

50376
1979
64
N° d'ordre : 751

50376
1979
64

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spécialité : Biochimie

Mention : Microbiologie

par

Max BECHET

RECHERCHES SUR
L'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE
DE RHIZOBIUM MELILOTI



Soutenu le 29 Mars 1979, devant la COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury : MM. J. GUILLAUME, Président

J. KREMBEL, Rapporteur

G. MARTIN, Examineur

C. BONNIER, Examineur

A LA MEMOIRE DE MON PERE

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Microbiologie à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I, sous la direction de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME. Nous le remercions des conseils éclairés et des encouragements qu'il nous a prodigués tout au long de ce travail ainsi que des facilités qu'il nous a accordées pour sa réalisation. Nous tenons à lui exprimer toute notre gratitude et notre profond respect.

Nous avons toujours été bien accueilli dans le Laboratoire de Monsieur le Professeur J. KREMBEL et nous le remercions bien vivement d'avoir accepté d'être le Rapporteur de cette thèse.

Nous sommes reconnaissant à Monsieur le Professeur G. MARTIN pour l'amabilité avec laquelle il a bien voulu accepter de juger ce travail.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Monsieur le Recteur C. BONNIER de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux qui nous fait l'honneur de faire partie de notre Jury.

Nous remercions nos Collègues des Laboratoires de Microbiologie et de Physiologie Végétale pour leur amicale collaboration ainsi que Madame MAËS pour son aide précieuse. Nous les assurons de toute notre sympathie.

Enfin, que ceux dont l'affection ou l'amitié nous ont soutenu et encouragé trouvent ici l'expression de notre reconnaissance.

Table des Matières

AVANT-PROPOS.....	1
GENERALITES.....	5
I La symbiose <u>Rhizobium</u> -Légumineuse.....	5
II Le problème du nombre et du support moléculaire des gènes participant à la symbiose.....	9
1) Les gènes.....	9
2) Localisation.....	11
MATERIEL ET METHODES.....	17
I Souches bactériennes.....	17
II Milieux de culture.....	17
1) <u>R. meliloti</u>	17
2) <u>R. trifolii</u>	19
3) <u>E. coli</u>	19
III Marquage de l'ADN.....	20
1) <u>R. meliloti</u> et <u>R. trifolii</u>	20
2) <u>E. coli</u>	21
IV Extraction et purification de l'ADN.....	22
1) Méthode de MARMUR.....	22
2) Gradients préparatifs d'ADN.....	23
3) A partir de nodules sur racines de luzerne.....	23
V Méthodes de lyse douce des cellules.....	24
1) Lyse neutre.....	24
2) Lyse alcaline.....	24
VI Analyse de l'ADN par ultracentrifugation.....	25
1) Gradients neutres de chlorure de césium.....	25
2) Gradients de CsCl en présence de bromure d'éthidium.....	25
3) Gradients de sulfate de césium en présence d'ions argent.....	25

4) Gradients alcalins de saccharose	25
5) Collecte et analyse des gradients	26
VII Détermination de la résistance aux antibiotiques (antibiogramme)	27
VIII Essais d'élimination des plasmides	27
IX Tests d'infectivité et d'efficience	28
RESULTATS	29
I Détermination de la densité apparente de l'ADN de la bactérie libre et du bactéroïde (souche 2011 str 3)	29
1) Principe	29
2) Centrifugation en gradient de CsCl de l'ADN de la souche 2011 str 3 (bactérie libre et bactéroïde)	30
II Recherche d'une méthode convenable de lyse douce des cellules de <u>R. meliloti</u>	31
III Mise en évidence de plasmides	34
1) Centrifugation en gradients alcalins de saccharose	34
a - Principe	34
b - Recherche de plasmides chez <u>R. meliloti</u>	36
2) Détection de plasmides en gradients de CsCl - bromure d'éthidium	45
a - Principe	45
b - Application aux lysats neutres de <u>R. meliloti</u>	46
3) Recherche de résistance aux antibiotiques	49
4) Essais d'élimination par des agents curatifs	49
IV Analyse de l'ADN en gradients de Cs ₂ SO ₄ après fixation d'ions Ag ⁺	50
1) Principe	50

2) Analyse de l'ADN purifié de R. meliloti.....51

DISCUSSION.....57

BIBLIOGRAPHIE

Avant - Propos

Depuis la montée vertigineuse des coûts de l'énergie pendant les cinq dernières années, le problème du prix de revient des engrais, en particulier des engrais azotés, se pose avec une acuité croissante. En effet, le principe du procédé commercial de la fabrication de l'ammoniac n'a pas changé depuis sa mise en exploitation en 1913 : il consiste en la combinaison par voie chimique des deux gaz azote et hydrogène, à une pression et à une température élevées, en présence de fer comme catalyseur. On estime que la quantité totale d'énergie nécessaire pour la production mondiale de fertilisateurs ammoniacés est de l'ordre de deux millions de barils de pétrole par jour (82).

Ces engrais sont actuellement très satisfaisants pour leur contribution à la protéogenèse végétale, mais ils sont malheureusement lessivés par les eaux de pluie après un certain temps et atteignent des profondeurs où ils ne sont plus accessibles par les plantes et où ils risquent de polluer à long terme.

Face à ce problème agricole et énergétique important en particulier pour les nations du Tiers Monde, se pose la question de l'exploitation de sources d'énergie nouvelles mais une seule alternative paraît utilisable : le développement et l'emploi intensif de la fixation biologique de l'azote atmosphérique, lequel est pratiquement inépuisable. La quantité annuelle d'azote assimilé par cette voie est actuellement évaluée à 150-175 millions de tonnes.

Dans la nature, la fixation de l'azote est un privilège absolu des procaryotes : algues bleues-vertes (Anabeana azollae, Nostoc muscorum..)

ORGANISME OU SYSTEME	AZOTE FIXE EN KG PAR HECTARE ET PAR ANNEE
=====	
Légumineuses	
<u>Glycine</u> (<u>Rhizobium japonicum</u>)	57 - 94
<u>Lupinus</u> (<u>Rhizobium lupini</u>)	150 - 169
<u>Medicago</u> (<u>Rhizobium meliloti</u>)	128 - 600
<u>Trifolium</u> (<u>Rhizobium trifolii</u>)	104 - 160
<u>Vigna</u> (<u>Rhizobium</u> du "cowpea group")	84
Plantes nodulées autres que Légumineuses	
<u>Alnus</u> (<u>Frankia alni</u>)	40 - 300
<u>Ceanothus</u> (<u>Frankia ceanothi</u>)	60
<u>Coriaria</u> (<u>Frankia coriariae</u>)	150
<u>Hippophae</u> (<u>Frankia elaeagni</u>)	2 - 179
Associations plantes - algues	
<u>Azollas</u> (<u>Anabeana azollae</u>)	313
<u>Gunnera</u> (<u>Nostoc muscorum</u>)	12 - 21
<u>Lichens</u>	39 - 84
Microorganismes réduisant l'azote à l'état libre	
Algues bleues-vertes	25
<u>Azotobacter</u>	0,3
<u>Clostridium pasteurianum</u>	0,1 - 0,5



TABLEAU I : Estimation des rendements de la fixation biologique de l'azote, d'après EVANS et BARBER (34) ; entre parenthèses, les microorganismes associés aux plantes supérieures.

et un nombre restreint d'espèces bactériennes. Certaines de ces dernières le font à l'état libre : Azotobacter vinelandii, Clostridium pasteurianum, Klebsiella pneumoniae, Rhodospirillum rubrum ; une, Citrobacter freundii, est associée à un insecte, le termite ; d'autres le sont avec des végétaux supérieurs : parmi celles-ci, les plus importantes sont les Rhizobium qui entrent en symbiose avec les plantes de la famille des Légumineuses, ceci étant concrétisé par l'apparition de nodules sur les racines ; ces relations ont été très étudiées depuis deux décennies. Il est à noter que des plantes autres que les Légumineuses peuvent être associées à des bactéries du genre Frankia (exemple : symbiose Frankia alni - Alnus, conduisant à la formation de nodules racinaires) ou Spirillum lipoferum, qui se développe à la surface des racines de Digitaria.

L'importance de la symbiose Rhizobium-Légumineuse est primordiale pour l'avenir de l'agriculture mondiale : elle est considérée comme étant responsable de la moitié de l'azote fixé par voie biologique, soit à peu près 80 millions de tonnes par an, ceci compte-tenu de sa répartition géographique. Le reste est effectué par les autres symbioses ainsi que par les microorganismes fixateurs libres. En ce qui concerne ces derniers, si on se réfère au Tableau I, on constate que la proportion de l'azote réduit par ceux-ci paraît négligeable par rapport aux associations symbiotiques, d'autant plus que les dérivés azotés qu'ils rejettent dans le sol sont sujets au lessivage par les eaux.

Notre travail entre dans le cadre d'une étude génétique de la symbiose Rhizobium-Légumineuse et en particulier concerne l'emplacement des gènes bactériens intervenant dans l'établissement et le déroulement des processus symbiotiques.

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, nous présentons une étude bibliographique comportant deux parties distinctes :

- les évènements génétiques de la symbiose, en analysant la contribution du partenaire bactérien lors des étapes successives de cette symbiose.

- le support physique des gènes bactériens impliqués dans ces processus et en particulier le problème de l'existence de plasmides chez les différentes espèces de Rhizobium.

Généralités

I LA SYMBIOSE RHIZOBIUM - LEGUMINEUSE

Celle-ci s'établit de façon complexe en plusieurs étapes à présent bien connues et qui ont fait l'objet de nombreuses revues (24 , 30 , 36 , 61) ; par contre, les mécanismes de régulation génétique qui interviennent de la part des deux partenaires ne sont pas encore mis à jour.

La première étape de cette symbiose consisterait en l'attraction des Rhizobium indigènes dans la rhizosphère par des exsudats racinaires dont le principe actif serait une glycoprotéine d'un poids moléculaire proche de 60 000 : ce processus est qualifié de "chimiotactisme" (20), mais paraît un phénomène non spécifique qui n'est pas en relation directe avec la nodulation (19).

Ceci est suivi d'une croissance et d'une courbure des poils racinaires, ce qui se produit typiquement et uniquement en présence du Rhizobium infectieux; on a d'abord pensé que l'agent causal était l'acide indolyl-acétique provenant du métabolisme du tryptophane par la bactérie, mais des études récentes ont montré que ceci était dû à un (ou plusieurs) facteur(s) contenu(s) dans des filtrats cellulaires de Rhizobium, extrêmement actif(s) et diffusable(s) , d'un poids moléculaire voisin de 5000 (61,85).

ESPECES	PLANTES - HOTES
<u>Rhizobium</u> à croissance rapide	
<u>R. leguminosarum</u>	<u>Pisum, Cicer, Lens, Vicia,</u> <u>Lathyrus</u>
<u>R. meliloti</u>	<u>Medicago, Melilotus,</u> <u>Trigonella</u>
<u>R. phaseoli</u>	<u>Phaseolus</u>
<u>R. trifolii</u>	<u>Trifolium</u>
<u>Rhizobium</u> à croissance lente	
<u>R. japonicum</u>	<u>Glycine</u>
<u>R. lupini</u>	<u>Lupinus, Ornithopus</u>
<u>Rhizobium</u> du "cowpea group" (groupe hétérogène)	<u>Arachis, Lotus, Vigna ...</u>

TABLEAU II : Les différents groupes d'inoculation Rhizobium-Légumineuse, d'après VINCENT (96).

Lorsque la courbure des poils absorbants est achevée, un contact étroit entre ceux-ci et les bactéries doit se faire ; ce mécanisme est complexe du fait de la spécificité d'hôte : en effet, les Rhizobium sont classés en 7 groupes d'inoculation (Tableau II).

On observe un attachement polaire des cellules par rapport à la paroi du poil absorbant (27), ce qui serait en relation avec des lectines qui sont des protéines végétales spécifiques aux propriétés antigéniques. DAZZO et HUBBELL (26) ont détecté des antigènes à réaction croisée à partir des racines de trèfle et de Rhizobium trifolii, celui de la bactérie a été extrait et caractérisé : il s'agirait d'un hétéropolyside acide, impliqué également dans la déformation des poils racinaires.

Une lectine a été isolée du trèfle et appelée trifoline, elle ferait office de lien entre les deux partenaires de la symbiose, comme le montre la figure 1 :

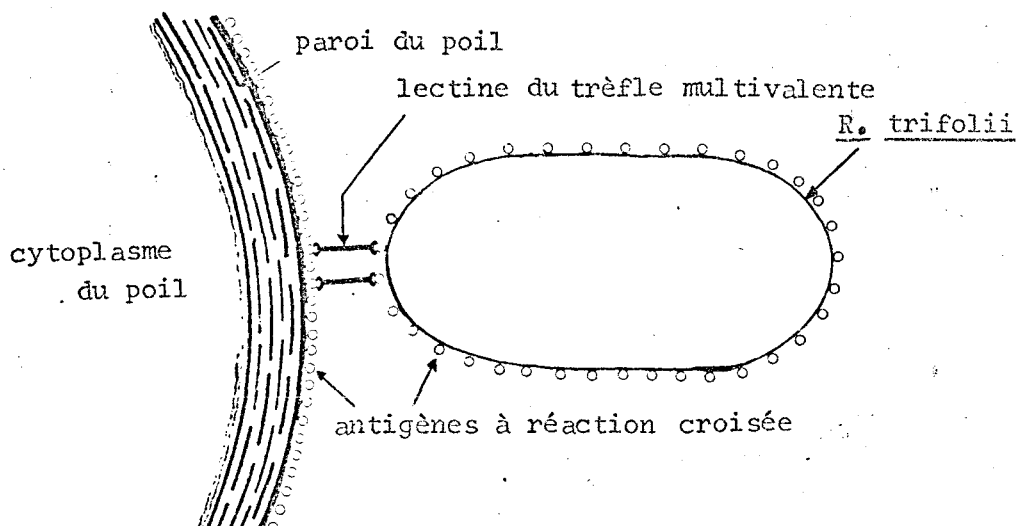


Figure 1 : L'hypothèse de la relation lectine-spécificité d'hôte d'après DAZZO et HUBBELL (26).

Ces auteurs ont conclu que l'interaction d'un antigène somatique de Rhizobium et d'une lectine végétale déterminait la spécificité symbiotique ; ceci est controversé par d'autres chercheurs qui ne constatent qu'une adsorption non spécifique (14, 67, 78).

Après ce problème, se pose celui de l'effraction des poils absorbants et de l'induction du cordon infectieux par lequel les bactéries cheminent dans le tissu végétal. Quels sont les facteurs responsables de cette infectivité ?

L'accumulation de composés actifs à un site très localisé du poil absorbant peut être l'impérieuse nécessité pour le démarrage d'un cordon infectieux.

Diverses hypothèses ont été avancées :

- production de microfibrilles de cellulose par le Rhizobium, qui pourraient favoriser son établissement à l'intérieur de la paroi cellulaire végétale, comme première étape d'un processus d'invagination de celle-ci (71).
- pénétration de "swarmers" coccoïdes (formes très jeunes de la bactérie) à travers un treillis fibrillaire cellulosique de la paroi végétale (23).
- induction d'une polygalacturonase, enzyme pectique qui pouvait être synthétisée par la bactérie ; cependant, la formation et l'activation d'une telle enzyme par la plante, conséquences d'une stimulation bactérienne, paraissent plus plausibles (35). L'augmentation des niveaux de cellulase et de β -1,3-glucannase a été également constatée après addition d'acide indolyl-acétique (25). On a pensé que l'exopolyoside excrété par la bactérie était l'agent inducteur de l'activité de la polygalacturonase (60), ce qui est possible puisque des mutants non muqueux de Rhizobium leguminosarum perdent leur pouvoir infectieux (80). Cependant, la préparation d'exopolyoside pouvait être contaminée par de l'ADN ; en effet, WULLSTEIN et collaborateurs (102) ont détecté de l'ADN dans le polyoside extracellulaire de R. trifolii, cet ADN étant synthétisé "de novo".

Lorsque les bactéries ont pénétré dans le poil absorbant, elles se multiplient et cheminent entre les cellules formant le "cordon infectieux",

puis atteignent les cellules végétales tétraploïdes. On pense que la division de ces dernières a été stimulée par un facteur du genre kinétine provenant du Rhizobium (91). A ce moment, les bactéries sont libérées dans le cytoplasme des cellules-hôtes où elles se différencient en une forme caractéristique, le bactéroïde, qui est entouré d'une cytomembrane de séquestration d'origine végétale.

Dans ces bactéroïdes se produisent des changements de métabolisme.

- les cytochromes a, a₂ et o présents dans la bactérie libre disparaissent et sont remplacés par le cytochrome c-552 et les hémoprotéines P-420 et P-450 (4).

- les granules de glycogène observés dans la bactérie libre laissent place à des granules de poly-β-hydroxy-butyrates (70) ; cependant, les bâtonnets des cultures âgées en contiennent (96), donc ce phénomène n'est pas spécifique de la symbiose.

- il y a biosynthèse d'un pigment rouge, la légghémoglobine, qui s'effectue conjointement par les deux partenaires : il s'agit d'un chromoprotéide porphyrinique ; l'apolégghémoglobine (partie purement protéique) est élaborée par la plante (22), tandis que le bactéroïde est uniquement responsable de la formation de la partie hémique qui est un noyau tétrapyrrolique avec un atome de fer (21).

Tout ceci a été récemment confirmé par des hybridations ADN-ARN messenger (83). Ce pigment sert vraisemblablement à maintenir une pression partielle en oxygène très basse nécessaire au fonctionnement de la nitrogénase à l'intérieur du nodule ; celui-ci entreprend sa croissance dès que les bactéries sont relâchées du cordon infectieux vers le cytoplasme de la cellule-hôte.

- un système enzymatique de la fixation de l'azote, similaire à celui des bactéries fixatrices libres, est induit : la nitrogénase, dont

la synthèse est codée par les gènes "nif" (nitrogen fixation). Toute souche de Rhizobium capable de conduire à la formation de nodules fonctionnels est qualifiée d'efficente. Le problème de la sélection par la plante des Rhizobium efficients ou de l'avantage de ceux-ci par rapport aux Rhizobium inefficients reste posé. Il est à noter que quelques souches de Rhizobium appartenant à différents groupes d'inoculation ont été récemment reconnues comme fixatrices libres d'azote (53, 54, 62).

A côté de ces modifications du métabolisme dans le bactéroïde, une augmentation du contenu en ADN en corrélation avec la taille du bactéroïde (celle-ci étant sous contrôle de la plante-hôte) est généralement constatée (7, 75, 77).

On a longtemps pensé que le bactéroïde était la forme ultime irréversible et incapable de redonner la bactérie libre proliférante (3, 88) ; cette hypothèse vient d'être contredite (42, 93). Il semble que la structure pariétale particulièrement fragile du bactéroïde soit à l'origine de cette controverse.

II LE PROBLEME DU NOMBRE ET DU SUPPORT MOLECULAIRE DES GENES BACTERIENS PARTICIPANT A LA SYMBIOSE

La spécificité d'hôte, l'infectivité et l'efficience sont des caractères portés par toute souche de Rhizobium pouvant établir une symbiose fonctionnelle avec son partenaire végétal. Le nombre des gènes gouvernant ces propriétés doit être assez important et la localisation de ceux-ci sur le matériel génétique présente un intérêt non négligeable si on désire à l'avenir modifier les propriétés symbiotiques par manipulations génétiques.

1) Les gènes

L'établissement de la symbiose Rhizobium-Légumineuse précédemment décrit montre qu'il y a intervention de gènes bactériens :

- L'induction ou l'activation de la synthèse de la polygalacturonase peut être due à une substance produite par le métabolisme végétatif de la bactérie, donc pas nécessairement spécifique de la symbiose. Le même raisonnement peut être appliqué au sujet de l'implication possible d'antigènes de surface bactériens pour l'accrochage au poil absorbant, ainsi que pour la stimulation de la division des cellules tétraploïdes.

- les gènes responsables de la formation de la partie hémique de la légghémoglobine ne sont fonctionnels que dans le bactéroïde.

- la différenciation de la bactérie sous forme bâtonnet en bactéroïde est-elle un phénomène dirigé par des gènes inconnus ou bien simplement due à un dérèglement du métabolisme bactérien ?

- les changements de métabolisme qui se produisent dans le bactéroïde sont probablement la conséquence d'une dérèpression de certains gènes.

- Enfin, la biosynthèse de la nitrogénase très généralement non exprimée chez le Rhizobium libre paraît codée par un ou plusieurs gènes ou opérons. Avant la découverte des Rhizobium fixateurs libres (détectés par la technique de réduction de l'acétylène en éthylène), des auteurs avaient pensé que les gènes nif étaient partagés entre les deux partenaires de la symbiose. En effet, GUILLE et collaborateurs (43) avaient analysé en gradient de chlorure de césium de l'ADN extrait de noyaux de racines et de tiges de soja : une bande satellite de densité égale à 1,722 g/ml avait été observée, densité qui correspond à celle de l'ADN de Rhizobium. Mais le partage des gènes nif aurait dû nécessiter une régulation sophistiquée.

