

N° d'ordre : 841

50376
1980
19

50376
1980
19

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spécialité : "Amélioration des Productions Végétales et Microbiennes"

Option MICROBIOLOGIE

par

Hussain KHANAKA

SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES ET AUX ANTISEPTIQUES CHEZ RHIZOBIUM ET AGROBACTERIUM



030 023737 6

Soutenu le 11 juillet 1980 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury

MM. J. GUILLAUME

Président

R. TAILLIEZ

Rapporteur

J. KREMBEL

C. ROMOND

Examineurs

A mon frère JAWDAT,

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille sous la direction de Messieurs les Professeurs J. GUILLAUME et R. TAILLIEZ. Nous tenons à les remercier tout particulièrement de nous avoir accueilli. Leur confiance et leurs conseils judicieux nous ont permis la réalisation de ce travail. Nous leur exprimons toute notre gratitude et notre profond respect.

Nous remercions Monsieur le Professeur J. KREMBEL d'avoir accepté de siéger à notre Jury de thèse. Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Monsieur le Professeur C. ROMOND par l'intermédiaire de qui nous nous sommes procurés du matériel et qui nous a fait l'honneur de faire partie de notre Jury.

Nous exprimons également notre gratitude à Monsieur M. CATTEAU qui nous a apporté son aide et sa sympathie tout au long de cette étude.

Nos remerciements s'adressent à tous ceux, amis, collègues du laboratoire, et plus particulièrement à Monsieur M. BECHET qui nous a toujours apporté une aide et une collaboration précieuses.

Nous adressons nos remerciements au Service de l'Accueil des étudiants étrangers du C.R.O.U.S. ainsi qu'à Madame ROUY pour l'aide et la sympathie qu'ils m'ont dispensés.

Enfin, nous remercions Madame BONNIER qui a réalisé la dactylographie de notre mémoire.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS	1
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	6
BUT DU TRAVAIL	16

MATERIEL ET METHODES

A - MATÉRIEL

1 - Microorganismes	17
2 - Matériel végétal	23
3 - Milieux de culture	23
a) Milieu gélifié d'ISWARAN	23
b) Milieu TY	23
c) Milieu complet RC gélifié	24
d) Milieu de NICOL et THORNTON	24
4 - Antibiotiques	25
5 - Antiseptiques	27

B - MÉTHODES

1 - Réalisation des antibiogrammes et mesure des zones d'inhibition en milieu gélifié	28
2 - Détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide (C.M.I.)	28
3 - Réalisation des antiseptogrammes	30
4 - Tests de nodulation in vitro	30
a) Stérilisation des graines	31
b) Germination des graines	31
c) Inoculation des graines	32
d) Mise en culture	33
5 - Mise en évidence des plasmides par analyse électrophorétique	34
6 - Calculs et interprétations statistiques	35

RESULTATS

A - ÉTUDE DE LA RÉSISTANCE AUX SUBSTANCES ANTIBIOTIQUES	36
1 - Mise en évidence des relations existant entre les zones d'inhibition en milieu solide et la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide	37
2 - Distribution des valeurs de CMI pour l'ensemble des souches étudiées	44
3 - Répartition des souches résistantes	49
B - ANTISEPTIQUES	58
1 - Essais préliminaires	58
2 - Réalisation des antiseptogrammes	58

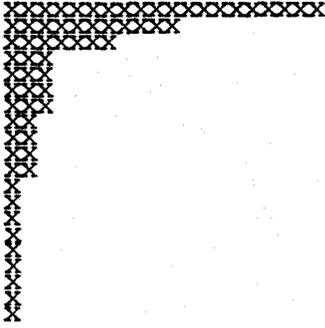
C - NODULATION 64

D - PLASMIDES 67

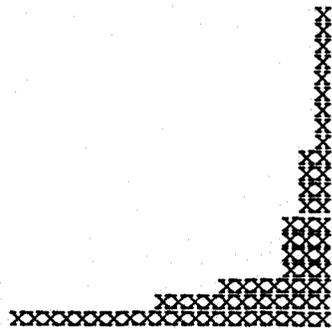
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE 68

ANNEXES 76

BIBLIOGRAPHIE



I N T R O D U C T I O N



AVANT - P R O P O S

L'association entre les Rhizobium et les légumineuses conduit à la formation de nodules sur le système racinaire des plantes, à l'intérieur desquels l'azote atmosphérique est transformé en azote organique. Cette symbiose est écologiquement très importante au niveau de la biosphère car elle contribue, pour une large part, à recycler l'azote moléculaire, perdu par dénitrification, dans de nouvelles structures organiques. Elle est aussi exploitée par certaines pratiques culturales afin d'enrichir le sol en matières organiques perdues par l'exportation intensive des récoltes. On estime ainsi que sur un hectare, les légumineuses peuvent fixer 50 à 300 kilogrammes de N_2 par an selon leur nature et l'efficacité de la symbiose, et que pour le globe terrestre, cette symbiose transforme plusieurs dizaines de millions de tonnes d'azote atmosphérique en azote protéique qui est principalement récupéré à partir de graines ou de fourrages (1).

