebsiella aerogenes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 57 : 62-72.
- (78) CHILTON M., FARRAND S., LEVIN R. and NESTER E.  $RP_4$  promotion of transfer of a large Agrobacterium plasmid which confers virulence. *Genetics*, 83 : 609-618.

- (79) TOWNER K. J. and VIVIAN A. (1976). RP<sub>4</sub> fertility variants in Acinetobacter calcoaceticus. Genet. Res., 28 : 301-306.
- (80) JOHNSTON A. W. B. and BERINGER J. (1977). Chromosomal recombination between Rhizobium species. Nature, 267 : 611-613.
- (81) MEADE H. M. and SIGNER E. R. (1977). Genetic mapping of Rhizobium meliloti. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 74 : 2076-2078.
- (82) KONDOROSI A., KISS G. B., SORRAI T., VINCZE E. and DANSALVI Z. (1977). Circular linkage map of the Rhizobium meliloti chromosome. Nature, 268 : 525-527.
- (83) HOLLOWAY B. W. (1978). Isolation and characterisation of an R'plasmid in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol., 133 : 1078-1082.
- (84) LEDERBERG J. and LEDERBERG E. M. (1952). Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol., 63 : 399-406.
- (85) BECHET M. (1979) Recherches sur l'acide desoxyribonucléique de Rhizobium meliloti. Thèse de 3ème Cycle. Université des Sciences et Techniques de Lille.
- (86) HORNEZ J. P., COURTOIS B. et DERIEUX J. C. (1976). Mise en évidence de voies du métabolisme différentes à partir du glucose et du fructose chez Rhizobium meliloti. Comp. Rend. Acad. Sci. Série D, 1559-1562.
- (87) OLSEN R. H., SLAK J. and GRAY R. H. (1974). Characteristics of PRD<sub>1</sub>, a plasmid dependant broad host range DNA bacteriophage. J. Vir., 14 : 689-699.
- (88) WERQUIN M. (1972). Aspects de l'appariement et rôle des pili au cours des premières étapes de la conjugaison chez Escherichia coli K<sub>12</sub>. Thèse de 3ème Cycle. Université des Sciences et Techniques de Lille.
- (89) GUILLAUME J. B., TERRIEN M. F., KUSNIERZ J. P. et MARTIN G. Recherches des conditions optimales de la conjugaison bactérienne chez Escherichia coli K<sub>12</sub>. Ann. Inst. Pasteur Lille, XXI : 15-24
- (90) KUSNIERZ J. P. Etude des variations physiologiques chez Escherichia coli K<sub>12</sub> pendant la conjugaison. Thèse d'Etat - Université des Sciences et Techniques de Lille.
- (91) PRIVITERA G., SEBALD M. and FAYOLLE F. (1979). Common regulatory mechanism of expression and conjugative ability of a tetracycline resistance plasmid of Bacteroides fragilis. Nature, 278 : 657-659.



- (92) BERINGER J.E. (1973). Genetic studies with Rhizobium leguminosarum. Thesis for the degree of Doctor. University of East Anglia.
- (93) GRINDLEY N.D., GRINDLEY J.N., SMITH H.R. and ANDERSON E.S. (1973). Characterisation of derepressed mutants of an F like R factor. Mol. Gen. Genet., 120 : 27-34.
- (94) NIEL C., GUILLAUME J.B. et BECHET M. (1977). Mise en évidence de deux enzymes présentant une activité B-galactosidasique chez Rhizobium meliloti. Can. J. Microbiol., 23 : 1178-1181.
- (95) NIEL C., DELMAERE F. and GUILLAUME J.B. (1979). An inducible B-galactosidase and a B-glucosidase with B-galactosidase activity in Rhizobium meliloti soumis à J. Gen. Microbiol.