· Contrairement aux bactéries fixatrices libres de l'azote telles K. pneumoniae et A. vinelandii, il n'a pas été possible d'isoler chez Rhizobium des mutants Nif^- , sélectionnés par l'incapacité à se développer sur milieu gélosé dépourvu de source d'azote, même pour les quelques sou-

ches de Rhizobium fixatrices libres. Aussi, l'isolement de mutants Nif^- nécessite-t-il des tests sur plantes. Cependant, une approche indirecte du problème a été rendue possible grâce à l'obtention de mutants auxotrophes inefficients ; ceux-ci seraient classés en trois groupes (31) :

a. mutations apparemment non associées directement avec la capacité symbiotique puisque la restauration de la prototrophie (aptitude à croître dans un milieu minéral contenant une source de carbone et une source d'azote) ne rétablit pas l'efficacité. Il y a donc au minimum deux gènes indépendants touchés par l'agent mutagène.

b. mutations étroitement associées avec l'efficacité car leur réversion permet de la recouvrer, mais pas l'addition de l'exigence. On est en présence d'au moins deux gènes adjacents sinon très proches possédant des gènes régulateurs communs ; une seule mutation au niveau de ces derniers peut affecter le fonctionnement de ces deux gènes.

c. mutations paraissant associées avec la capacité symbiotique au niveau phénotypique : réapparition de l'efficacité si réversion ou addition de l'exigence ; le produit des gènes ayant subi une mutation est nécessaire pour la fixation de l'azote, en tant qu'activateur, coenzyme ou substrat.

2) Localisation

Il semble donc que la nature des gènes bactériens responsables d'une nodulation fonctionnelle ne concerne pas seulement les gènes codant pour le système enzymatique nitrogénase mais aussi les gènes impliqués dans les processus infectieux et le maintien de la symbiose. Ces gènes sont nombreux et le problème de leur localisation sur le matériel génétique reste posé. Sont-ils groupés ou disséminés soit dans le chromosome bactérien, soit dans des molécules distinctes d'ADN, c'est-à-dire portés par des éléments d'ADN extrachromosomiques ou plasmides ? Ces derniers sont des macromolécules dont la taille

s'échelonne de 1/1000e à 1/10e environ de celle du chromosome. Leur répllication est autonome et peut donner plusieurs copies de la molécule par cellule, surtout si la taille du plasmide est inférieure à 36 mégadaltons (Mdal) : on parle de répllication "libérée" ; la répllication dite "contrôlée" s'applique à la plupart des molécules dont le poids moléculaire dépasse 36 Mdal : dans ce cas, la cellule contient au maximum deux copies du plasmide (15). Le terme d'épisome est donné aux plasmides qui peuvent se répliquer dans l'un des deux états suivants : intégré dans le chromosome ou indépendant de celui-ci (48). Un plasmide conjugatif est capable d'effectuer le transfert d'ADN par conjugaison sans obligatoirement être un épisome. En outre, les fonctions assumées par ces éléments génétiques sont variées : résistance à des antibiotiques ou (et) à quelques ions métalliques, synthèse de toxines ou de bactériocines, utilisation de certains sucres, biodégradation de composés organiques non biologiques tel le toluène, phénomènes d'incompatibilité ou d'exclusion de surface vis-à-vis d'autres plasmides (73).

Enfin, la conformation particulière prise par ces macromolécules, la forme circulaire formée super-hélicoïdale à double brin, a permis de mettre au point des méthodes physico-chimiques de séparation très efficaces, par rapport à l'ADN chromosomique (39).

La première hypothèse de l'intervention d'un "épisome" dans la symbiose fut émise par HIGASHI (45) en 1967 : il a réussi à transférer la spécificité d'hôte de R. trifolii à Rhizobium phaseoli avec élimination du donneur R. trifolii par un bactériophage spécifique; il a obtenu des R. phaseoli capables de noduler le trèfle et a donc conclu que la spécificité d'hôte était portée par un facteur épisomique.

Une perte de l'efficacité consécutive à un traitement à l'acridine a été constatée chez R. trifolii par DUNICAN et CANNON (32). L'infectivité a été supprimée chez la même espèce par ZURKOWSKI et collaborateurs (104), grâce à l'emploi d'acriflavine et de lauryl-sulfate de sodium.

Cependant, la preuve la plus directe concernant un plasmide comme support des gènes nif a été apportée par DUNICAN et collaborateurs (33), qui ont transféré avec succès les gènes nif de R. trifolii à une souche de Klebsiella aerogenes déficiente du point de vue de la fixation de l'azote ; la fréquence de transfert observée est en faveur d'un plasmide comme porteur des gènes nif.

Depuis une dizaine d'années, des plasmides ont été mis en évidence par des moyens physiques chez la plupart des espèces de Rhizobium: R. japonicum (55,65,74), R. leguminosarum (74), R. trifolii (33,57,74,92,105) R. "dolichos" (74) et R. "vigna" (92). Par ailleurs, SUTTON (87) a suspecté l'existence d'ADN extrachromosomique chez Rhizobium de Lotus. Certains auteurs ont déterminé la taille de ces macromolécules, qui va de 5,5 Mdal chez une souche de R. trifolii (57) à environ 350 Mdal chez une souche de la même espèce (74). Une souche de R. trifolii contient même deux plasmides (57).

Quelques fonctions ont été attribuées à ces molécules :

- une propriété de facteur de résistance aux antibiotiques a été découverte chez R. japonicum ATCC 10324 (pénicilline, chloramphénicol, néomycine) (17) et chez R. trifolii 712 (pénicilline) (33).

- le plasmide de R. trifolii T₁ est considéré comme étant le support génétique de la fixation de l'azote (33).

Néanmoins, pour la majorité des plasmides détectés chez Rhizobium, aucun phénotype n'a été trouvé : pas de pouvoir de résistance aux antibiotiques, pas de production de bactériocines... Aucune activité de facteur sexuel n'a pu être démontrée, ceci n'étant pas pour surprendre connaissant le peu d'aptitude de ces bactéries à effectuer des processus de conjugaison de façon naturelle, ce qui d'ailleurs conduit à l'emploi de plasmides conjuguatifs d'origines diverses (5,56,69). Une telle absence de phénotype fait

qualifier ces molécules de "cryptiques".

Cependant, ces molécules pourraient avoir comme rôles :

- support de quelques (ou tous les) caractères directement impliqués dans les processus symbiotiques, et qui ne seront démasqués que dans un nodule efficient.

- Ces molécules contiendraient des gènes responsables de voies métaboliques particulières non détectées à ce jour, en rapport ou non avec la symbiose. On peut penser cela par comparaison avec la bactérie la plus directement liée au Rhizobium du point de vue taxonomique : Agrobacterium tumefaciens. Toutes les souches de cette espèce, pathogènes pour des plantes supérieures, possèdent le plasmide Ti ("tumour-inducing") qui est avec certitude l'agent provoquant le cancer végétal ou "crown-gall" (94,95) et dont certains gènes sont concernés dans le métabolisme d'acides aminés inhabituels (nopaline, octopine), qui servent de caractères marqueurs (8,98). Une bactérie, obtenue récemment par croisement, exhibe à la fois les propriétés de Rhizobium et d'A. tumefaciens (84) ; il est à noter que des souches de Rhizobium peuvent déclencher l'apparition de tumeurs (68).

Si les plasmides de Rhizobium sont directement liés avec les propriétés symbiotiques, on peut faire les constatations suivantes :

- le fait que les propriétés symbiotiques ne s'expriment que dans le micro-environnement du nodule rend l'approche du problème très ardue puisque, par exemple, des essais d'élimination de ces plasmides par des agents curatifs vont nécessiter le passage d'un nombre important de clones sur plantes comme unique moyen de sélection.

- la quantité de cistrons et d'opérons impliqués dans la symbiose n'étant pas connue, comment expliquer la grande diversité des tailles des plasmides (l'ordre de grandeur varie presque de 1 à 70) observés chez

Rhizobium ? Par contraste, le plasmide Ti d'A. tumefaciens, présent dans toutes les souches infectieuses, est d'une taille qui se situe dans les limites assez étroites (95 - 156 Mdal) (18,103).

- Des souches efficaces de Rhizobium sont apparemment dépourvues de plasmides (77,105), alors que des souches inefficaces en renferment (92); mais dans ce dernier cas, la perte de l'efficacité peut être la conséquence de mutations naturelles.

- Les gènes nif de R. trifolii ont été transférés par transformation à des mutants Nif^- d'Azotobacter vinelandii sans qu'on ait pu mettre en évidence d'ADN satellite dans les transformants Nif^+ obtenus (6), donc ces gènes seraient chromosomiques. Cependant, une intégration de plasmide dans le chromosome d'A. vinelandii n'est pas impossible.

- Le plasmide Ti d'A. tumefaciens a été transmis par conjugaison à une souche de R. trifolii contenant un plasmide cryptique de grande taille (46); ce dernier n'est plus décelable dans les transconjugants isolés, qui restent efficaces sur Trifolium pratense mais ne sont plus infectieux sur Trifolium parviflorum. Le plasmide indigène de la souche de R. trifolii aurait été exclu par le plasmide Ti ou bien se serait intégré dans le chromosome avec mutation polaire sur le gène spécificité d'hôte pour T. parviflorum.

- La découverte, dernièrement de quelques souches de Rhizobium capables de réduire librement l'acétylène en éthylène est intéressante dans le sens où cette propriété (démontrant que les gènes nif préexistent dans la bactérie) peut éventuellement servir de caractère marqueur.

- Enfin, la mise en évidence récente des éléments d'ADN transposables (transposons), qui remettent en question la stabilité du matériel génétique bactérien (16), complique tous ces problèmes de la symbiose Rhizobium-Légumineuse; en effet, on pourrait concevoir l'existence de transposons

nif (Tn nif), dotés d'un pouvoir d'intégration aussi bien intrachromosomique qu'intraplasmidique.

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé dans le but de rechercher la présence de plasmides chez Rhizobium meliloti, espèce dont aucune publication ne faisait mention à ce sujet. De plus, à la suite de la mise en évidence au laboratoire de deux enzymes ayant une activité β -galactosidasique chez R. meliloti (72), nous nous étions demandé si l'une d'entre elles n'était pas codée par un élément extrachromosomique, semblable au plasmide F'-Lac d'Escherichia coli (49) ou P-Lac de Proteus mirabilis (99).

NOTE : une partie de cette thèse a fait l'objet d'une publication (2).

Matériel et Méthodes

I SOUCHES BACTERIENNES

Nous avons étudié sept souches prototrophes de Rhizobium meliloti, toutes efficaces sur plantules aseptiques de luzerne (Medicago sativa) et employé comme témoins deux souches d'Escherichia coli, une souche de Rhizobium trifolii ainsi que cinq transconjugants de R. meliloti ayant reçu le plasmide RP4 par croisement. Les caractéristiques et origines de ces souches sont présentées dans le Tableau III.

II MILIEUX DE CULTURES

1) R. meliloti

Les précultures et la conservation des souches sont réalisées sur milieu complexe RC de composition suivante (28) :

K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2 g
Extrait de levure(Difco)	1 g
q.s.p. 1 l d'eau distillée ; pH 7,2 à 7,5.	

La source de carbone (glucose) est ajoutée à concentration finale de 1 %, la dihydrostreptomycine (S.P.E.C.I.A.) et la tétracycline (Diamant) respectivement à 400 et 10 μ g/ml pour les souches résistantes à ces antibiotiques. Les cultures sont additionnées de glycérol à 20 % pour la conservation des souches à -20°C (celui-ci étant stérilisé 30 minutes à 105°C).

Le marquage de l'ADN par un précurseur radioactif, ainsi que le lavage et la dilution des souches sont effectués dans le milieu minimum R ci-dessous :

TABLEAU III : Souches utilisées

NOM DE LA SOUCHE	ORIGINE	PHENOTYPE
a) <u>R. meliloti</u>		
1.5	C. Bonnier (Gembloux, Belgique)	Sauvage
2011 str 3	J. Dénarié (Versailles)	Str ^R
M 5 N 1	Isolée au laboratoire	Sauvage
M 9 S	" " "	"
M 11 S	" " "	"
M 12 S	" " "	"
M 22 str	" " "	Str ^R
1.5 (R P 4)	" " "	Amp ^R , Kan ^R , Tc ^R
M 5 N 1 (R P 4)	" " "	"
M 11 (R P 4)	" " "	"
M 22 str (R P 4)	" " "	Amp ^R , Kan ^R , Tc ^R , Str ^R
2011 str 3 (R P 4)	" " "	"
b) <u>R. trifolii</u>		
T 5	M. Dye (Rothamsted Experimental Station, Grande-Bretagne)	Sauvage
c) <u>E. coli</u> K 12		
Hfr C	F. Jacob (Paris)	Thy ⁻
J 53 (R P 4)	M. van Montagu (Gent, Belgique)	Met ⁻ , Pro ⁻ , Amp ^R , Kan ^R , Tc ^R

LEGENDES : Amp^R, Kan^R, Str^R, Tc^R = résistances aux antibiotiques ampicilline, kanamycine, streptomycine, tétracycline.

Met⁻, Pro⁻, Thy⁻ = exigences en méthionine, proline, thymine.



K_2HPO_4	0,5 g
NH_4NO_3	0,5 g
$MgSO_4, 7 H_2O$	0,2 g

q.s.p. 1 l d'eau distillée ; pH 7,2

2) R. trifolii

Le milieu complexe de WRIGHT (101) a été utilisé pour la culture et la conservation de R. trifolii T5 = milieu W

K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4, 7 H_2O$	0,2 g
NaCl	0,2 g
$CaSO_4, 2 H_2O$	0,1 g
$CaCO_3$	0,1 g
Mannitol	10 g
Extrait de levure fraîche	100 ml
Eau distillée	900 ml

pH 7,5

Solidifié par l'adjonction de 15 g/l de Bacto-Agar Difco, ce milieu sert à la conservation de la souche de R. trifolii (milieu gélosé incliné en tube de 16/160 mm).

Pour l'incorporation de thymidine radioactive, le milieu R ci-dessus a été retenu.

3) E. coli

Les souches sont cultivées sur milieu de Luria (64) :

NaCl	5 g
Tryptone (Difco)	10 g
Extrait de levure(Difco)	5 g

q.s.p 1 l d'eau distillée ; pH 7,3 - 7,4

(milieu éventuellement gélosé à 15 g/l de Bacto-Agar Difco).

Le milieu de base pour l'incorporation de marqueur radioactif est celui de LENNOX (59) : M L

NH_4Cl	5 g
NH_4NO_3	1 g
Na_2SO_4	2 g
K_2HPO_4	9 g
KH_2PO_4	3 g
$\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g

q.s.p. 1 l d'eau distillée ; pH 7.

Les souches sont conservées à -20°C dans du bouillon glycéринé contenant :

Extrait de viande (Liebig)	15 g
Peptone (Difco)	25 g

q.s.p. 1 l d'eau distillée ; pH 7,2

Le glycérol est ajouté à la culture à concentration finale de 20 %.

Tous les milieux (RC, RC gélosé, R, W, W gélosé, Luria, Luria gélosé, ML et bouillon non glycéринé) sont stérilisés pendant 20 minutes à 120°C .

III MARQUAGE DE L'ADN

1) R. meliloti et R. trifolii

Les souches sont cultivées dans le milieu R complété par les additifs suivants :

Vitamine B_1 (thiamine)	0,5 $\mu\text{g/ml}$
Vitamine H (biotine)	0,01 $\mu\text{g/ml}$
Glucose	1 %
Hydrolysate de caséine (Difco)	0,1 %

2'-déoxy-adénosine (Merck)	250 µg/ml
Thymidine 6- ³ H (C.E.A., activité spécifique = 26 Ci/mM)	10 µCi/ml
<u>ou</u>	
Thymidine 2- ¹⁴ C (C.E.A., activité spécifique = 52,8 mCi/mM)	1 µCi/ml
Dihydrostreptomycine	400 µg/ml
Tétracycline	10 µg/ml

pour les souches résistantes

2) E. coli

On utilise le milieu ML additionné de :

Vitamine B ₁	2 µg/ml
Glucose	1 %
Hydrolysate de caséine	0,1 %
Thymine (souche Hfr C Thy ⁻)	0,25 µg/ml
Thymine 6 - ³ H (C.E.A.; activité spécifique = 15-25 Ci/mM)	10 µCi/ml
<u>ou</u> thymidine 6 - ³ H	10 µCi/ml
Tétracycline (souche J 53 (RP ₄))	10 µg/ml

La 2'-déoxy-adénosine est ajoutée à raison de 250 µg/ml lorsque la thymidine 6 - ³H est employée ; dans ce cas, la thymine non radioactive est omise.

Pour toutes les souches, l'inoculum de départ est de l'ordre de 10⁷ cellules/ml et le marqueur est incorporé pendant 5 ou 6 générations.

N.B Les produits radioactifs et la dihydrostreptomycine sont reçus stériles; tous les autres composés ajoutés dans les milieux sont stérilisés soit pendant 30 minutes à 105°C, soit par filtration sur disques stériles de nitro-cellulose Millipore de porosité 0,2 µ.

IV EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ADN

1) Méthode de MARMUR (66)

Nous avons employé cette technique, modifiée par FERRAGUT (38), de la façon suivante : les cellules, après culture sur milieu RC glucosé, sont centrifugées à 16300 g pendant 30 mn dans une centrifugeuse SORVALL RC-2 réfrigérée à 4°C ; le culot, remis en suspension dans du tampon NaCl 0,15 M - acide éthylène-diamine-tétracétique(EDTA) 0,1 M pH 8, est lavé par une nouvelle centrifugation puis repris dans vingt fois son poids du même tampon. Le lauryl-sulfate de sodium (SDS ; Prolabo) et la pronase (Sigma) sont ajoutés à concentrations finales respectives de 0,5 % et 50 µg/ml. La solution est incubée 15 h à 37°C. Le lysat visqueux obtenu, après addition d'un quart de volume de NaO₄Cl 5 M puis d'un volume du mélange chloroforme-alcool isoamylique (24-1 v/v), est déprotéinisé par agitation dans un erlenmeyer, fermé par un bouchon rodé, pendant 30 mn. Après une centrifugation de 5 mn à 1800 g, trois phases sont observées :

- phase supérieure aqueuse : acides nucléiques + protéines + divers ;
- phase intermédiaire : protéines dénaturées ;
- phase inférieure organique : composés solubles dans le mélange chloroforme-alcool isoamylique.

La phase aqueuse est soumise à une nouvelle déprotéinisation pendant 20 mn, après adjonction d'un volume de chloroforme-alcool isoamylique. L'ADN est précipité par addition d'un volume d'éthanol (maintenu à -20°C) à la phase aqueuse obtenue ; les fibres d'ADN, récupérées autour d'une tige de verre, sont redissoutes dans un demi-volume de tampon SSC ("standard saline citrate") : NaCl 0,15 M - citrate tri-sodique 0,015 M pH 7, durant une nuit à 42°C. Cette solution est successivement traitée à 37°C par la ribonucléase A (Sigma ; 50 µg/ml ; dissoute dans du NaCl 0,15 M pH 5 et chauffée 15 mn à 100°C au préalable pour inactiver toute déoxyribonucléase contaminante) pendant 60 mn, puis par la pronase (50 µg/ml)

durant 90 mn et ensuite par le SDS (0,5 %) pendant 15 h. On déprotéinise alors 2 ou 3 fois par le mélange chloroforme-alcool isoamylique ; l'ADN est précipité par un volume d'éthanol (-20°C), redissous dans du SSC dilué au 1/10 auquel on ajoute 1/9 de volume d'acétate de sodium 3 M - EDTA 10^{-3} M pH 7. Après une nouvelle précipitation par 0,54 volume d'alcool isopropylique à température ambiante, l'ADN est dissous dans le tampon choisi. La solution finale est jugée d'une pureté satisfaisante si les rapports d'absorbance $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ et $A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$ (77) sont égaux ou supérieurs à 1,8.

2) Gradients préparatifs d'ADN

Afin de fragmenter au minimum l'ADN, nous avons utilisé la technique suivante : le culot bactérien, provenant de 10 à 30 ml de culture, après lavage par du tampon Tris (hydroxyméthyl) aminométhane (Tris) 0,02 M NaCl 0,1 M - EDTA 0,005 M pH 7,5, est mis en suspension dans 5 ml de ce même tampon puis traité par le mélange lysozyme (Sigma ; 400 µg/ml) - ribonucléase A (50 µg/ml ; préalablement chauffée 15 mn à 100°C) pendant 90 mn à 37°C, et ensuite soumis à l'action de la pronase (50 µg/ml) durant 90 mn à 37°C. Puis on ajoute du SDS (0,5 %) et on laisse agir 15 h à 37°C. Du chlorure de césium (CsCl Suprapur ; Merck) est dissous dans le lysat clair et visqueux jusqu'à l'obtention d'une densité finale de 1,7 g/ml (déterminée au réfractomètre d'Abbe). Ce mélange est centrifugé à 33000 tours par mn dans un rotor SW 50.1 ou SW65 pendant 72 h à 25°C (ultracentrifugeuse Beckman L2 - 65 B). Les fractions contenant l'ADN sont récupérées après leur repérage, soit par mesure de l'absorbance à 260 nm, soit par comptage de la radioactivité sur une partie aliquote.