Le cycle de l'azote est un des cycles les plus complexes et les plus parfaits à la fois. Cependant, malgré le grand nombre et la diversité des organismes qui interviennent, il assure une circulation rapide de l'azote dans les divers écosystèmes.

La seule réserve d'azote disponible dans le monde est l'azote contenu dans l'atmosphère. Cette réserve est estimée à 4 millions de milliards de tonnes. Le prélèvement annuel en azote représente 120 millions de tonnes comprenant principalement sa fixation par les plantes de la famille des légumineuses et sa transformation pour fabriquer des engrais azotés (2).

L'extrême importance économique de la fixation biologique de l'azote moléculaire ressort bien des calculs de LIPMAN et CONYBEARE (3) : ils évaluent pour la surface totale cultivée des USA que 60 % de l'azote fixé par les plantes étaient dûs en fait aux microorganismes : en effet, sur les 16,45 millions de tonnes d'azote atmosphérique transformé en matière biologique, 9,83 millions de tonnes sont dûs à l'action des microorganismes dont 5,46 millions de tonnes attribués aux espèces du genre Rhizobium. L'apport biologique azoté, même celui par le genre Rhizobium seul, dépasse de beaucoup l'apport dont sont responsables les engrais chimiques et fumures organiques qui n'interviennent respectivement que pour 6,48 et 2,57 millions de tonnes. Cependant, l'accord est encore loin d'être fait sur de tels chiffres et un bon nombre d'auteurs modernes tendent au contraire à minimiser le rôle de la fixation biologique, tout-au-moins par les bactéries non symbiotiques.

Dans les assolements céréales-luzerne, la luzerne (légumineuse infectée par Rhizobium meliloti) augmente les rendements céréaliers en augmentant la teneur en azote du sol et en supprimant les mauvaises herbes

tout en fournissant une nourriture plus abondante et meilleure au cheptel (4). Mis-à-part son emploi comme engrais vert, la luzerne contribue à l'enrichissement du sol, soit par excrétion radiculaire de produits azotés dans le sol, soit lors du détachement des nodules et par le reste de racines laissées au sol.

Dans les terres où on cultive et où se trouvent naturellement les légumineuses, la flore bactérienne correspondante existe. On peut améliorer son efficacité. Mais cette amélioration est limitée par les phénomènes de compétitivité entre la souche apportée et les bactéries indigènes qui sont plus résistantes aux agressions chimiques et biologiques du sol considéré.

Dans les terres vierges ou inadaptées à la culture d'une légumineuse donnée, il est nécessaire d'apporter les bactéries symbiotes en quantités suffisantes ; celles-ci doivent être non seulement adaptées aux conditions écologiques, mais aussi particulièrement efficaces.

Dans la biosphère, les principaux éléments d'importance biologique passent de manière cyclique de l'état organique à l'état minéral et vice-versa. Les cycles les mieux connus, ceux du carbone, du soufre et de l'azote maintiennent, à eux trois, un équilibre stable entre la biosphère de notre planète et la "chimiosphère". L'importance du cycle de l'azote pour l'agriculture est connue depuis fort longtemps : l'étape critique en est la fixation de l'azote, c'est-à-dire son passage de l'état moléculaire à l'état organique. Ce processus est dû essentiellement à des microorganismes associés en général aux racines des plantes.

La production d'engrais chimiques, qui aurait dû, à première vue, apporter une solution au problème de la nutrition et de la faim dans le monde ne l'a pas résolu, et ce pour deux raisons bien simples :

- en premier lieu, cette production d'engrais consomme une énergie dont le coût est d'autant plus élevé que les milliards d'habitants qui fourmillent sur terre la consomment pour toutes sortes d'utilisations technologiques, ou pour leur plaisir.

- en second lieu, elle requiert une industrie sophistiquée, donc de grands investissements en capitaux, des frais de maintenance et surtout de transport. (En simplifiant un peu, on peut dire que pour livrer des engrais chimiques azotés partout où ils sont nécessaires dans le monde, il faudrait mobiliser continuellement environ un tiers du tonnage maritime mondial, ce qui signifie un coût de transport astronomique).