3) A partir de nodules sur racines de luzerne

Les nodules sont excisés , récupérés dans le tampon Tris-HCl 0,05 M - acétate de magnésium 0,005 M - mannitol 0,5 M pH 7,4 et broyés à

4°C. L'homogénat obtenu est filtré sur un entonnoir muni de verre fritté et le volume est complété à 200 ml avec le même tampon. On centrifuge 15 mn à 27000 g et à 4°C pour sédimenter les bactéroïdes. Le culot est remis en suspension dans du tampon NaCl 0,15 M-EDTA 0,1 M pH 8 puis on centrifuge à nouveau à 16300 g pendant 20 mn à 4°C. Le second culot est repris dans 10 fois son poids en tampon NaCl - EDTA et l'ADN est extrait et purifié selon la méthode de MARMUR précédemment décrite.

V METHODES DE LYSE DOUCE DES CELLULES

1) Lyse neutre

Celle-ci a été effectuée selon la technique de LEDEBOER et coll. (58) : aux bactéries cultivées depuis la veille dans 10 ml de milieu en présence de marqueur radioactif, on ajoute de la carbénicilline (Pyopen ; 5 mg/ml) que l'on fait agir à 30°C en agitation pendant 2 à 3 h. Puis on centrifuge à 1800 g et à 4°C pendant 25 mn ; le culot est remis en suspension dans 2,25 ml de tampon Tris 0,01 M - NaCl 0,05 M - EDTA 0,05 M (TES) pH 8. On ajoute un ^{volume}~~nombre~~ égal d'une solution de lysozyme à 400 µg/ml dans du TES saturé en n-dodécylamine (Merck) en mélangeant doucement et on laisse dans la glace pendant 30 mn. La lyse est réalisée pendant 1 h après addition de 10 µl de diéthyl-pyrocarbonate (Sigma) puis de 0,5 ml de dodécyl-sarcosinate de sodium (Sarkosyl ; Ciba-Geigy) à 10 % dans le tampon TES. Le lysat clair et visqueux est éventuellement homogénéisé dans un tube de 16/160 pendant 30 s sur un mélangeur rotatif de type Cenco à vitesse maximale.

2) Lyse alcaline

Nous avons employé la méthode de NUTL et coll. (74) : après traitement par la carbénicilline et centrifugation comme ci-dessus, le culot est repris dans 0,675 ml de TES pH 8 auquel on ajoute 0,675 ml de lysozyme à 400 µg/ml dans le même tampon saturé en n-dodécylamine. Après séjour

de 30 mn dans la glace, on complète par 0,15 ml de Sarkosyl à 10 % dans le tampon TES et 0,15 ml de NaCl M - NaOH 3 M et on laisse 1 h dans la glace. On homogénéise ensuite, le cas échéant, de la même façon que pour la lyse neutre.

VI ANALYSE DE L'ADN PAR ULTRACENTRIFUGATION

1) Gradients neutres de CsCl

Dans un tube de 16/160 muni d'un bouchon à vis et contenant 5 ml de solution d'ADN dans le tampon choisi, on dissout du CsCl par inversion répétée du tube jusqu'à l'obtention d'une densité de 1,7 g/ml à 25°C, correspondant à un indice de réfraction $n_D^{25^\circ\text{C}} = 1,3993$ selon la formule de IFFT et coll. (47) : $d^{25^\circ\text{C}} = (10,8601 \times n_D^{25^\circ\text{C}}) - 13,4974$.

Les tubes en nitrate de cellulose (Beckman) sont remplis jusqu'à 2 à 3 mm du bord et équilibrés ; la centrifugation est effectuée à 33000 tours par mn pendant 72 h à 25°C, dans le rotor SW 50.1. ou SW 65.

2) Gradients de CsCl en présence de bromure d'éthidium

A 5 ml de lysat neutre on ajoute 0,21 ml de bromure de 3,8-diamino 6-phényl 5-éthyl-phénanthridinium (ou bromure d'éthidium ; Sigma) à 10 mg/ml de tampon TES pH 8. Après homogénéisation douce, ce mélange est amené à une densité de 1,6 g/ml à 25°C ($n_D^{25^\circ\text{C}} = 1,3902$). La centrifugation est réalisée de la même manière que pour les gradients neutres de CsCl.

3) Gradients de sulfate de césium en présence d'ions argent (Ag^+)

Nous nous sommes référés à la méthode de JENSEN et DAVIDSON (51) : la solution d'ADN est dialysée successivement contre de l'EDTA 0,1 M pH 8 (24 h), du perchlorate de sodium 0,1 M (24 h) puis du sulfate de sodium 0,01 M (2 fois 24 h). La concentration en ADN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm, 20 de densité optique sur un parcours de 1 cm correspondant à 1 mg/ml (spectrophotomètre ZEISS PMQ 11). A l'ADN en solution

dans Na_2SO_4 0,01 M, on ajoute du nitrate d'argent et on homogénéise immédiatement, de façon à obtenir un rapport molaire Ag^+/ADN -phosphate de l'ordre de 0,35 ; la molarité en ADN - phosphate est celle de la moyenne des résidus nucléotidyl(-base-2'déoxyribose- PO_3H -) formant les deux brins de l'ADN, en tenant compte du pourcentage respectif de chacune des 4 bases. Ce mélange est amené à pH basique par adjonction de tétraborate de sodium ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ou borax ; $1,25 \cdot 10^{-2}$ M). Du sulfate de césium (Cs_2SO_4 Suprapur ; Merck) est dissous pour avoir une densité finale de 1,5 g/ml, correspondant à un indice de réfraction à 25°C de 1,3745 selon la formule de LUDLUM et WARNER (63) : $d^{25^\circ\text{C}} = 0,9954 + 11,1066 (n-\text{no}) + 26,446 (n-\text{no})^2$, où no = indice de réfraction de l'eau à 25°C, soit 1,3325. La centrifugation est effectuée comme pour les gradients de CsCl.

4) Gradients alcalins de saccharose

Ceux-ci sont réalisés dans du tampon Tris 0,01 M - NaCl 1,05 M - EDTA 0,005 M - NaOH 0,3 M pH 12,3 (74), contenant du saccharose (Merck) à 5 % et à 20 %, soit respectivement 50,9 mg/ml et 216, 2 mg/ml. Les gradients linéaires sont confectionnés au moyen de l'appareil de BRITTEN et ROBERTS (13) relié par une pompe péristaltique à un système de remplissage automatique de gradient (Buchler "Auto-densi-flow"). Les volumes de saccharose à 5 et 20 % dans les deux cuves sont de : 2,5 ml/2,5 ml pour le rotor SW 50.1 et 6,7 ml/6,3 ml pour le rotor SW 40. Au sommet de ces gradients, on dépose 0,1 à 0,15 ml (rotor SW 50.1) ou 0,4 à 0,5 ml (rotor SW 40) de lysat alcalin. Les centrifugations ont lieu à 4°C et à 37000 tours par mn pendant un temps variable.

5) Collecte et analyse des gradients

Les gradients à l'équilibre (sels de césium) sont fractionnés au nombre de gouttes constant, grâce à un appareil Buchler "Auto-densi-flow" ou un fractionneur de gradients ISCO ; ce dernier est employé pour le frac-

tionnement des gradients alcalins de saccharose en temps constant. L'ADN non radioactif est repéré au spectrophotomètre à 260 nm après dilution avec du tampon approprié. L'ADN marqué contenu dans chaque fraction ou dans une partie aliquote, après addition de 50 µg d'ADN de thymus de veau, est précipité par un volume égal d'acide trichloracétique à 10 % glacé, puis le matériel insoluble dans l'acide trichloracétique est récupéré par filtration sur disques de fibre de verre (Whatman GF/C) ; ceux-ci sont rincés à l'acide trichloracétique à 5 % froid, à l'éthanol puis à l'éther et ensuite séchés. La radioactivité est comptée en présence d'un liquide scintillant composé de 4 g de 2,5-diphényl-oxazole et 0,1 g de paraphénylène-bis (phényl-5-oxazole)-2,2' dans un litre de toluène ; du Lipoluma (Lumac) a également été utilisé.

VII DETERMINATION DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES (ANTIBIOGRAMME)

Les souches, cultivées sur milieu RC glucosé, sont ensemencées par inondation à la surface de boîtes de Pétri contenant 25 ml de milieu RCG glucosé (3 ml de dilution, de l'ordre de $5 \cdot 10^6$ cellules par ml) ; l'excès de liquide est réaspiré et les boîtes sont mises à sécher à 37°C pendant 15 mn. Des disques (Institut Pasteur Production ; bio Mérieux) contenant une quantité standard d'antibiotique sont déposés à la surface en appuyant légèrement et on incube à 30°C pendant 36 h. Le diamètre des zones d'inhibition apparues est mesuré, et le comportement de chaque souche (sensible, intermédiaire, résistante) est déterminé.

VIII ESSAIS D'ELIMINATION DE PLASMIDES

On fait un inoculum de l'ordre de 10^4 cellules par ml dans du milieu RC glucosé pH 7,6 additionné, le cas échéant, de dihydrostreptomycine, et contenant des agents curatifs à concentrations variables : acridine orange (Sigma ; chlorure de 3,6-bis-diméthylamino-acridinium), acriflavine (Sigma ;

mélange de chlorure de 2,8-diamino-10-méthyl-acridinium et de 2,8-diamino-acridine), bromure d'éthidium et SDS. On incube ensuite pendant 72 h à 30°C. Après numération des cellules, chaque échantillon est dilué et étalé sur des boîtes de milieu RCG glucosé de façon à obtenir environ une cinquantaine de colonies par boîte. Ces dernières sont alors répliquées sur les milieux de sélection.

IX TESTS D'INFECTIVITE ET D'EFFICIENCE

Ceux-ci sont réalisés sur plantules aseptiques de luzerne (Medicago sativa) selon BONNIER et BRAKEL (9).

Résultats

Dans cette étude, nous avons comparé dans un premier temps la composition en bases de l'ADN de la bactérie libre et du bactéroïde par la technique de centrifugation en gradient de CsCl, après extraction et purification de l'ADN par une méthode conduisant à une dégradation importante de celui-ci. Ensuite, nous avons recherché une méthode de lyse douce des cellules de R. meliloti, nécessaire à la mise en évidence d'ADN extrachromosomique par deux techniques basées sur sa configuration spatiale particulière : centrifugation de zone en gradients alcalins de saccharose et centrifugation isopycnique en présence de bromure d'éthidium dans un gradient de CsCl. La fonction des plasmides ainsi détectés a été abordée. Enfin, ce travail a été complété par la recherche d'une hétérogénéité dans la composition en bases de l'ADN de quelques souches : gradients de Cs_2SO_4 en présence d'ions argent.

I DETERMINATION DE LA DENSITE APPARENTE DE L'ADN DE LA BACTERIE LIBRE ET DU BACTEROIDE (souche 2011 str 3).

1) Principe

Quand on soumet à une force centrifuge importante de l'ADN dans une solution concentrée de CsCl, un gradient de densité se crée dans le tube et les molécules d'ADN viennent se placer dans la zone qui correspond à leur densité apparente ; celle-ci est fonction du degré d'hydratation de la molécule d'ADN dans la solution de sel de césium considérée, ainsi que de la composition en bases de l'ADN étudié (44). Par exemple, la densité apparente dite "de flottation" de l'ADN d'E. coli, égale à 1,710 g/ml en gradient de CsCl, n'est plus que de 1,426 g/ml en gradient de Cs_2SO_4 (90).

2) Centrifugation en gradient de CsCl de l'ADN de la souche 2011 str 3 (bactérie libre et bactéroïde).

L'ADN extrait par la méthode de MARMUR à partir d'une culture de la souche 2011 str 3 d'une part, de bactéroïdes de nodules apparus sur plantes de luzerne après inoculation de cette souche d'autre part, a été analysé en gradient de CsCl, en présence d'ADN radioactif témoin d'E. coli K 12 Hfr C Thy⁻ préparé par la même technique.

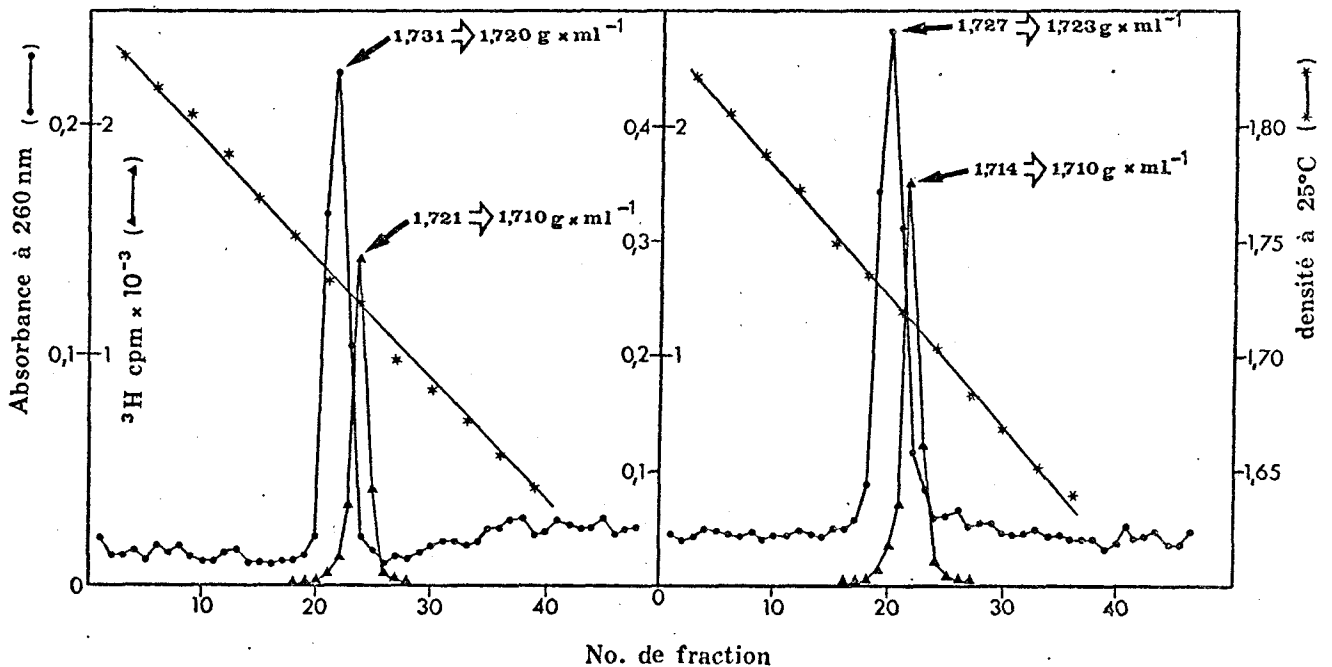


Figure 2 : Détermination de la densité de l'ADN extrait : a) de la souche 2011 str 3 ; b) des bactéroïdes en provenant. L'ADN témoin radioactif est celui d'E. coli Hfr C Thy⁻. Collecte de fractions de 3 gouttes.

La figure 2 montre un exemple de détermination de la densité de l'ADN purifié provenant de la bactérie libre et de bactéroïde. La différence de densité observée pour l'ADN témoin par rapport à la valeur théorique (1,710 g/ml) est retranchée de la densité de l'ADN étudié, cette dernière étant définie d'après la pente du gradient de CsCl.

Pour l'ADN de la souche 2011 str 3, nous avons trouvé une densité de 1,722 g/ml (moyenne de 5 déterminations), ce qui correspond à un contenu de 63,2 % en guanine + cytosine, si on se réfère à la formule de SCHILDKRAUT et coll. (81) : $\rho = [1,660 + (0,098 \times \% GC)]$ g/ml. Cette valeur est caractéristique de l'ADN de Rhizobium (29,87).

En ce qui concerne l'ADN extrait des bactéroïdes de la même souche, une densité moyenne de 1,722 g/ml également a été observée, d'après 3 déterminations.

Par l'emploi des gradients neutres de CsCl, nous n'avons pas mis en évidence d'hétérogénéité dans l'ADN étudié. Cette technique n'est utilisée pour mettre en évidence de l'ADN plasmidique que si celui-ci présente une différence de densité apparente substantielle par rapport à celle de l'ADN chromosomique : c'est le cas des souches de Proteus mirabilis ayant reçu un plasmide d'E. coli (37).

II RECHERCHE D'UNE METHODE CONVENABLE DE LYSE DOUCE DES CELLULES DE R. MELILOTI

La méthode de MARMUR, que nous avons employée pour extraire l'ADN de R. meliloti, conduit à la fragmentation de l'ADN en morceaux de l'ordre de 10 Mdal, d'où une destruction de la structure tertiaire des plasmides d'un poids moléculaire supérieur (15).

Les techniques physico-chimiques de mise en évidence d'ADN extra-chromosomique étant principalement basées sur la structure tertiaire de la molécule, c'est-à-dire la forme circulaire fermée superhélicoïdale, il est absolument nécessaire de conserver celle-ci en effectuant une lyse douce des cellules à basse température et en présence d'un agent chélateur des ions Mg^{++} , l'EDTA, ceci afin de minimiser l'action des désoxyribonucléases endogènes.

De nombreuses méthodes établies sur l'emploi de lysozyme en présence de saccharose et d'EDTA ont été mises au point chez E. coli ; elles permettent d'obtenir un lysat clair et visqueux en quelques minutes à température de 0 à 4°C ; leur action se décompose en deux étapes :

- formation de sphéroplastés (formes bactériennes dépourvues de paroi) en milieu hypertonique, résultat d'une destruction plus ou moins importante de la paroi par le lysozyme, qui hydrolyse les liaisons β -1,4 entre les résidus N-acétyl-muramique et les résidus N-acétyl-glucosamine de la muréine, la présence d'EDTA s'avérant indispensable chez les bactéries à gram négatif.

- lyse des sphéroplastés obtenus par un détergent non ionique (éther monostéarique du polyéthylène glycol ou Brij 58) associé au désoxycholate de sodium (DOC ; agent de dissociation des lipoprotéines membranaires) ou par des détergents ioniques (SDS, Sarkosyl).

Contrairement à E. coli et comme les bactéries du genre voisin Agrobacterium (58), le Rhizobium est peu sensible à ces méthodes de lyse à basse température. A titre d'exemple, nous avons essayé la technique de GODSON (41) qui permet d'obtenir et de lyser des sphéroplastés d'E. coli en 3 mn à 4°C : le culot cellulaire est remis en suspension dans 0,4 ml de saccharose à 25 % dans le tampon Tris-HCl 0,01 M pH 8,1 puis on ajoute 0,1 ml de lysozyme à 425 μ g/ml dans du Tris-HCl 0,125 M - EDTA 0,004 M pH 8,1. On laisse agir 45 s à 1 mn et on transfère dans le mélange de lyse comprenant 0,1 ml de Brij 58 à 5 % dans du Tris-HCl 0,1 M pH 7,2 - 0,2 ml de DOC à 1 % dans le même tampon pH 8,1 et 0,15 ml d'eau distillée. On mélange en aspirant et refoulant à la pipette.

La réussite de l'opération est concrétisée par la formation d'un lysat clair et visqueux ; la viscosité observée est essentiellement due à la dégradation des corps nucléaires (ou chromosomes "pliés"), formes sous les-

quelles l'ADN chromosomique se trouve empaqueté à l'intérieur de la cellule bactérienne (86).

Nous avons tenté d'appliquer cette méthode à la souche 2011 str3 ; nous n'avons obtenu aucune lyse, même en faisant varier divers paramètres : nombre de cellules, concentration en lysozyme, pH . Au microscope, on n'observe pas de sphéroplastés mais des agrégats cellulaires.

Chez Agrobacterium tumefaciens, qui n'est pas sensible aux procédés de lyse utilisés chez E. coli, un traitement relativement long avec des enzymes protéolytiques à température élevée (37°) est nécessaire (103). TSHITENGE et coll. (92) ont employé cette technique avec un certain succès chez Rhizobium trifolii. Par un système similaire, décrit dans "Matériel et méthodes" (paragraphe IV - 2), mais où l'action du SDS à 0,5 % pendant 15 h est remplacée par celle du Sarkosyl à 1 % durant 90 mn à 37°C (puisque le SDS est insoluble dans les solutions concentrées de CsCl) nous avons recherché l'existence de plasmides chez des souches de R. leguminosarum, R. phaseoli et R. trifolii ; un plasmide a été mis en évidence par centrifugation en gradient de CsCl, en présence de bromure d'éthidium, chez la souche de R. leguminosarum L 2 S (12). Malheureusement, une mauvaise reproductibilité de ce résultat a été constatée, probablement imputable à la température élevée employée (37°C).

Pendant que nous effectuions nos travaux, une méthode de lyse à basse température après traitement des cellules d'A. tumefaciens par la carbénicilline a été publiée par LEDEBOER et coll. (58) puis appliquée à quelques espèces de Rhizobium par NUTI et coll. (74). Cet antibiotique de la famille des pénicillines est connu pour son action inhibitrice sur la biosynthèse de la paroi bactérienne. En soumettant à ce procédé les souches de R. meliloti que nous avons étudiées, une lyse convenable en 90 mn dans la glace a été obtenue pour la majorité de celles-ci, en modifiant un seul

paramètre, la concentration en carbénicilline dans la culture bactérienne : 5000 µg/ml au lieu de 500. Les lysats ainsi formés à partir de cultures radioactives ont été analysés afin de rechercher la présence d'ADN extra-chromosomique.

III MISE EN EVIDENCE DE PLASMIDES

Nous avons employé deux méthodes basées sur la configuration spatiale particulière de ces macromolécules :

- sédimentation de zone en gradients alcalins de saccharose
- centrifugation isopycnique en présence de bromure d'éthidium en gradient de CsCl.

1) Centrifugation en gradients alcalins de saccharose

a. Principe

Dans un lysat bactérien, l'ADN se trouve sous différentes formes :

- le chromosome "plié" ou corps nucléaire, dont la structure tertiaire serait maintenue par un ARN particulier (86,100); d'importantes précautions doivent être prises pour son isolement à l'état natif.
- des fragments linéaires à deux brins (bicaténaires) d'un poids moléculaire variable, provenant de la dégradation du chromosome "plié".
- l'ADN extrachromosomique (que l'on appelle plasmide ou moins couramment ADN satellite). La figure 3 montre les formes prises par celui-ci dans des conditions de pH voisines de la neutralité et alcalines. Dans le premier cas, on observe (études qui ont été réalisées au microscope électronique) :

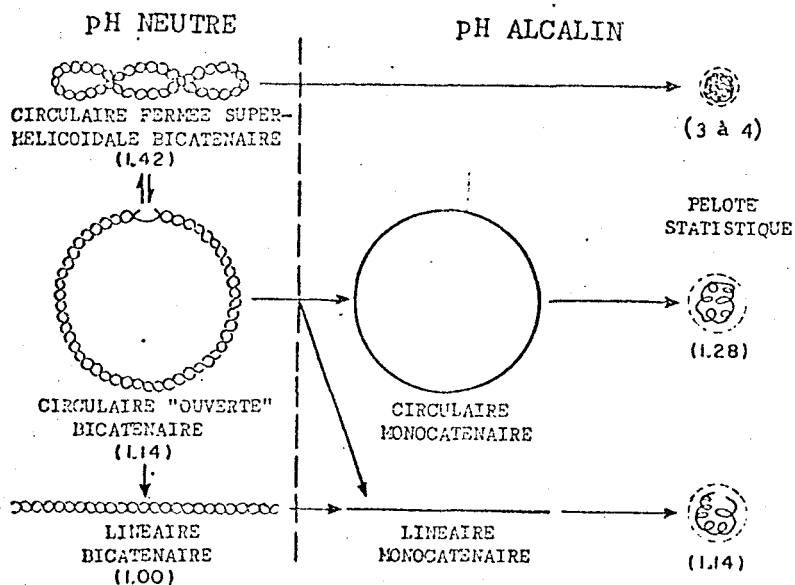


Figure 3 : Représentation schématique des différentes configurations des molécules d'ADN plasmidiques. Les chiffres entre parenthèses sont les coefficients de sédimentation relatifs des différentes molécules d'ADN du virus du polyome en gradients de saccharose neutre et alcalin. D'après CLOWES (15).

. une configuration circulaire fermée (par liaisons covalentes) superhélicoïdale et bicaténaire ; on ignore la nature des liaisons qui conduisent à cette structure tertiaire de la molécule, semblable à celle de l'ADN du virus du polyome (97) ou de mitochondries (10).

. une forme circulaire "ouverte" bicaténaire : l'ouverture d'un brin en un seul point de la chaîne polydésoxyribonucléotidique provoque la perte de la structure en superhélice.

. une molécule linéaire bicaténaire, après rupture des deux brins de l'ADN au même endroit.

Les proportions respectives de ces 3 formes dans les lysats sont variables. Le rendement de l'isolement des plasmides concerne le pourcentage des molécules dont la configuration est circulaire fermée superhélicoïdale.

A un pH supérieur à 11,5, les ponts hydrogène entre les bases complémentaires de l'ADN sont rompus d'où une séparation des deux chaînes. En conséquence, la forme linéaire bicaténaire va se scinder en deux brins linéaires monocaténaires, tandis que la forme circulaire "ouverte" donnera un brin linéaire et un brin circulaire monocaténaires. Toutes ces molécules à une chaîne polydésoxyribonucléotidique ont donc un poids moléculaire diminué de moitié.

Par contre, la configuration circulaire fermée superhéliçoidale bicaténaire, bien que les ponts hydrogène soient détruits, reste entière du fait de la structure tertiaire de la molécule et son poids moléculaire est inchangé.

Par centrifugation dans un gradient alcalin de saccharose, ces différentes molécules vont migrer avec des constantes de sédimentation inégales. Les formes linéaire et circulaire monocaténaires se comportent de la même façon que les fragments linéaires à une chaîne de l'ADN chromosomique (dans ce cas, seul le poids moléculaire intervient), tandis que la forme circulaire fermée superhéliçoidale bicaténaire du plasmide sédimente 3 à 4 fois plus vite. La séparation est d'autant meilleure que les fragments d'ADN chromosomique ont un poids moléculaire plus faible, d'où l'intérêt de l'homogénéisation du lysat.

b. Recherche de plasmides chez R. meliloti

Cette technique a été d'abord essayée pour deux souches de R. meliloti portant le plasmide R P 4 : M 22 str (R P 4) et 2011 str3 (R P 4). Celui-ci est mis en évidence dans les deux cas par centrifugation dans un gradient alcalin de saccharose 5 - 20 %, après 40 mn. Les témoins correspondants (souches M 22 str et 2011 str 3) ne montrent aucun pic plasmidique dans les mêmes conditions (figure 4).

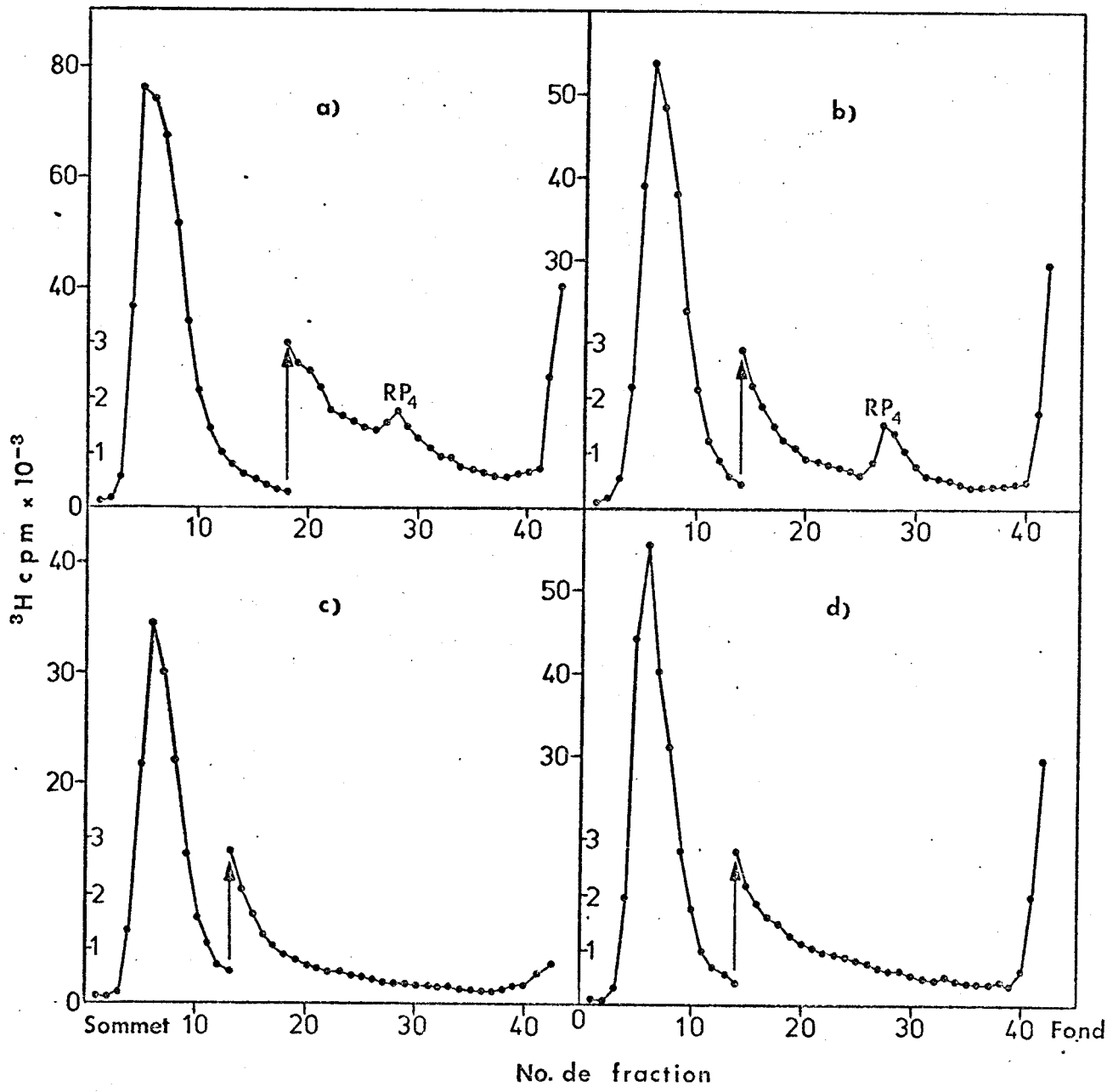


Figure 4 : Centrifugation en gradient alcalin de saccharose pendant 40 mn à 37 000 tours par mn et à 4° C dans le rotor SW 50.1. des lysats alcalins obtenus à partir des souches : a) 2011 str 3 (RP4) ; b) M 22 str (RP4) ; c) 2011 str 3 ; d) M 22 str. La flèche indique le changement d'échelle.



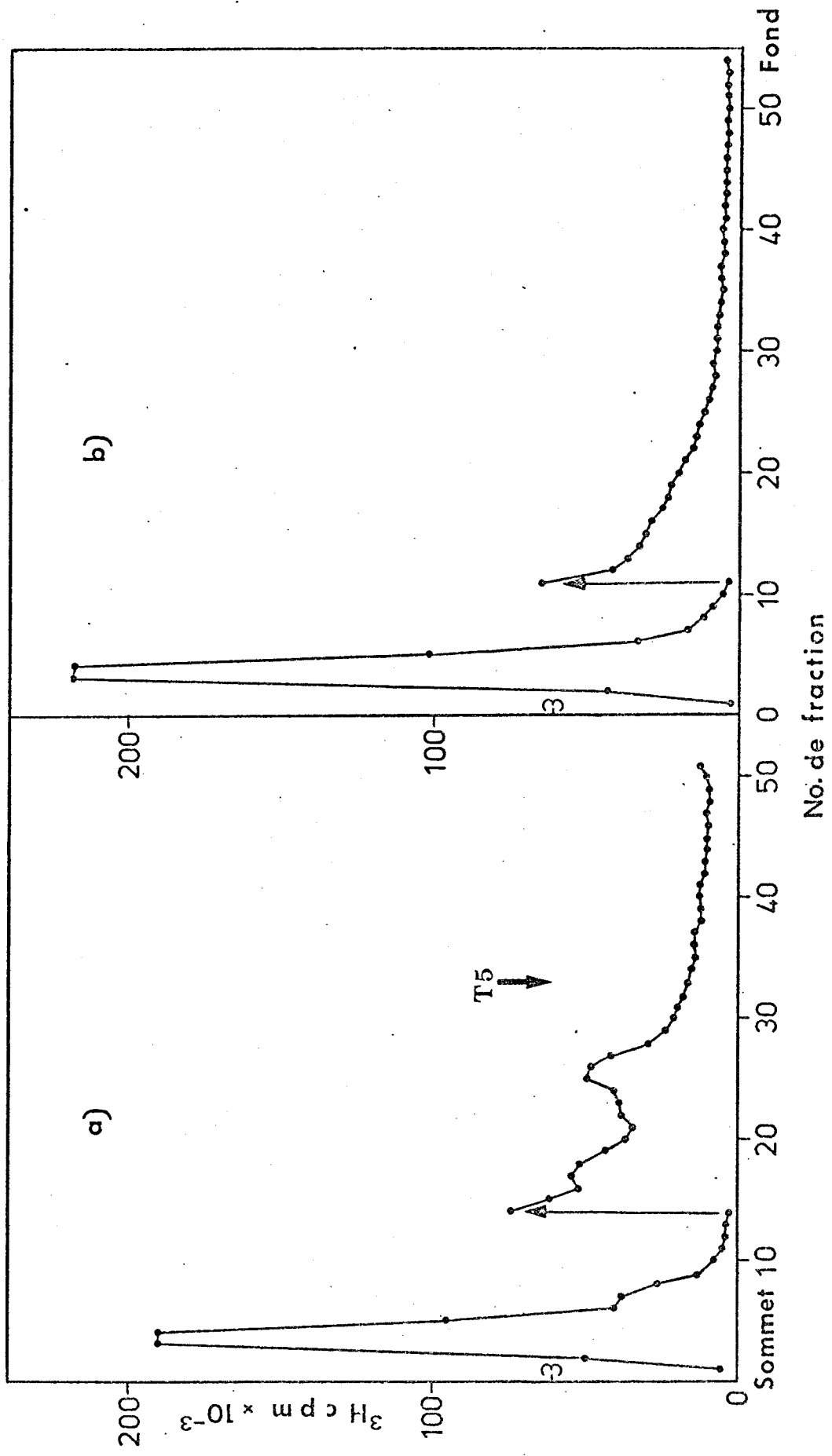


Figure 5 : Centrifugation en gradient alcalin de saccharose pendant 17 mn à 37 000 tours par mn et à 4° C dans le rotor SW 40 des lysats alcalins obtenus à partir des souches : a) M 22 str ; la position du plasmide de R. trifolii T 5, dans les mêmes conditions, est signalée ; b) 2011 str-3. La flèche indique le changement d'échelle.



L'accumulation de matériel radioactif précipitable par l'acide trichloracétique constatée dans le fond du gradient pouvant être due à la présence d'ADN satellite de taille plus importante, les lysats alcalins des souches M 22 str et 2011 str 3 ont été analysés par centrifugation durant 17 mn dans des pots plus longs, ce qui a permis de trouver un pic d'ADN à sédimentation rapide pour la souche M 22 str seulement (Figure 5).

Ce pic est caractéristique d'un grand plasmide, comme ceci l'a été remarqué par NUTI et coll. (74) chez R. trifolii T 5 ; nous avons utilisé cette dernière souche comme témoin (figure 6) et nous avons conclu que la taille du plasmide de la souche M 22 str devait être un peu inférieure à celle du plasmide de R. trifolii T 5 (350 Mdal).

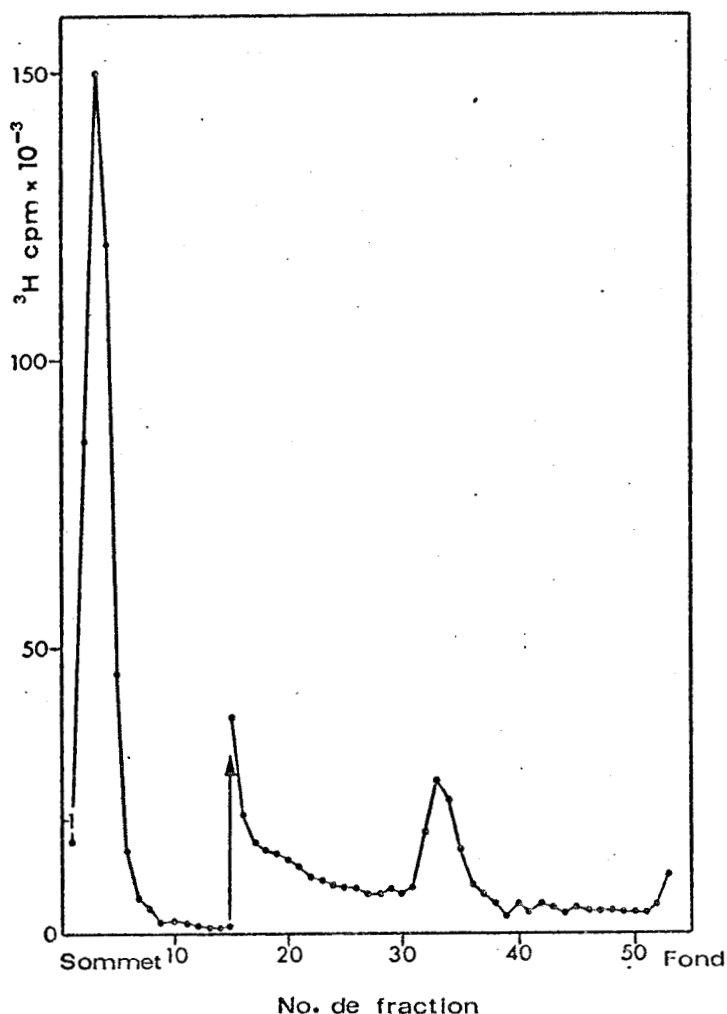


Figure 6 : Centrifugation en gradient alcalin de saccharose pendant 17 mn à 37 000 tours par mn et à 4° C dans le rotor SW 40 du lysat alcalin obtenu à partir de la souche de R. trifolii T 5. La flèche indique le changement d'échelle.

Chez trois autres souches : M 5 N 1, M 11 S et 1.5, un ADN extrachromosomique n'a pu être détecté qu'après 40 mn de centrifugation dans le rotor SW 40 (Figure 7).

Enfin, pour les trois souches : M 9 S, M 12 S et 2011 str 3, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence un plasmide en gradient alcalin de saccharose. Pour la souche 2011 str 3, nous avons fait varier la durée de centrifugation à 37000 tours par mn dans le rotor SW 40 : 10, 17, 40 et 80 mn, sans résultat. Nous avons envisagé que l'homogénéisation du lysat pouvait être néfaste au maintien de la structure tertiaire d'un plasmide de poids moléculaire très élevé ; aussi, avons-nous évité d'homogénéiser le lysat avant de le déposer sur le gradient. Après centrifugation de 10 ou 17 mn dans le rotor SW 40, aucun ADN satellite n'a été observé, l'ADN chromosomique conservant le même emplacement dans le gradient.

Les souches ayant reçu le plasmide R P 4 par conjugaison : M 5 N 1 (R P 4), M 11 (R P 4) et 1.5 (R P 4), analysées dans les conditions où le plasmide indigène des souches-mères (M 5 N 1, M 11 S et 1.5) est mis en évidence, donnent les résultats suivants (figure 8) :

- M 5 N 1 (R P 4) et 1.5 (R P 4) : 2 pics plasmidiques aux fractions 23 et 36.
- M 11 (R P 4) : 1 seul pic plasmidique à la fraction 23.

Cette dernière souche, dont l'ADN est marqué au tritium, par centrifugation simultanée de son lysat mélangé à celui d'E. coli J 53 (R P 4) ayant incorporé de la thymidine ^{14}C , montre deux pics superposés par double comptage (figure 9).