Un autre problème est la "fuite" de l'engrais : seule une petite partie de l'engrais ammoniacal répandu sur le sol parvient aux plantes, car plus de la moitié, lors des étapes ultérieures du cycle, est oxydée en nitrates, qui sont peu retenus par le sol et tendent à être drainés et déversés dans les rivières, les lacs et même jusque dans l'eau souterraine (5).

L'eutrophisation des eaux peut s'ensuivre, avec tous les problèmes de pollution qui s'y rattachent ; de plus, une forte concentration de nitrate dans l'eau peut être toxique pour l'homme.

Ainsi donc, les problèmes démographiques et agricoles, les problèmes de la pollution et de la conservation de l'énergie attirent toute notre attention sur le phénomène de la fixation biologique de l'azote. Mais cette fixation pose aussi des problèmes conceptuels : comment, par exemple, font les bactéries, en sol froid, humide, aéré pour réduire l'azote en ammoniacal

quand l'industrie, pour la même opération, à besoin, elle, d'un grand apport d'énergie et des conditions anoxiques et anhydres. Pourquoi, seules les bactéries peuvent le faire ? Les réponses à de telles questions ne sont pas simples et mobilisent quelques-uns des meilleurs chercheurs du monde entier. Leurs recherches, qui peuvent par moment paraître bien éloignées des problèmes actuels de la faim dans le monde, offrent les seules solutions à long terme (5).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les Rhizobium dans le sol, à l'état libre, sont difficilement identifiables (1) et, actuellement encore, seule la propriété d'induire la formation de nodules sur le système racinaire de légumineuses permet de les reconnaître avec certitude. Ils ne participent d'ailleurs à aucune fonction spécifique dans l'équilibre et la vie microbienne du sol ou de la rhizosphère. L'association Rhizobium-légumineuse fait apparaître une extrême complexité dans les mécanismes biologiques et biochimiques entrant en jeu. Les principales propriétés caractéristiques du Rhizobium concernent son infectivité qui lui permet d'induire la formation des nodosités, son efficience qui caractérise l'aptitude à fixer l'azote, et sa spécificité d'hôte qui ne permet qu'à certaines souches d'entrer en symbiose avec une légumineuse donnée.

Les Rhizobium, au point de vue morphologique, se présentent sous forme de bâtonnets à Gram négatif généralement mobiles, tout au moins lorsque les cellules sont jeunes. Ils prolifèrent facilement aux températures voisines de 28° C et 30° C lorsque les milieux nutritifs contiennent du mannitol (6) comme source de carbone et de l'extrait de levure. La plupart des souches nécessitent, en effet, la présence de thiamine, d'acide pantothénique et surtout de biotine (7 , 8).

Sur gélose nutritive, ils donnent des colonies incolores, blanchâtres ou crème. Dans quelques cas, l'isolement de souches pigmentées a été effectué (1) mais comme la plupart, souvent après action d'un agent mutagène ont perdu tout pouvoir nodulant.

Le comportement des Rhizobium cultivés sur gélose nutritive permet de les séparer en deux types différents : ceux qui ont une croissance rapide donnant après quelques jours d'inoculation des colonies de plusieurs millimètres de diamètre, et ceux qui ont une croissance lente et sont incapables de former des colonies de diamètre supérieur à 1 millimètre. Cette distinction fondée sur la vitesse de croissance est en relation avec d'autres propriétés physiologiques et biochimiques. La séparation entre ces deux types de Rhizobium (voir le TABLEAU I , page 8 d'après VINCENT (9) , apparaît aussi dans les résultats des études taxonomiques (GRAHAM (10) ; MOFFETT et COLWELL (11)). Dans la dernière édition de la nomenclature internationale du Bergeys manual (Buchanan et Gibbons, (12)) ces Rhizobium sont classés avec les Agrobacterium dans la famille du Rhizobiaceae (ordre des Eubactériales) mais à l'exclusion des Chromobacterium qui en faisaient encore partie dans l'édition précédente (13) . En effet, les Agrobacterium étant capables d'interactions avec les végétaux en induisant des proliférations cellulaires de nature tumorale , ils s'apparentent facilement avec les Rhizobium alors que pour les Chromobacterium, les similitudes étaient beaucoup plus douteuses.