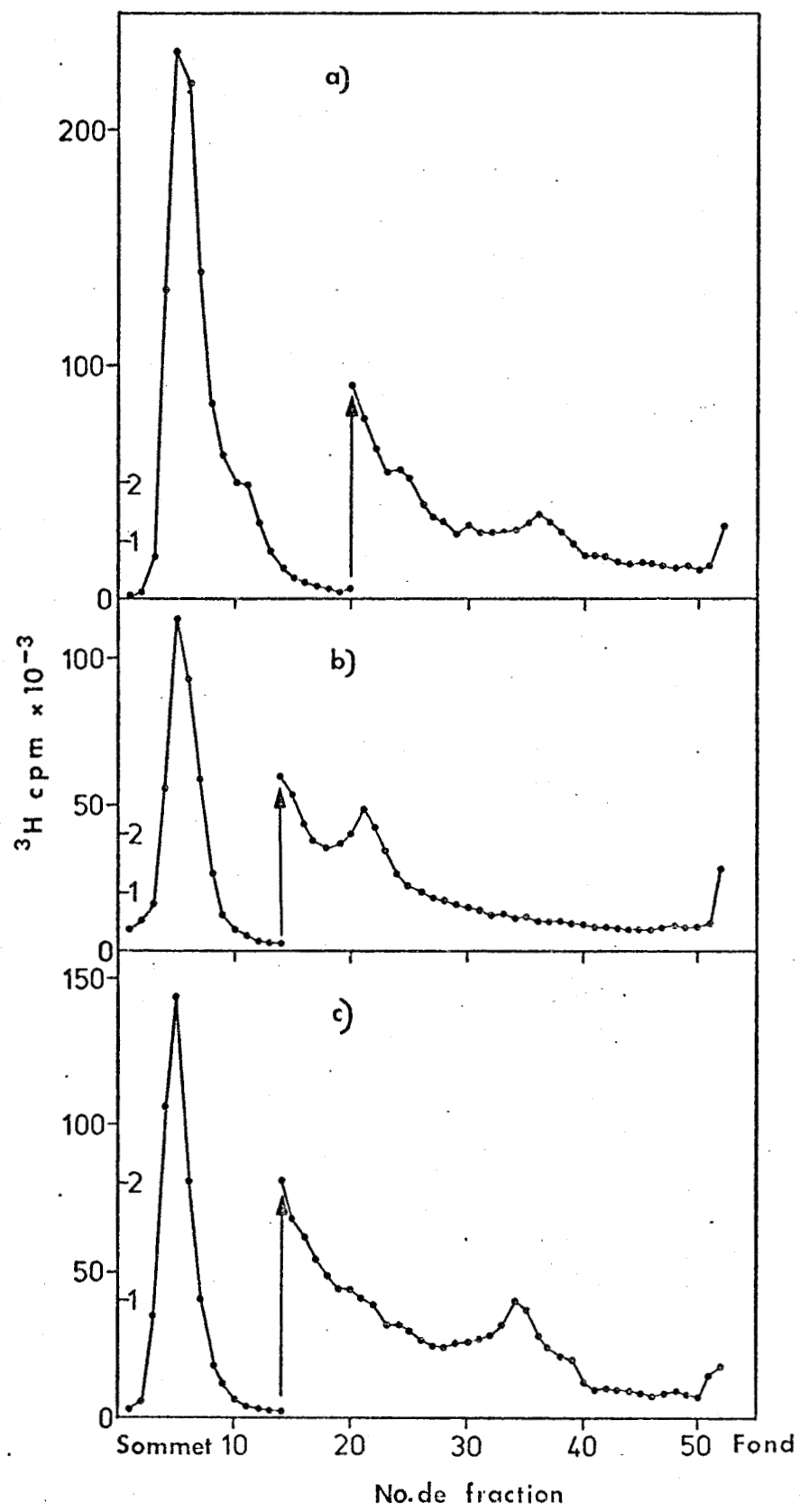


Figure 7 : Centrifugation en gradient alcalin de saccharose pendant 40 mn à 37 000 tours par mn et à 4° C dans le rotor SW 40 des lysats alcalins obtenus à partir des souches : a) M 5 N 1 ; b) M 11 S ; c) 1.5. La flèche indique le changement d'échelle.



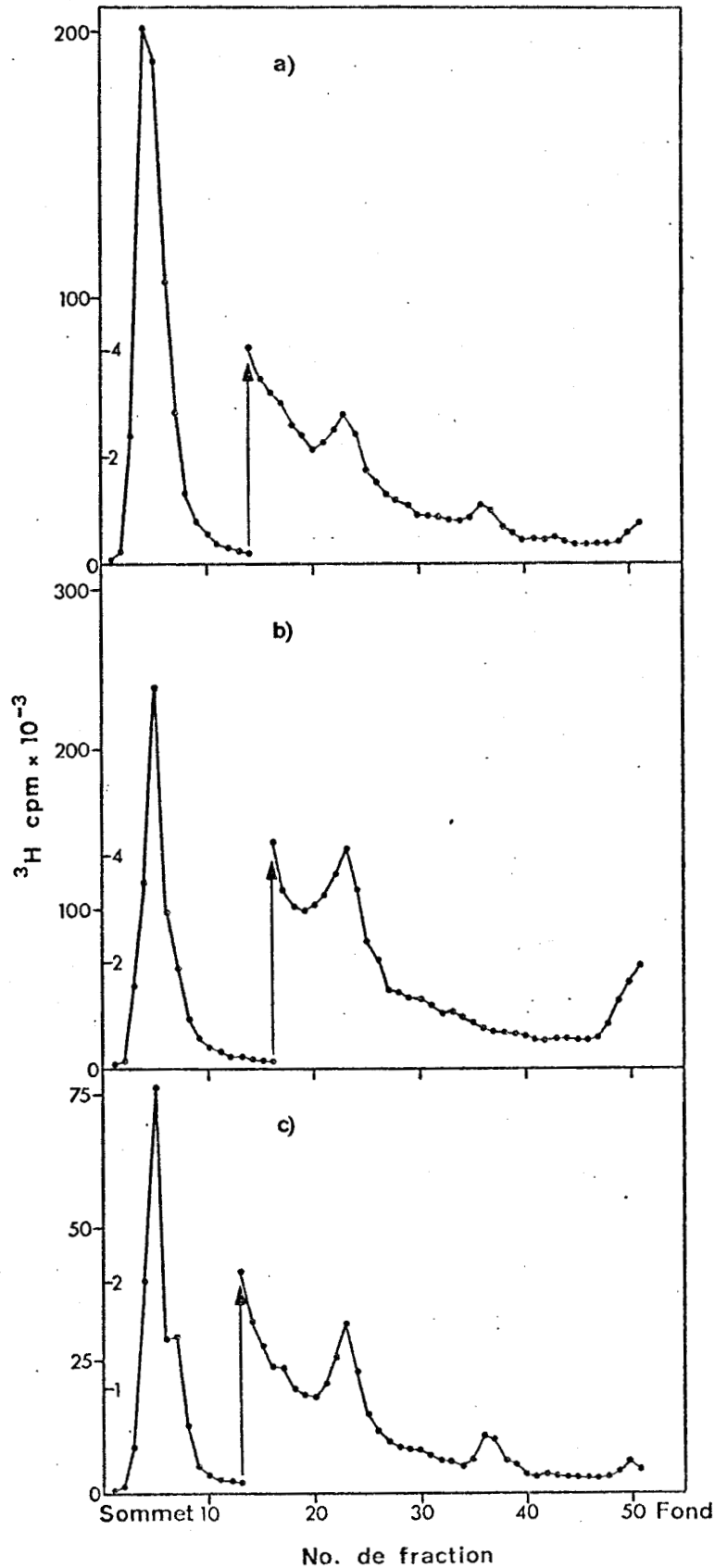


Figure 8 : Centrifugation en gradient alcalin de saccharose pendant 17 mn à 37 000 tours par mn et à 4° C dans le rotor SW 40 des lysats alcalins obtenus à partir des souches :
 a) M 5 N 1 (R P 4) ; b) M 11 (R P 4) ; c) 1.5 (R P 4). La flèche indique le changement d'échelle.



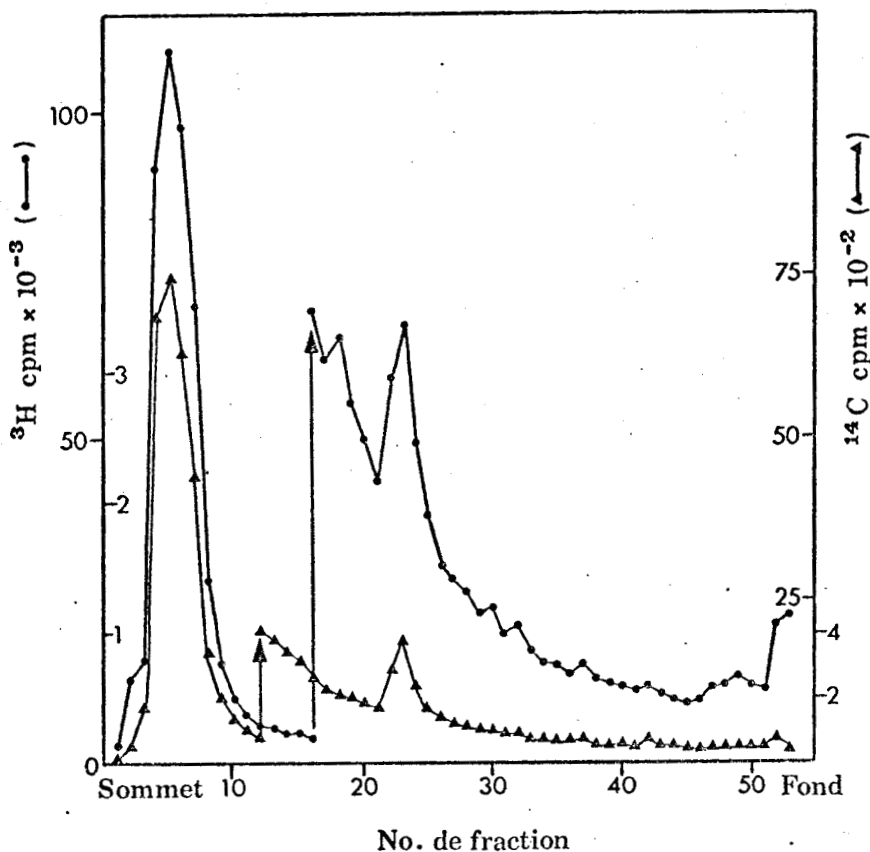


Figure 9 : Centrifugation simultanée en gradient alcalin de saccharose pendant 40 mn à 37 000 tours par mn et à 4° C dans le rotor SW 40 de lysats alcalins obtenus à partir des souches M 11 (R P 4) (marquée au tritium) et J 53 (R P 4) (marquée au carbone 14). Les flèches indiquent le changement d'échelle.

Dans certains gradients effectués avec les lysats des souches M 11 S et M 11 (R P 4), nous avons remarqué de façon non reproductible un pic à la fraction 47 (figure 10) ; celui-ci doit correspondre soit à un ADN extrachromosomique d'une taille supérieure à celui déjà mis en évidence, soit à un dimère ou trimère de ce dernier (ces polymères de plasmides, appelés caténanes, peuvent apparaître dans certains cas à la suite d'erreurs de réplication : figure 11 ; 40).

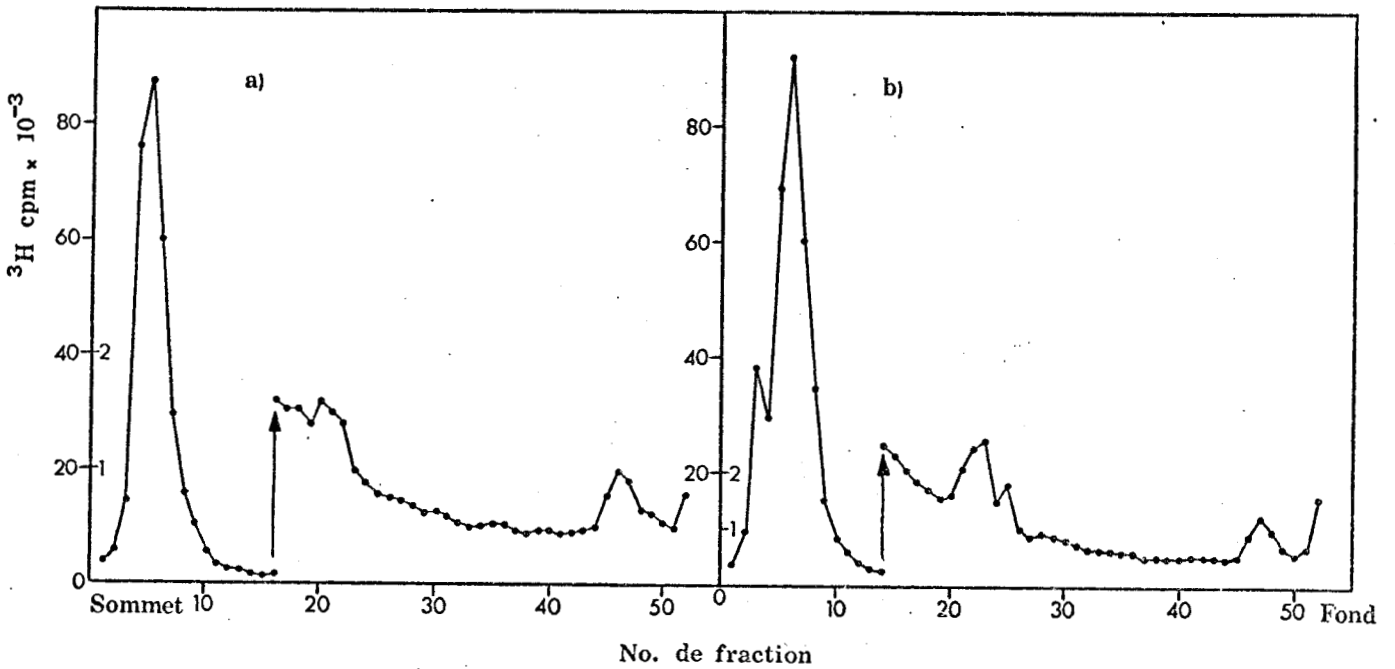


Figure 10 : Centrifugation en gradient alcalin de saccharose pendant 40 mn à 37 000 tours par mn et à 4° C dans le rotor SW 40 de lysats alcalins obtenus à partir des souches : a) M 11 S ; b) M 11 (R P 4). La flèche indique le changement d'échelle. Observation d'un troisième pic à la fraction 47.

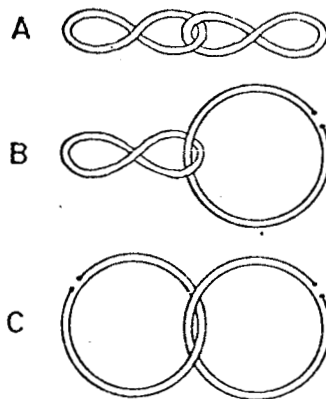


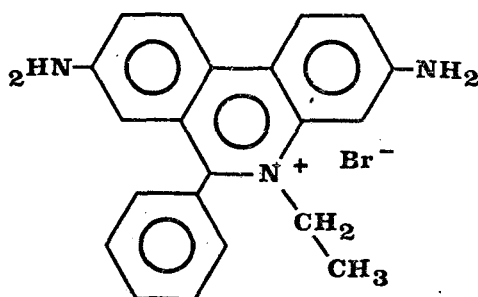
Figure 11 : Représentation schématique des caténanes. A, B, et C montrent différents types de dimères intriqués l'un dans l'autre ; d'après BOUANCHAUD (11).

Nous avons tenté de confirmer ces résultats par l'analyse de lysats neutres en gradients de chlorure de césium, après fixation de bromure d'éthidium sur l'ADN.

2) Détection de plasmides en gradients de CsCl-bromure d'éthidium

a. Principe

Cette technique de séparation par centrifugation à l'équilibre, mise au point par RADLOFF et coll. (76), est basée sur les propriétés particulières de la forme circulaire fermée superhélicoïdale d'ADN de cellules cancéreuses, identique à celle des plasmides. Le colorant bromure d'éthidium a été employé, dont la formule est la suivante :



Ce composé a la capacité de s'insérer entre les paires de bases adjacentes de l'ADN, d'où une diminution du pas de l'hélice formée par les deux brins et la longueur de la fibre d'ADN augmente, ce qui résulte en une baisse de la densité apparente de flottation en gradient de CsCl.

Les formes circulaire "ouverte" et linéaire des ADN plasmidique et chromosomique que nous avons vues dans la figure 3 se comportent de la même façon en fixant une quantité importante de bromure d'éthidium, tandis que l'intercalément de ce produit entre les paires de bases de l'ADN sous configuration circulaire fermée superhélicoïdale est limité du fait des contraintes physiques existant dans la molécule, d'où une baisse plus faible

de la densité apparente. Les molécules plasmidiques sous cette forme sont donc bien séparées de la masse de l'ADN chromosomique après centrifugation à l'équilibre en gradient de CsCl. Les bandes d'ADN sont visibles dans le gradient par illumination des complexes ADN-bromure d'éthidium en U.V. à 366 nm (fluorescence).

b. Application aux lysats neutres de R. meliloti

Les lysats obtenus à pH 8 à partir des 7 souches étudiées ont été soumis à cette méthode ; nous avons utilisé comme témoin la souche d'E. coli J 53 (R P 4), lysée par la même technique que celle employée pour R. meliloti, l'incubation préalable en présence de carbénicilline n'étant pas nécessaire pour E. coli.

Après centrifugation, les gradients ont été illuminés à 366 nm ; nous avons remarqué :

- deux bandes fluorescentes pour les souches J 53 (R P 4), M 5 N 1, M 11 S, M 22 str et 1.5.

- une seule bande large pour la souche 2011 str3

- une seule bande pour les souches M 9 S et M 12 S.

L'analyse des gradients après collecte et comptage de la radioactivité montre l'existence d'ADN plasmidique pour les souches M 5 N 1, M 11 S et M 22 str (figures 12 et 13) ; un épaulement est observé pour la souche 1.5 (figure 13), qui peut être dû au fait que celle-ci est imparfaitement lysée par la technique de LEDEBOER et coll. (58), d'où un mauvais rendement.

Pour la souche 2011 str 3, un important pic d'ADN fixant moins de bromure d'éthidium et proche du pic principal est mis en évidence (figure 14) ce qui est assez surprenant puisque tous les gradients alcalins de saccharose, effectués avec cette souche, ne conduisent à aucune détection d'ADN satellite.

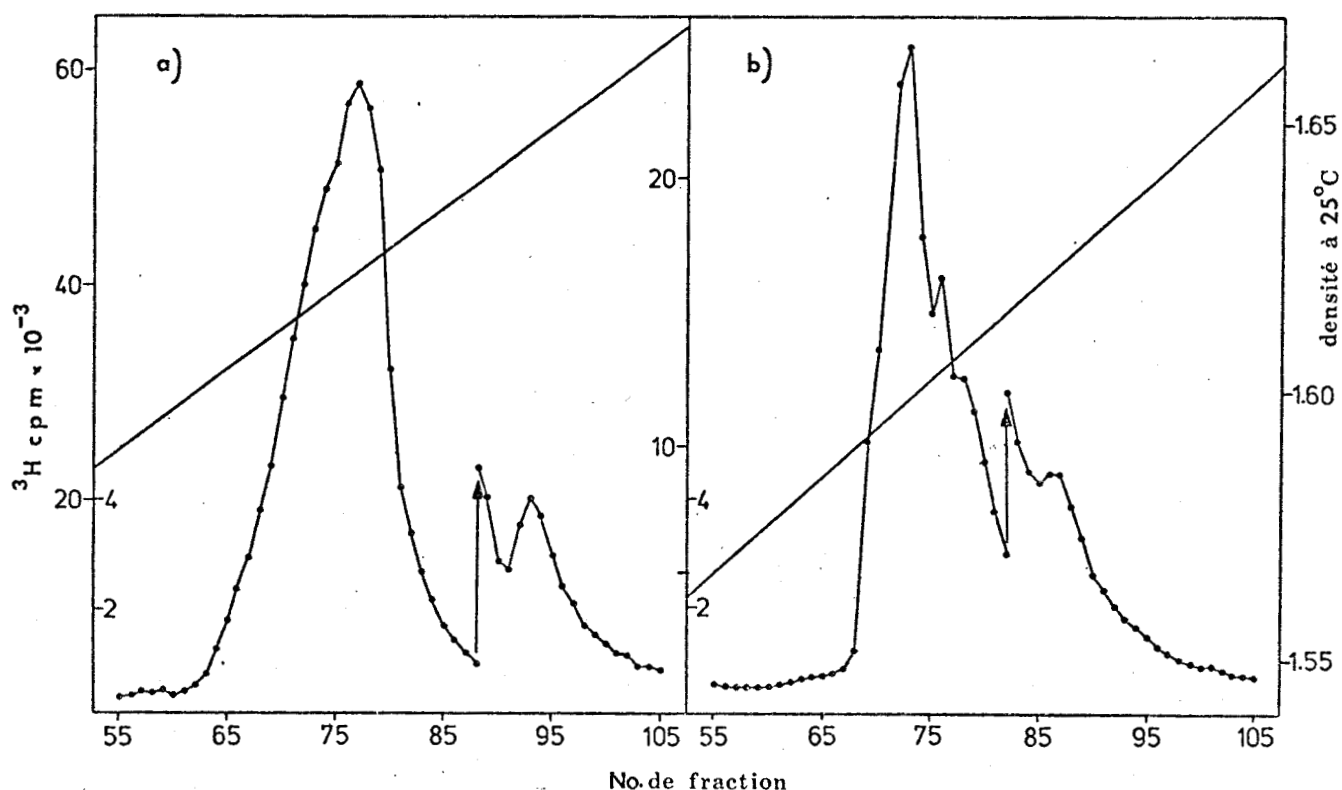


Figure 12 : Centrifugation analytique en gradient de CsCl/bromure d'éthidium des lysats neutres obtenus à partir des souches : a) M 5 N 1 ; b) M 11 S. Des fractions de 42 μ l. sont collectées. La flèche indique le changement d'échelle.

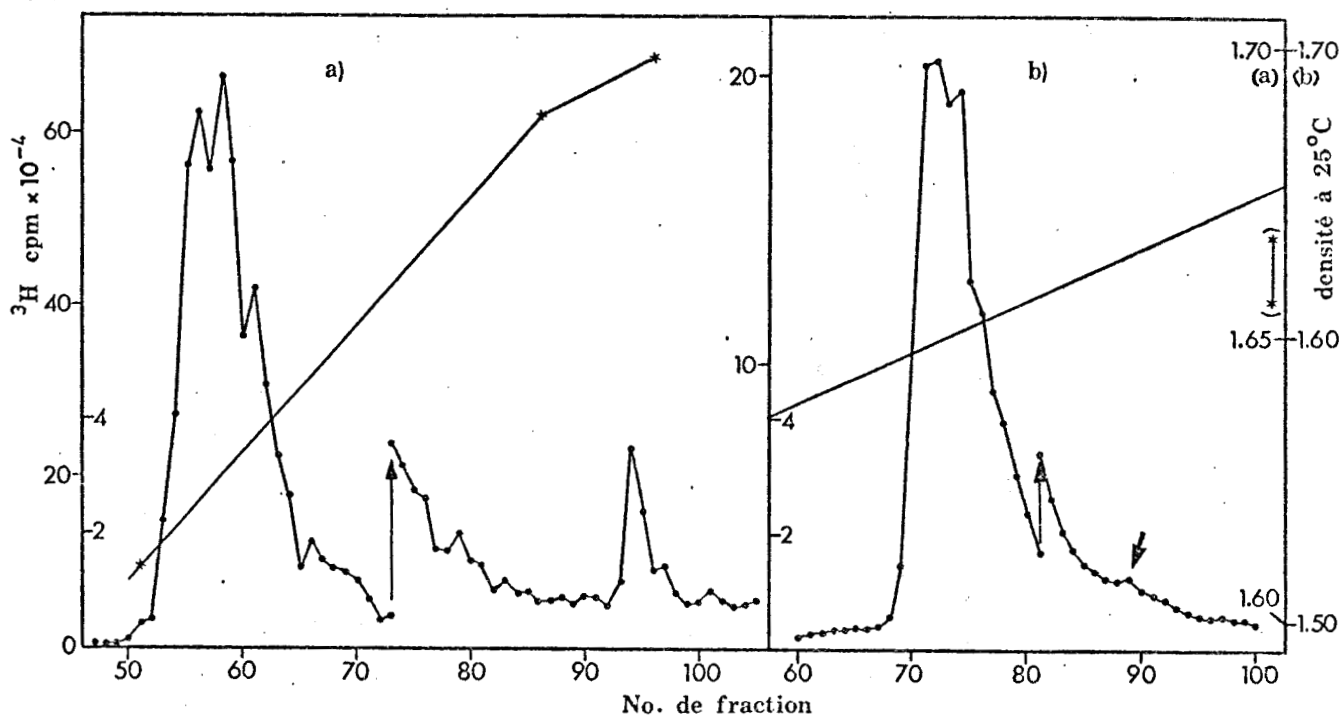


Figure 13 : Centrifugation analytique en gradient de CsCl/bromure d'éthidium des lysats neutres obtenus à partir des souches : a) M 22 str ; b) 1.5. Des fractions de 48 et 43 μ l. sont collectées. La flèche indique le changement d'échelle.

Cette séparation est obtenue en gradient de CsCl - bromure d'éthidium après lyse des cellules à 0°C ; elle ne l'est pas si la lyse est réalisée à 37°C, que ce type de gradient soit fait avec le lysat ou l'ADN purifié par une centrifugation préalable en gradient neutre de CsCl.

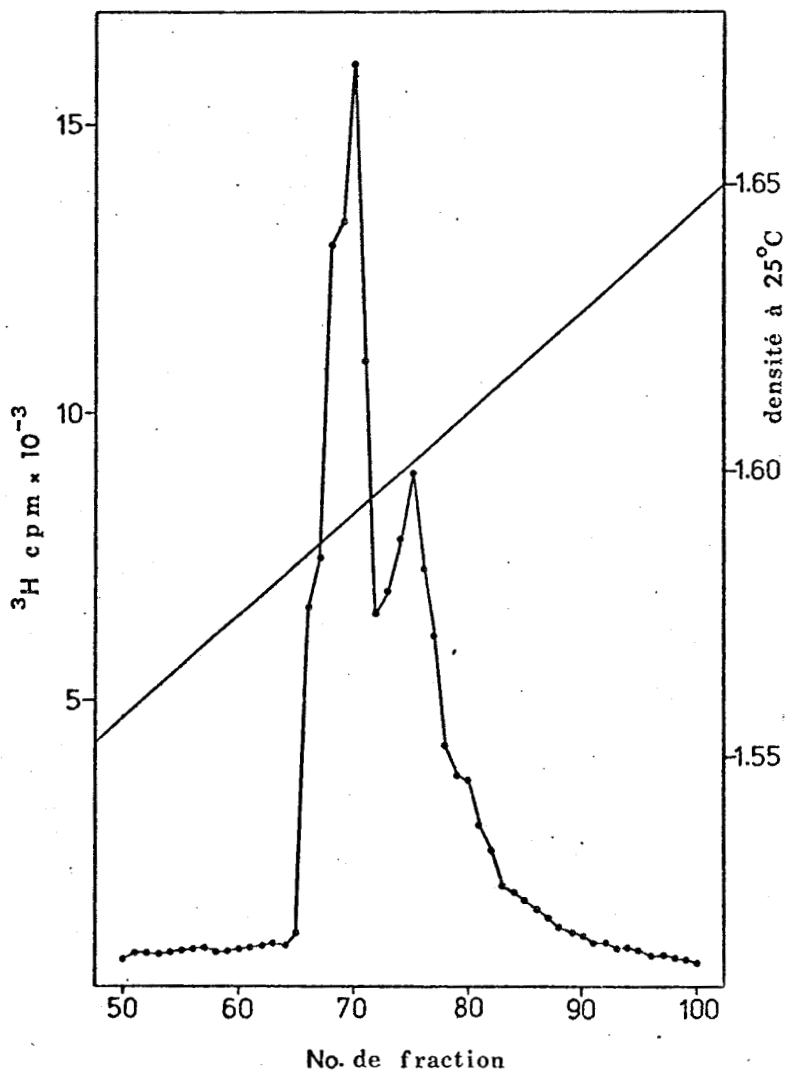


Figure 14 : Centrifugation analytique en gradient de CsCl/bromure d'éthidium du lysat neutre obtenu à partir de la souche 2011 str 3. Des fractions de 42 μl sont collectées.

Enfin, en ce qui concerne les souches M 9 S et M 12 S, aucun pic d'ADN extrachromosomique n'a été remarqué (figure 15).

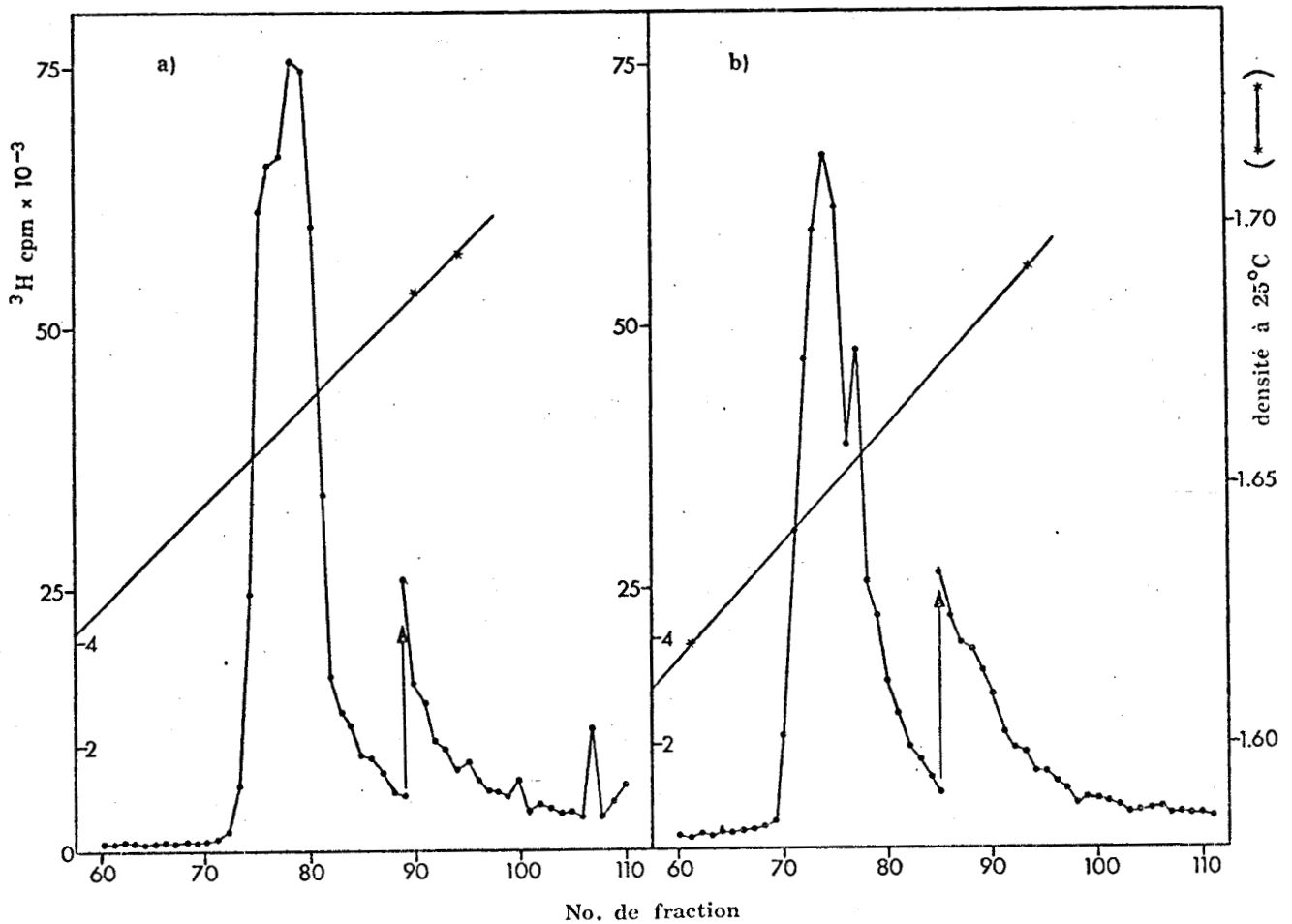


Figure 15 : Centrifugation analytique en gradient de CsCl/bromure d'éthidium des lysats neutres obtenus à partir des souches : a) M 9 S ; b) M 12 S. Des fractions de 48 et 40 μ l sont collectées. La flèche indique le changement d'échelle.

3) Recherche de résistance aux antibiotiques

L'antibiogramme des 7 souches étudiées a été effectué (28 disques appartenant aux différentes familles d'antibiotiques). Il en résulte que ces souches montrent un comportement d'ensemble assez uniforme et qu'aucune résistance particulière ne se dégage d'une souche par rapport aux autres.

4) Essais d'élimination par des agents curatifs

Nous avons utilisé 3 souches portant un témoin interne, le plasmide R P 4 : M 5 N 1 (R P 4), M 11 (R P 4) et M 22 str (R P 4). Les souches ont été inoculées (environ 10^4 cellules par ml) dans le milieu RC glucosé pH 7,6 contenant des produits connus pour leur pouvoir d'élimination

des plasmides : acridine orange, acriflavine, bromure d'éthidium et SDS, à concentrations variables. Les cultures se développent en présence de doses sub-bactériostatiques de ces produits (par exemple, la souche M 22 str (R P 4) tolère jusqu'à 25 µg/ml de bromure d'éthidium) ont été diluées, étalées sur R C G glucosé et repliquées ensuite sur ce même milieu renfermant 10 µg/ml de tétracycline. Nous n'avons repéré aucun clone qui ait perdu la résistance à cet antibiotique ; le plasmide R P 4 n'a donc pas été éliminé de ces 3 souches ; en ce qui concerne le plasmide indigène de celles-ci, nous ne pouvons pas déterminer s'il en a été de même, du fait de l'absence de caractère marqueur.

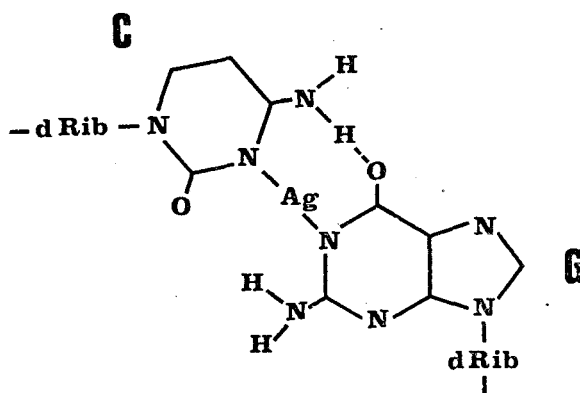
IV ANALYSE DE L'ADN EN GRADIENTS DE Cs_2SO_4 APRES FIXATION D'IONS Ag^+

Notre étude physico-chimique de l'ADN de R. meliloti a été complétée par l'emploi de la technique de centrifugation à l'équilibre en gradients de sulfate de césium après réaction d'ions Ag^+ avec l'ADN, afin de voir s'il n'existait pas une hétérogénéité dans la composition en bases de l'ADN extrait de quelques souches.

1) Principe

Contrairement aux deux premières techniques de mise en évidence des plasmides qui sont basées sur les propriétés de la forme circulaire fermée superhélicoïdale, cette méthode, élaborée par JENSEN et DAVIDSON (51) tient uniquement compte de la composition en bases de l'ADN. Elle conduit à une meilleure séparation de molécules de densité apparentes très proches, pour laquelle une centrifugation en gradient neutre de CsCl ne suffit pas.

Les ions Ag^+ se fixent d'autant mieux sur l'ADN que celui-ci est riche en guanine et cytosine ; l'augmentation de la densité apparente de flottation qui en résulte serait due à un changement du taux d'hydratation du complexe ADN - Ag^+ ; cependant, il y a saturation de l'ADN en ions Ag^+ si le rapport molaire $\text{Ag}^+/\text{ADN} - \text{phosphate}$ atteint la valeur de 0,5, et le complexe ADN - Ag^+ précipite à un pH acide. Les ions Ag^+ se lient entre les deux bases comme le montre la figure ci-dessous :



La centrifugation à l'équilibre s'effectue en gradient de Cs_2SO_4 car les ions Ag^+ réagissent avec le CsCl ; l'ADN doit être soigneusement dialysé et mis en solution dans un tampon neutre vis-à-vis des ions Ag^+ : le sulfate de sodium est préconisé. Il est nécessaire d'homogénéiser immédiatement le mélange ADN-nitrate d'argent pour éviter une répartition irrégulière des ions Ag^+ le long de la chaîne d'ADN.

2) Analyse de l'ADN purifié de R. meliloti

Un rapport molaire $\text{Ag}^+/\text{ADN} - \text{phosphate}$ de 0,35 a été choisi ; pour une quantité de 20 μg d'ADN, nous avons calculé qu'il fallait ajouter 4 μg de nitrate d'argent. Cette correspondance a été vérifiée en diminuant de moitié la dose d' AgNO_3 d'une part et en la doublant d'autre part. Dans le premier cas, la bande d'ADN se trouve à une densité de 1,428 g/ml après

centrifugation, ce qui est pratiquement celle observée dans un gradient neutre de Cs_2SO_4 ; dans le deuxième cas, l'ADN est retrouvé dans le fond du tube (densité supérieure à 1,697 g/ml) : il y a donc saturation par les ions Ag^+ avec précipitation du complexe ADN-Ag.

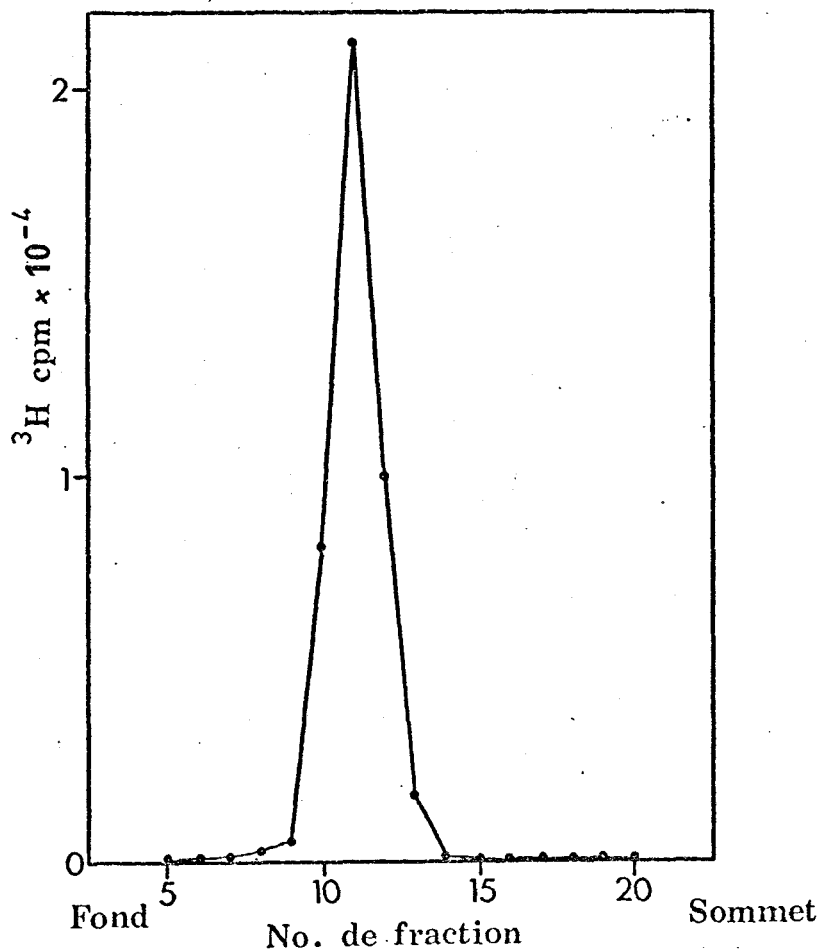


Figure 16 : Exemple de gradient préparatif de CsCl . L'ADN est collecté en perçant le fond du tube (fractions de 4 gouttes) ; la radioactivité est déterminée sur des parties aliquotes de 10 μl . Les fractions 7 à 17 sont récupérées.

Cette technique, appliquée à de l'ADN obtenu par un gradient préparatif de CsCl (figure 16) après lyse à 37°C de la souche 2011 str 3, montre l'existence de deux pics séparés par deux fractions (figure 17) ; ceux-ci sont très proches l'un de l'autre et on pouvait craindre qu'ils correspondent à une erreur de collecte ou de comptage sur une ou deux fractions ; cependant, ces deux pics sont mis en évidence de façon reproduc-

tible avec 3 autres préparations d'ADN de cette souche.

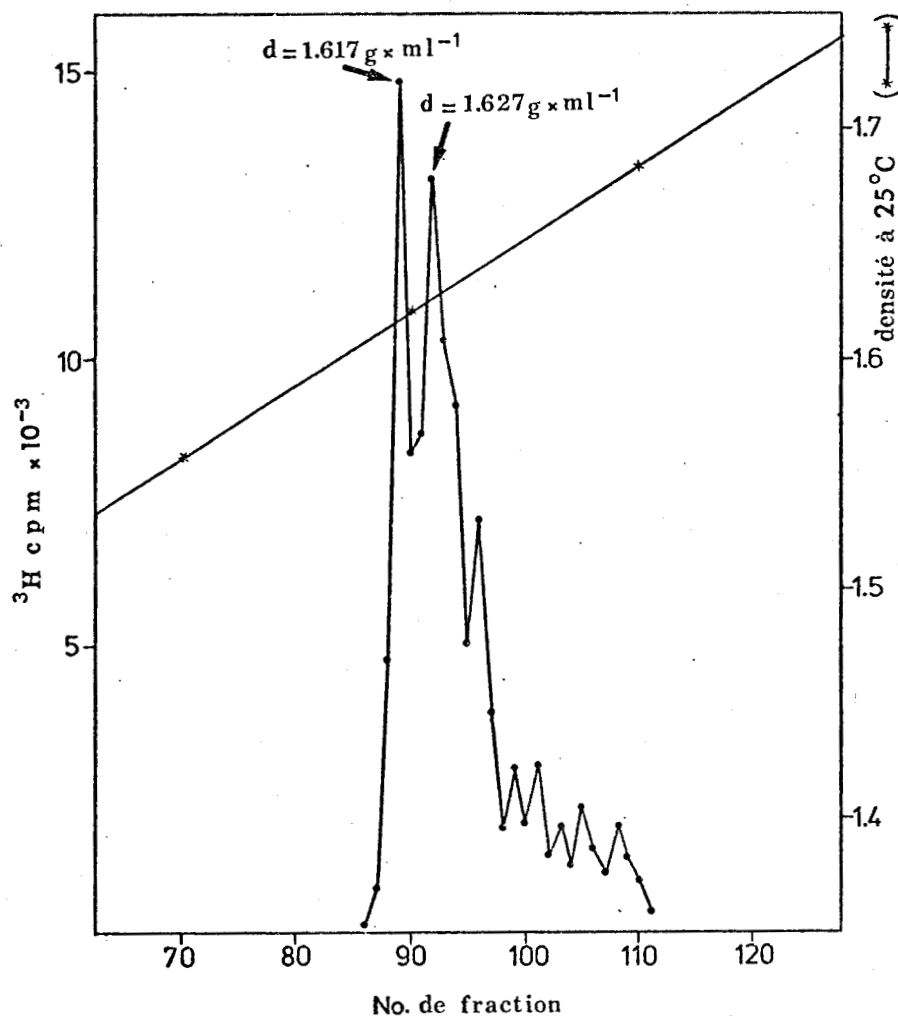


Figure 17 : Centrifugation analytique en gradient de $\text{Cs}_2\text{SO}_4 - \text{Ag}^+$ de l'ADN tritié de la souche 2011 str 3 provenant d'un gradient préparatif de CsCl ($20 \mu\text{g}$ d'ADN dans Na_2SO_4 10^{-2} M). Des fractions de $38 \mu\text{l}$ sont collectées. Des parties aliquotes d'un volume connu sont prélevées pour déterminer la densité à 25°C .

Afin de voir si notre procédé de gradient préparatif d'ADN ne produisait pas un artéfact, nous avons analysé de l'ADN tritié d'E. coli HfrC Thy⁻ dans les mêmes conditions ; un seul pic a été observé (figure 18).

Cette expérience a été également réalisée avec de l'ADN non radioactif des souches M 9 S et M 11 S. Les profils obtenus par lecture à 254 nm montrent la présence de deux pics (figure 19).

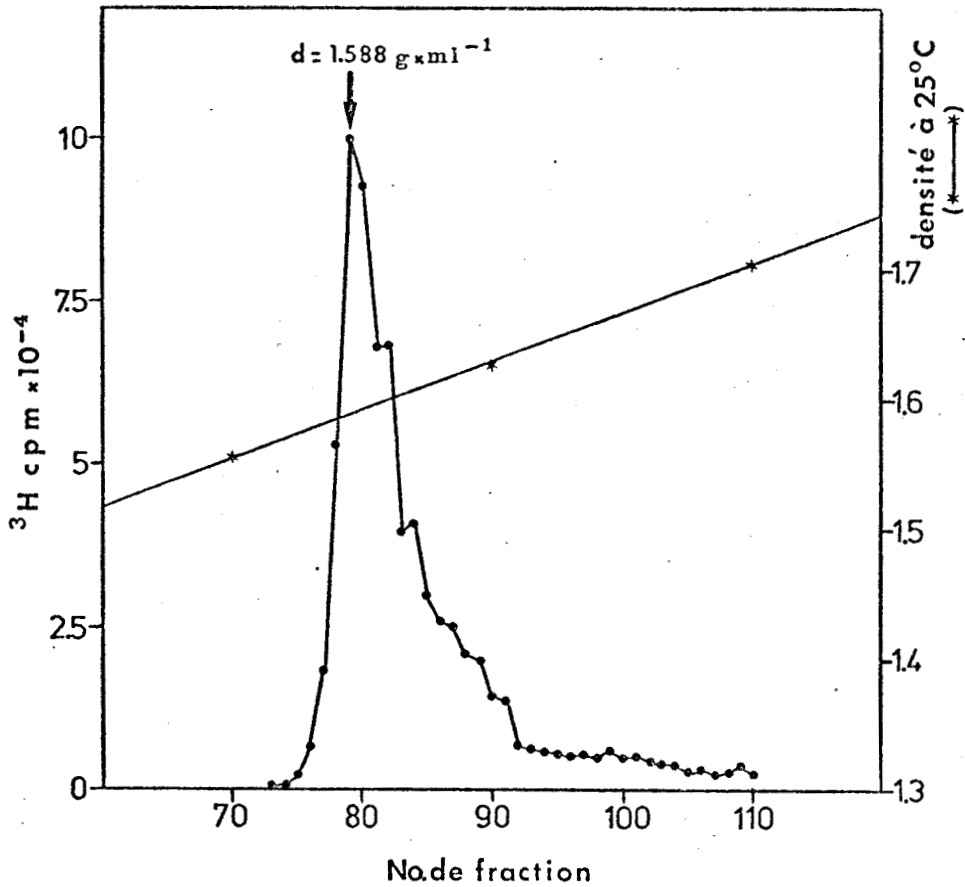


Figure 18 : Centrifugation analytique en gradient de $\text{Cs}_2\text{SO}_4 - \text{Ag}^+$ de l'ADN tritié de la souche d'*E. coli* Hfr C Thy⁻⁴ provenant d'un gradient préparatif de CsCl (10 μg d'ADN). Des fractions de 42 μl sont collectées.

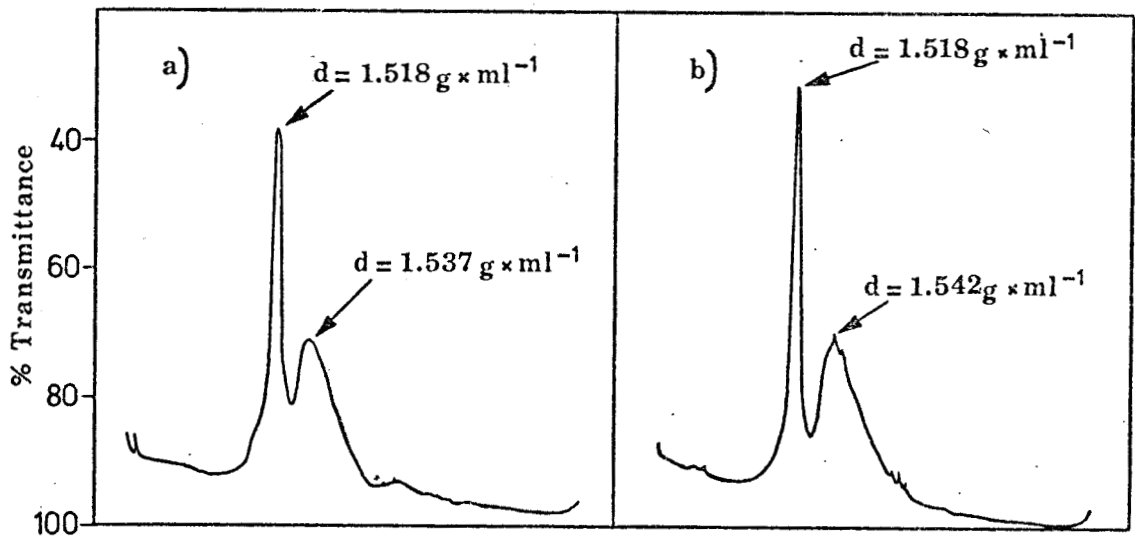


Figure 19 : Centrifugation analytique en gradient de $\text{Cs}_2\text{SO}_4 - \text{Ag}^+$ de l'ADN provenant de gradients préparatifs de CsCl des souches : a) M 9 S ; b) M 11 S (20 μg d'ADN). Les profils de 254 nm sont obtenus grâce à un fractionneur de gradient associé à un absorptiomètre-analyseur de type ISCO. La pente des gradients est tracée à partir des deux densités extrêmes.

Il est à noter qu'il est difficile de retrouver des densités apparentes identiques d'une préparation d'ADN à une autre, à cause des faibles quantités des produits en présence et de la grande sensibilité de la méthode au rapport des concentrations en ions Ag^+ et en ADN.

Tous les résultats des différents types de gradients que nous avons effectués sont récapitulés dans le tableau IV.

SOUCHE de <u>R. meliloti</u>	Saccharose alcalin 5 - 20 % (rotor SW 40 ; 37 000 tours / mn)			CsCl - bromure d'éthidium (rotor SW 50.1)	Cs ₂ SO ₄ - Ag ⁺ (rotor SW 50.1)
	10 mm	17 mm	40 mm 80 mm		
M 5 N 1	n.e. ^a	1	2	n.e.	n.e.
M 9 S	n.e.	1	1	1	37° C : 2
M 11 S	n.e.	1	2 (3) ^c	n.e.	37° C : 2
M 12 S	n.e.	1	1	1	n.e.
M 22 str	n.e.	2	1	n.e.	n.e.
2011 str 3	1	1	1	1	n.e. 0° C : 2 37° C : 2
1.5	n.e.	1	2	n.e.	n.e.
M 5 N 1 (R P 4)	n.e.	n.e.	3	n.e.	n.e.
M 11 (R P 4)	n.e.	n.e.	2 (3) ^c	n.e.	n.e.
M 22 str (R P 4)	n.e.	n.e.	2*	n.e.	n.e.
2011 str 3 (R P 4)	n.e.	n.e.	2*	n.e.	n.e.
1.5 (R P 4)	n.e.	n.e.	3	n.e.	n.e.

TABLEAU IV : Récapitulation des résultats obtenus (nombre de pics observé).

LEGENDES : * température de lyse ; ** rotor SW 50.1 ; a : n.e. = non effectué ; b : (2) = épaulement pour la souche 1.5 ; c : (3) = trois pics observés de façon inconstante.



Discussion

La présence d'ADN extrachromosomique ou d'une hétérogénéité dans l'ADN de R. meliloti a été étudiée dans le but d'élucider la répartition de l'information génétique contenue dans cette bactérie.

En un premier temps, nous avons effectué des gradients neutres de CsCl qui ne nous ont pas permis de mettre en évidence une hétérogénéité dans l'ADN de la souche 2011 str 3. Ceci est sans doute dû au faible pouvoir de séparation de cette technique lorsque des molécules d'ADN ayant une différence minime de contenu en bases sont en présence. Cependant, nous avons pu déterminer la densité apparente de flottation de l'ADN de cette souche et de celui des bactéroïdes en provenant (figure 2) ; aucune différence significative de composition en bases n'a été remarquée. Ceci concorde avec les résultats observés par SUTTON (87) chez Rhizobium de Lotus et par REIJNDERS et coll. (77) chez R. leguminosarum. Par contre, AGARWAL et METHA (1) ont observé une densité apparente de l'ADN plus faible pour les bactéroïdes de souches de Rhizobium isolées de Phaseolus aureus et Cicer arietinum. L'identité de densité apparente de l'ADN de ces deux formes extrêmes du Rhizobium n'est pas une preuve suffisante pour affirmer qu'il n'y a pas de changement physique dans le matériel génétique lors du passage de la bactérie libre vers la forme bactéroïde. En effet, un contenu en ADN plus important dans le bactéroïde (jusqu'à 7 fois plus) a été constaté par plusieurs auteurs (7, 75, 89) par la technique de cytofluorométrie.

La méthode de MARMUR (66) d'abord employée pour extraire l'ADN étant trop destructive pour conserver la structure tertiaire des plasmides, nous avons recherché un procédé convenable de lyse douce de R. meliloti ; les techniques utilisées chez E. coli s'étant avérées infructueuses, même

en faisant varier plusieurs paramètres, nous avons employé pour commencer une méthode de lyse à 37°C (voir "Matériel et méthodes" § IV-2). Celle-ci convient parfaitement à la préparation d'ADN en gradient de CsCl mais sa durée et la température élevée sont préjudiciables à la structure tertiaire des plasmides. Seule la technique à la carbénicilline puis au lysozyme à basse température de LEDEBOER et coll. (58), modifiée pour la lyse alcaline par NUTI et coll. (74) conduit à des résultats dans l'ensemble satisfaisants. Comme ces auteurs, nous avons remarqué que la lyse alcaline était plus efficace que la lyse neutre ; néanmoins, cette dernière nous a permis de mettre en évidence des plasmides en gradient de CsCl - bromure d'éthidium. Tout ceci montre que R. meliloti se comporte à ce sujet comme les autres espèces de Rhizobium et aussi comme A. tumefaciens.

La récapitulation des résultats dans le Tableau IV permet de faire les constatations suivantes :

a. des plasmides sont présents chez les souches M 5 N 1, M 11 S M 22 str et 1.5 d'après les gradients alcalins de saccharose (figures 5 et 7) ; ceci est confirmé pour les trois premières souches par centrifugation en gradient de CsCl - bromure d'éthidium (figures 12 et 13). Pour la souche 1.5, un épaulement est observé dans ce dernier type de gradient, avec pour cause probable le mauvais rendement de la lyse neutre pour celle-ci.

b. chez la souche M 11 S et son dérivé M 11 (R P₄), un second pic d'ADN à sédimentation plus rapide a été remarqué de façon inconstante en gradient alcalin de saccharose (figure 10). Nous pensons qu'il correspond à la présence d'un ADN extrachromosomique de taille plus importante que celui régulièrement mis en évidence chez la souche M 11 S, mais de taille inférieure à celui de la souche M 22 str (puisque une centrifugation de 17 mn dans les mêmes conditions du lysat alcalin de la souche M 11 S ne montre

aucun pic à sédimentation rapide). Il se peut aussi que ce pic soit dû à la formation irrégulière de caténanes.

c. aucun pic à sédimentation rapide en gradient alcalin de saccharose n'a été repéré pour les trois souches M 9 S, M 12 S et 2011 str 3 ; ceci peut être la conséquence soit :

- . de l'absence d'ADN extrachromosomique ;
- . de l'existence d'un plasmide de taille trop importante pour résister aux conditions de lyse alcaline (qui permettent de mettre en évidence des plasmides jusqu'à un poids moléculaire de 350 Mdal) ;
- . d'une durée de centrifugation insuffisante pour séparer un petit plasmide (nous avons centrifugé 80 mn sans observer de pic à sédimentation rapide).

Ces résultats ont été confirmés en gradient de CsCl - bromure d'éthidium pour les souches M 9 S et M 12 S ; cependant, pour la souche 2011 str 3, des molécules d'ADN superhélicoïdales formant un pic assez important (environ 7,3 % de la radioactivité totale ; figure 14) sont mises en évidence. Ce cas particulier peut être dû soit :

- . à l'accumulation de copies d'un petit plasmide dans la cellule bactérienne ; par exemple, si ce petit plasmide est d'une taille de l'ordre d'un cinq centième de chromosome (environ 7 Mdal, en estimant la taille du chromosome autour de 3500 Mdal ; 100), cela ferait 36 copies par cellule avec un rendement de 100 % en formes circulaires fermées superhélicoïdales, ce qui est improbable.

. à l'existence d'un ADN extrachromosomique d'un poids moléculaire très élevé non mis en évidence en gradient alcalin de saccharose, en admettant un bon rendement en gradient de CsCl - bromure d'éthidium. Cette hypothèse paraît la plus vraisemblable.

d. la taille de ces plasmides est variable, si on la juge d'après les positions observées en gradients alcalins de saccharose ; la souche M 11 S renferme un plasmide d'un poids moléculaire légèrement inférieur à celui du plasmide R P 4 (36 Mdal;50) et peut-être un second d'une taille supérieure à ce dernier ; les plasmides des souches M 5 N 1 et 1.5 sont d'une taille très voisine et plus élevée que celle du R P 4. Enfin, la souche M 22 str possède un grand plasmide dont le poids moléculaire est un peu inférieur à celui de R. trifolii T 5 (350 Mdal) ; ces estimations ne sont valables que si les pics d'ADN à sédimentation rapide observés en gradients alcalins de saccharose sont composés de monomères de plasmides.

Nous avons tenté d'aborder les propriétés de ces molécules : contrairement à COLE et ELKAN (17) chez R. japonicum et DUNICAN et coll. (33) chez R. trifolii, nous n'avons pas pu mettre en évidence de résistance particulière à 28 antibiotiques testés. Des essais d'élimination de plasmide ont été effectués chez des souches renfermant un plasmide indigène et le plasmide R P 4 comme témoin interne.

Ces souches ont été obtenues par croisement entre E. coli J 53 (R P 4) et R. meliloti, et sont toujours efficaces sur plantules aseptiques de luzerne. Le plasmide R P 4 apparaît compatible avec le plasmide indigène des souches de R. meliloti (c'est-à-dire qu'il ne l'exclut pas de la cellule

et inversement), si on juge les résultats observés en gradients alcalins de saccharose pour les souches M 5 N 1 (R P 4) et 1.5 (R P 4) (figure 8). Nous n'avons pas réussi à obtenir des clones dépourvus de plasmide R P 4 et devenus sensibles à la tétracycline. Il est à noter que DUNICAN et coll. (33) ont pu éliminer le plasmide de résistance à la pénicilline d'une souche de R. trifolii par l'emploi de bromure d'éthidium à 100 µg/ml ; dans ces conditions, la croissance de nos souches est complètement inhibée. De plus, les plasmides de résistance aux antibiotiques sont assez peu sensibles à l'action des acridines, tandis que le SDS provoque la sélection de variants spontanés ayant perdu leur plasmide de résistance (79).

Ces deux agents curatifs ont toutefois permis à ZURKOWSKI et coll. (104) de supprimer l'infectivité chez R. trifolii. Récemment, JOHNSTON et coll. (52), en utilisant un plasmide conjugatif conférant une production de bactériocine chez une souche de R. leguminosarum et marqué par le transposon Tn 5 (résistance à la kanamycine) ont réussi à transférer à haute fréquence la capacité de noduler le pois à un mutant de R. leguminosarum non infectieux pour cette légumineuse ainsi qu'à d'autres espèces de Rhizobium. Ce caractère d'infectivité serait donc situé sur un plasmide.

En ce qui concerne les plasmides indigènes de nos souches, il est difficile d'estimer s'ils ont été éliminés par les agents curatifs que nous avons employés, puisque nous n'avons pas trouvé de caractère marqueur. Après traitement, quelques clones ont été pris au hasard et inoculés à des plantules aseptiques de luzerne ; ils n'avaient pas perdu leurs propriétés symbiotiques.

DUNICAN et coll. (33) ont émis l'hypothèse que les gènes nif étaient situés sur un plasmide. Nous ne sommes pas en mesure de lier cette propriété (ainsi que l'infectivité et la spécificité d'hôte) aux plasmides que nous avons mis en évidence chez R. meliloti. De plus, leurs tailles

nous paraissent trop différentes pour que ces molécules portent l'ensemble de l'information génétique codant pour les propriétés symbiotiques, si on compare avec le plasmide Ti d'A. tumefaciens, et compte-tenu de la grande diversité des tailles des plasmides observés chez les différentes espèces de Rhizobium (33, 57, 74, 105).

e. une hétérogénéité dans la composition en bases de l'ADN a été remarquée pour 3 souches par centrifugation en gradient de $Cs_2SO_4 - Ag^+$:

. pour la souche 2011 str 3, un grand pic de densité plus faible et représentant environ 13 % de la radioactivité totale a été séparé (figure 17) ; nous pensons qu'il correspond à un ADN extrachromosomique de poids moléculaire très élevé, ceci confirmant les résultats en gradients alcalins de saccharose et de CsCl-bromure d'éthidium effectués avec les lysats de cette souche.

. l'importance des pics observés pour les souches M 9 S et M 11 S (bien que ceux-ci soient exprimés en pourcentage de transmittance ; figure 19) est probablement due :

α) d'une part à l'existence d'un ADN extrachromosomique de poids moléculaire très élevé chez la souche M 9 S, non détecté par les deux autres techniques ;

β) d'autre part, à la présence de plusieurs copies par cellule du plasmide régulièrement mis en évidence chez la souche M 11 S, ou à l'existence d'un second ADN satellite de poids moléculaire supérieur et de composition en bases identique à celle du premier, ce qui serait en accord avec les observations faites de façon irrégulière en gradient alcalin de saccharose.

f. enfin, la souche M 12 S ne paraît pas posséder d'ADN extrachromosomique si on se réfère aux deux premiers types de gradients, seuls effectués.

En conclusion, de l'ADN extrachromosomique de taille variée a été mis en évidence chez 6 souches de R. meliloti ; pour deux d'entre elles (M 9 S et 2011 str 3), le poids moléculaire de leur ADN extrachromosomique semble très élevé ; ce dernier pourrait être qualifié de "chromosome surnuméraire" ; en effet, jusqu'à quelle taille de l'ADN extrachromosomique peut-il être appelé "plasmide" ? L'emploi de la microscopie électronique (15) serait intéressant pour déterminer la taille de ces molécules avec plus de précision ; nous n'avons pas employé celle-ci, puisque nous n'avons pas encore trouvé de phénotype pour ces plasmides, que nous considérons actuellement comme "cryptiques". La nécessité de rechercher et d'attribuer une fonction quelconque à ces molécules, utilisée ensuite comme moyen simple de repérage lors d'expériences de transferts génétiques et d'élimination, s'impose afin de pouvoir élucider leur rôle possible dans la symbiose Rhizobium-légumineuse.

Bibliographie

- (1) AGARWAL A.K. and S.L. METHA. 1974. Characterization of DNA from Rhizobium cells and their bacteroids from root nodules. Biochem. Biophys. Res. Comm., 60 : 257-265.
- (2) BECHET M. et J.B. GUILLAUME. 1978. Mise en évidence d'ADN extra-chromosomique chez Rhizobium meliloti. Can. J. Microbiol., 24 : 960-966.
- (3) BERGERSEN F.J. 1968. The symbiotic state in legume root nodules : Studies with soybean system. Transactions, 9th International Congress on Soil Science, Adelaide, Australia (International Soil Science Society), vol. 2 : 49-63.
- (4) BERGERSEN F.J. 1969. Nitrogen fixation in legume root nodules : biochemical studies with soybean. Proc. Roy. Soc. (London)B, 172 : 401-416.
- (5) BERINGER J.E. and D.A. HOPWOOD. 1976. Chromosomal recombination and mapping in Rhizobium leguminosarum. Nature, 264 : 291-293.
- (6) BISHOP P.E., F.B. DAZZO, E.R. APPELBAUM, R.J. MAIER and W.J. BRILL. 1977. Intergeneric transfer of genes involved in the Rhizobium-Legume symbiosis. Science, 198 : 938-939.
- (7) BISSELING T., R.C. VAN DEN BOS, A. VAN KAMMEN, M. VAN DEN PLOEG, P. VAN DUIJN and A. HOUWERS. Cytofluorometrical determination of the DNA contents of bacteroids and corresponding broth-cultured Rhizobium bacteria. J. Gen. Microbiol., 101 : 79-84.

- (8) BOMHOFF G.H., P.M. KLAPWIJK, H.C.M. KESTER, R.A. SCHILPEROORT, J.P. HERNALSTEENS and J. SCHELL. 1976. Octopine and nopaline : synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of Agrobacterium tumefaciens. Molec. Gen. Genet., 145 : 177-181.
- (9) BONNIER C. et J. BRAKEL. 1969. Lutte biologique contre la faim. Presses agronomiques de Gembloux, ASBL ed. Duculot S.A. : 102-105.
- (10) BORST P. and G.J.C.M. ROTTENBURG. 1965. Renaturation of mitochondrial DNA. Biochim. Biophys. Acta, 114 : 645-647.
- (11) BOUANCHAUD D.H. 1973. Aspects de l'hérédité non chromosomique chez les bactéries : structure, réplication et classification des plasmides de résistance aux antibiotiques. Bull. Inst. Pasteur, 71 : 49-73.
- (12) BOURGEOIS J.P. 1977. Recherche de plasmides sur différentes souches de Rhizobium à croissance rapide. Diplôme d'études approfondies de Biochimie. Université des Sciences et Techniques de Lille.
- (13) BRITTEN R.J. and R.B. ROBERTS. 1960. High-resolution density gradient sedimentation analysis. Science, 131 : 32-33.
- (14) CHEN A.P.T. and D.A. PHILLIPS. 1976. Attachment of Rhizobium to legume roots as the basis for specific interactions. Physiol. Plant., 38 : 83-88.
- (15) CLOWES R.C. 1972. Molecular structure of bacterial plasmids. Bacteriol. Rev., 36 : 361-405.

- (16) COHEN S.N. 1976. Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature*, 263 : 731-738.
- (17) COLE M.A. and G.H. ELKAN. 1973. Antibiotic resistance transfer in Rhizobium japonicum. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 4 : 248-253.
- (18) CURRIER T.C. and E.W. NESTER. 1976. Evidence for diverse types of large plasmids in tumor-inducing strains of Agrobacterium. *J. Bacteriol.*, 126 : 157-165.
- (19) CURRIER W.W. and G.A. STROBEL. 1977. The chemotactic behavior of trefoil Rhizobium. *FEMS Microbiol. Letters*, 1 : 243-246.
- (20) CURRIER W.W. and G.A. STROBEL. 1977. Chemotaxis of Rhizobium spp. to a glycoprotein produced by birdsfoot trefoil roots. *Science*, 196 : 434-436.
- (21) CUTTING J.A. and H.M. SCHULMAN. 1969. The site of heme synthesis in soybean root nodules. *Biochim. Biophys. Acta*, 192 : 486-493.
- (22) CUTTING J.A. and H.M. SCHULMAN. 1971. The biogenesis of leghemoglobin. The determinant in the Rhizobium-legume symbiosis for leghemoglobin specificity. *Biochim. Biophys. Acta*, 229 : 58-62.
- (23) DART P.J. and F.V. MERCER. 1964. The legume rhizosphere. *Arch. Microbiol.*, 47 : 344-378.
- (24) DART P.J. 1974. The infection process. The biology of nitrogen fixation (A. QUISPÉL, Editor). *Frontiers of Biology*, 33 : 381-429.

- (25) DATKO A.H. and G.A. MACLACHAN. 1968. Indolacetic acid and the synthesis of glucanases and pectic enzymes. *Plant. Physiol.*, 43 : 735-742.
- (26) DAZZO F.B. and D.H. HUBBELL. 1975. Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the Rhizobium-clover association. *Appl. Microbiol.*, 30 : 1017-1033.
- (27) DAZZO F.B., C.A. NAPOLI and D.H. HUBBELL. 1976. Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the Rhizobium-clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32 : 166-171.
- (28) DELATTRE J.M. et A. DELEPLANQUE. 1971. Etude des caractères physiologiques et biochimiques de 63 souches isolées de nodules de Légumineuses. *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, XXII : 215-230.
- (29) DE LEY J. and A. RASSEL. 1965. DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus Rhizobium. *J. Gen. Microbiol.*, 41 : 85-91.
- (30) DIXON R.O.D. 1969. Rhizobia (with particular reference to relationships with host plants). *Ann. Rev. Microbiol.*, 23 : 137-158.
- (31) DIXON R.A. and F.C. CANNON. 1976. Recent advances in the genetic of nitrogen fixation. Dans *Symbiotic nitrogen fixation in plants* (P.S. NUTMANN, Editor ; Cambridge University Press) : 3-24.
- (32) DUNICAN L.K. and F.C. CANNON. 1971. Genetic control of symbiotic properties in Rhizobium : evidence for plasmid control. *Plant and Soil, Special Volume* : 73-79.

- (33) DUNICAN L.K., F. O'GARA and A.B. TIERNEY. 1976. Plasmid control of effectiveness in Rhizobium : transfer of nitrogen-fixing genes on a plasmid from Rhizobium trifolii to Klebsiella aerogenes. Dans Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants (P.S. NUTMAN, Editor ; Cambridge University Press) : 77-90.
- (34) EVANS H.J. and L.E. BARBER. 1977. Biological nitrogen fixation for food and fiber production. What are some immediately feasible possibilities ? Science, 197 : 332-339.
- (35) FÄHRAEUS G. and H. LJUNGGREN. 1959. The possible significance of pectic enzymes in root hair infection by nodule bacteria. Physiol. Plant., 12 : 145-154.
- (36) FÄHRAEUS G. and K. SAHLMAN. 1977. The infection of root hairs of leguminous plants by nodule bacteria. A review of recent work and a discussion of possible mechanisms. Ann. Acad. R. Sci. Upsal., 20 : 103-137.
- (37) FALKOW S., J.A. WOHLHIETER, R.V. CITARELLA and L.S. BARON. 1964. Transfer of episomic elements to Proteus. I. Transfer of F-linked chromosomal determinants. J. Bacteriol., 87 : 209-219.
- (38) FERRAGUT C. 1976. Contribution à l'étude du GC % chez les bactéries. Application à un groupe d'entérobactéries apparentées au genre Citrobacter. Thèse de 3ème cycle n° 607. Université des Sciences et Techniques de Lille.

- (39) FREIFELDER D. 1970. Isolation of extrachromosomal DNA from bacteria. *Methods in Enzymology*, XXI : 153-163.
- (40) FUKU M. and J. INSELBURG. 1972. Electron microscopic studies of replicating and catenated colicin factor D1 DNA isolated from minicells. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 69 : 89-92.
- (41) GODSON G.N. A technique of rapid lysis for the preparation of Escherichia coli polyribosomes. *Methods in Enzymology*, XII A : 503-516.
- (42) GRESSHOFF P.M., M.L. STONICKI, J.F. EADIE and B.G. ROLFE. 1977. Viability of Rhizobium trifolii bacteroids from clover root nodules. *Plant Sci. Letters*, 10 : 299-304.
- (43) GUILLE E., F. QUETIER et T. HUGUET. 1968. Etudes des acides déoxyribonucléiques des végétaux. Formation d'un ADN nucléaire riche en G+C lors de la blessure de certaines plantes supérieures. *C.R. Acad. Sci. (Paris) Sér. D*, 266 : 836-838.
- (44) HEARST J.E. and J. VINOGRAD. 1961. The net hydration of T4 bacteriophage deoxyribonucleic acid and the effect of hydration on buoyant behavior in a density gradient at equilibrium in the ultracentrifuge. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 47 : 1005-1014.
- (45) 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.

- (46) HOOYKAAS P.J.J., P.M. KLAPWIJK, M.P. NUTI, R.A. SCHILPEROORT and A. RÖRSCH. 1977. Transfer of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to Rhizobium ex planta. J. Gen. Microbiol., 98 : 477-484.
- (47) IFFT J.B., D.H. VOET and J. VINOGRAD. 1961. The determination of density distribution and density gradients in binary solutions at equilibrium in the ultracentrifuge. J. Phys. Chem., 65 : 1138-1144.
- (48) JACOB F. et E.L. WOLLMAN. 1958. Les épisomes, éléments génétiques ajoutés. C.R. Acad. Sci. (Paris), 247 : 154-156.
- (49) JACOB F. et E.A. ADELBERG. 1959. Transfert de caractères génétiques par incorporation au facteur sexuel d'Escherichia coli. C.R. Acad. Sci. (Paris), 249 : 189-191.
- (50) JACOBY G.A., A.E. JACOB and R.W. HEDGES. 1976. Recombination between plasmids of incompatibility groups P-1 and P-2. J. Bacteriol., 127 : 1278-1285.
- (51) JENSEN R.H. and N. DAVIDSON. 1966. Spectrophotometric, potentiometric and density gradient ultracentrifugation studies of the binding of silver ion by DNA. Biopolymers, 4 : 17-32.
- (52) JOHNSTON A.W.B., J.L. BEYNON, A.V. BUCHANAN-WOLLASTON, S.M. SETCHELL, P.R. HIRSCH and J.E. BERINGER. 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of Rhizobium. Nature, 276 : 634-636.

- (53) KANESHIRO T., C.D. CROWELL and R.F. HANKARAN. Jr. 1978. Acetylene reduction activity in free-living cultures of rhizobia. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 28 : 27-31.
- (54) KEISTER D.L. 1975. Acetylene reduction by pure cultures of Rhizobia. *J. Bacteriol.*, 123 : 1265-1268.
- (55) KLEIN G.E., P. JEMISON, R.A. HAAK and A.G. MATTHYSSE. 1975. Physical evidence of a plasmid in Rhizobium japonicum. *Experientia*, 31 : 532-533.
- (56) KONDOROSI A., G.B. KISS, T. FORRAI, E. VINCZE and Z. BANFALVI. 1977. Circular linkage map of Rhizobium meliloti chromosome. *Nature*, 268 : 525-527.
- (57) KOWALCZUK E. and Z. LORKIEWICZ. 1977. Transfer of R1drd19 plasmid from Escherichia coli J53 to Rhizobium trifolii by conjugation. *Acta Microbiol. Polon. Ser. A*, 26 : 9-18.
- (58) LEDEBOER A.M., A.M.J. KROL, J.J.M. DONS, F. SPIER, R.A. SCHILPE-ROORT, I. ZAENEN, N. VAN LAREBEKE and J. SCHELL. 1976. On the isolation of TI-plasmid from Agrobacterium tumefaciens. *Nucleic Acids Research*, 3 : 449-463.
- (59) LENNOX E.S. 1965. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P₁. *Virology*, 1 : 190-206.
- (60) LJUNGGREN H. and G. FAHRAEUS. 1959. Effect of Rhizobium polysaccharide on the formation of polygalacturonase in lucerne and clover. *Nature*, 184 : 1578-1579.

- (61) LJUNGGREN H. 1969. Mechanism and pattern of Rhizobium invasion into leguminous roots hairs. *Physiol. Plant., Suppl. V* : 1-82.
- (62) LORKIEWICZ Z., R. RUSSA and T. URBANIK. 1978. Nitrogen fixation by Rhizobium in pure cultures. *Acta Microbiol. Polon.*, 27 :5-9.
- (63) LUDLUM D.B. and R.C. WARNER. 1965. Equilibrium centrifugation in cesium sulfate solution. *J. Biol. Chem.* 240 : 2961-2965.
- (64) LURIA S.E. and J.W. BURROUS. 1957. Hybridization between Escherichia coli and Shigella. *J. Bacteriol.* 74 : 461-476.
- (65) LUYINDULA N., G. TSHITENGE, P. LURQUIN et L. LEDOUX. 1975. Etude des plasmides de Rhizobium japonicum. *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 83 : 199-200.
- (66) MARMUR J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.*, 3 : 208-218.
- (67) MARSHALL K.C., R.H. CRUICKSHANK and H.V.A. BUSHBY. 1975. The orientation of certain root-nodule bacteria at interfaces, including legume root-hair surfaces. *J. Gen. Microbiol.*, 91 : 198-200.
- (68) Mc GREGOR A.N. and M. ALEXANDER. 1971. Formation of tumor-like structures on legumes roots by Rhizobium. *J. Bacteriol.*, 105 : 728-732.
- (69) MEADE H.M. and E.R. SIGNER. 1977. Genetic mapping of Rhizobium meliloti. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 74 : 2076-2078.

- (70) MOSSE B. 1964. Electron-microscope studies of nodule development in some clover species. *J. Gen. Microbiol.*, 36: 49-66.
- (71) NAPOLI C.A., F.B. DAZZO and D.H. HUBBELL. 1975. Production of cellulose microfibrils by Rhizobium. *Appl. Microbiol.*, 30 : 123-131.
- (72) NIEL C., J.B. GUILLAUME et M. BECHET. 1977. Mise en évidence de deux enzymes présentant une activité β -galactosidasique chez Rhizobium meliloti. *Can. J. Microbiol.*, 23 : 1178-1181.
- (73) NOVICK R.P., R.C. CLOWES, S.N. COHEN, R. CURTISS III, N. DATTA and S. FALKOW. 1976. Uniform nomenclature for bacterial plasmids : a proposal. *Bacteriol. Rev.*, 40 : 168-189.
- (74) NUTI M.P., A.M. LEDEBOER, A.A. LEPIDI and R.A. SCHILPEROORT. 1977. Large plasmids in different Rhizobium species. *J. Gen. Microbiol.*, 100 : 241-248 .
- (75) PAAU A.S., D. LEE and J.R. COWLES. 1977. Comparison of nucleic acid content in population of free-living and symbiotic Rhizobium meliloti by flow-microfluorometry. *J. Bacteriol.*, 129 : 1156-1158.
- (76) RADLOFF R., W. BAUER and J. VINOGRAD. 1967. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA : the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 57 : 1514-1520.
- (77) REIJNDERS L., L. VISSER, A.M.J. ALBERS, A. VAN KAMMEN and A. HOUWERS. 1975. A comparison of DNA from free living and endosymbiotic Rhizobium leguminosarum (strain PRE). *Biochim. Biophys. Acta*, 414 : 206-216.

- (78) ROUGE P. et L. LABROUE. 1977. Sur le rôle des phytohémagglutinines dans la fixation spécifique des souches compatibles de Rhizobium leguminosarum sur le Pois. C.R. Acad. Sci. (Paris) Sér. D, 284 : 2423-2426.
- (79) SALISBURY V., R.W. HEDGES and N. DATTA. 1972. Two modes of 'curing' transmissible bacterial plasmids. J. Gen. Microbiol., 70 : 443-452.
- (80) SANDERS R.E., R.W. CARLSON and P. ALBERSHEIM. 1978. A Rhizobium mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion. Nature, 271 : 240-242.
- (81) SCHILDKRAUT C.L., J. MARMUR and P. DOTY. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. J. Mol. Biol., 4 : 430-443.
- (82) SHANMUGAN K.T. and R.C. VALENTINE. 1975. Molecular biology of nitrogen fixation. Science, 187 : 919-924.
- (83) SIDLOI-LUMBROSO R., L. KLEIMAN and H.M. SCHULMAN. 1978. Biochemical evidence that leghemoglobin genes are present in the soybean but not in the Rhizobium genome. Nature, 273 : 558-560.
- (84) SKOTNICKI M.L. and B.G. ROLFE. 1978. Transfer of nitrogen fixation genes from a bacterium with the characteristics of both Rhizobium and Agrobacterium. J. Bacteriol., 133 : 518-526.

- (85) SOLHEIM B. and J. RAA. 1973. Characterization of the substances causing deformation of root hairs of Trifolium repens when inoculated with Rhizobium trifolii. J. Gen. Microbiol., 77 : 241-247.
- (86) STONINGTON O.G. and D.E. PETTIJOHN. 1971. The folded genome of Escherichia coli isolated in a protein - DNA - RNA complex. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 68 : 6-9.
- (87) SUTTON W.D. 1974. Some features of the DNA of Rhizobium bacteroids and bacteria. Biochim. Biophys. Acta, 366 : 1-10.
- (88) SUTTON W.D., N.M. JEPSEN and B.D. SHAW. 1977. Changes in the number, viability, and amino-acid-incorporating activity of Rhizobium bacteroids during lupin nodule development. Plant Physiol., 59 : 741-744.
- (89) SUTTON W.D., R.C. VAN DEN BOS and T. BISSELING. 1978. The DNA content of Rhizobium (strain NZP 2257) bacteroids and bacteria. Plant Sci. Letters, 12 : 145-149.
- (90) SZYBALSKI W. and E.H. SZYBALSKI. 1973. Buoyant densities of nucleic acids and polynucleotides. Handbook of Microbiology (A.I. LASKIN and H.A. LECHEVALIER, Editors ; CRC Press), II : 775-780.
- (91) TORREY J.G. 1961. Kinetin as a trigger for mitosis in mature endomitotic plant cells. Exptl. Cell. Res., 23 : 281-299.
- (92) TSHITENGE G., N. LUYINDULA, P.F. LURQUIN and L. LEDOUX. 1975. Plasmid deoxyribonucleic acid in Rhizobium vigna and Rhizobium trifolii. Biochim. Biophys. Acta, 414 : 357-361.

- (93) TSIEN H.C., P.S. CAIN and E.L. SCHMIDT. 1977. Viability of Rhizobium bacteroids. Appl. Environ. Microbiol., 34 : 854-856.
- (94) VAN LAREBEKE N., G. ENGLER, M. HOLSTERS, S. VAN DEN ELSACKER, I. ZAENEN, R.A. SCHILPEROORT and J. SCHELL. 1974. Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown-gall inducing ability. Nature, 252 : 169-170.
- (95) VAN LAREBEKE N., C. GENETELLO, J. SCHELL, R.A. SCHILPEROORT, A.K. HERMANS, J.P. HERNALSTEENS and M. VAN MONTAGU. 1975. Acquisition of tumor-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. Nature, 255 : 742-743.
- (96) VINCENT J.M. 1974. Root-nodule symbioses with Rhizobium. The biology of nitrogen fixation (A. QUISPTEL, Editor). Frontiers of Biology, 33 : 265-341.
- (97) VINOGRAD J., J. LEBOWITZ, R. RADLOFF, R. WATSON and P. LAIPIS. 1965. The twisted circular form of polyoma viral DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 53 : 1104-1111.
- (98) WATSON B., T.C. CURRIER, M.P. GORDON, M.D. CHILTON and E.W. NESTER. 1975. Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. J. Bacteriol., 123 : 255-264.
- (99) WOHLHIETER J.A., S. FALKOW, R.V. CITARELLA and L.S. BARON. 1964. Characterization of DNA from a Proteus strain harboring an episome. J. Mol. Biol., 9 : 576-588.

- (100) WORCEL A. and E. BURGI. 1972. On the structure of the folded chromosome of Escherichia coli. J. Mol. Biol., 71 : 127-147.
- (101) WRIGHT W.H. 1926. The nodule bacteria of soybeans. I-Bacteriology of strains. Soil Sci., 20 : 95- 129.
- (102) WULLSTEIN L.H., M.L. BRUENING, B.M. WULLSTEIN and M. SHERWOOD. 1975. Isolation and partial characterization of DNA in capsular preparations of Rhizobium trifolii. Physiol. Plant., 35 : 129-134.
- (103) ZAENEN I., N. VAN LAREBEKE, H. TEUCHY, M. VAN MONTAGU and J. SCHELL. 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing Agrobacterium strains. J. Mol. Biol., 86 : 109-127.
- (104) ZURKOWSKI W., M. HOFFMAN and Z. LORKIEWICZ. 1973. Effect of acriflavine and sodium-dodecyl sulphate on infectiveness of Rhizobium trifolii. Acta Microbiol. Polon. Ser. A, 5 : 55-60.
- (105) ZURKOWSKI W. and Z. LORKIEWICZ. 1976. Plasmid DNA in Rhizobium trifolii. J. Bacteriol., 128 : 481-484.