Au point de vue relations symbiotiques, on s'est rendu compte depuis très longtemps qu'une certaine spécificité existe entre les Rhizobium et les légumineuses-hôtes : un Rhizobium qui peut infecter le trèfle ne peut infecter le lupin et vice-versa (1). BONNIER (14) a montré que la spécificité de l'hôte peut dans certains cas être liée à l'efficacité, ainsi la souche efficace vis-à-vis de Medicago sativa présente une spécificité d'hôte plus étroite, plus stricte, qu'une souche non efficace pour

la même plante-hôte.

ESPECES	PLANTES-HOTES
<u>Rhizobium</u> à croissance rapide <u>R. leguminosarum</u> <u>R. meliloti</u> <u>R. phaseoli</u> <u>R. trifolii</u>	 <u>Pisum, cicer, Lens, Vicia</u> <u>Medicago, Melilotus</u> <u>Phaseolus</u> <u>Trifolium</u>
<u>Rhizobium</u> à croissance lente <u>R. japonicum</u> <u>R. lupini</u> <u>R. du " cow-pea group"</u>	 <u>Glycine</u> <u>Lupinus, Ornithopus</u> <u>Arachis, Lotus, Vigna</u>

TABLEAU I

Les différents groupes d'inoculation Rhizobium-légumineuses d'après VINCENT (9).

Cependant, l'implantation de la culture des légumineuses ne dépend pas seulement de la plante-hôte, du Rhizobium, mais également des



facteurs qui sont liés à l'environnement : des facteurs physico-chimiques (température, lumière, humidité), des facteurs biologiques parmi des facteurs chimiques : des sels minéraux comme le calcium. NORRIS (15) a montré le rôle important du carbonate de calcium dans un milieu de culture dans lequel il tamponne le milieu et il neutralise les produits acides synthétisés par les Rhizobium. Des taux en calcium supérieurs à ceux requis pour la croissance, et dans une moindre mesure ceux en magnésium, favorisent plus sous certaines conditions, la prolifération des Rhizobium dans la rhizosphère que le développement des nodules ou celui de la plante-hôte (16, 17, 18, 19, 20). L'étude de certains ions métalliques (cuivre, cobalt, zinc) sur la croissance de Rhizobium montre une diminution du pH (21). Le besoin vitaminique du Rhizobium (biotine, thiamine) pour la croissance a été prouvé (7, 8). Les exigences du Rhizobium en carbohydrates comme source de carbone, pour la croissance varient d'un groupe de Rhizobium à un autre (22, 8). Parmi les facteurs physiques, la température, la lumière et l'humidité jouent un rôle très important dans la nodulation (23). L'influence de la température sur la survie et la croissance de Rhizobium a été étudiée dans différents laboratoires (24, 25, 26). La sensibilité aux températures élevées varie considérablement suivant les espèces et les souches de Rhizobium. BONNIER (27) considère que les températures supérieures à 50° C sont souvent léthales. La température et l'humidité affectent fortement la symbiose Rhizobium-légumineuse (25) ; la température optimale pour la formation de nodules est semblable habituellement à celle de leur développement et par conséquent, à celle de la fixation de l'azote, qui sont inhibées par la chaleur et le froid (28). La température optimale de la fixation d'azote se situe souvent

autour de 24° C.

Les Rhizobium et les Agrobacterium, comme beaucoup des autres bactéries à Gram négatif sont sensibles à de nombreuses substances antibiotiques. On sait que dans le sol il y a de très nombreux microorganismes qui peuvent avoir des effets inhibiteurs ou stimulateurs sur la croissance de Rhizobium. Certains microorganismes comme les Actinomycètes synthétisent des antibiotiques qui sont toxiques pour les Rhizobium (29, 30) un certain nombre de champignons comme Aspergillus (31), Fusarium et les bactéries appartenant aux genres Bacillus et Streptomyces sp. peuvent avoir une activité antagoniste (29, 32) bien que les Rhizobium soient différents dans leur sensibilité aux antibiotiques (33, 34). IBRAHIM (35) a montré une activité antagoniste très importante exercée par un certain nombre de microorganismes sur la croissance des souches de Rhizobium. Il a montré également que ces microorganismes n'ont pas d'effet sur la nodulation.

La réponse de la microflore du sol produisant des antibiotiques varie fortement selon les souches de Rhizobium, l'antagoniste et la composition de milieu (31, 36) . D'autre part, KAMEL, IBRAHIM et SHATA (37) ont montré que le glucose est la source de carbone la plus adaptée à l'activité de ces microorganismes antagonistes.

Différentes études de la sensibilité des Rhizobium et des Agrobacterium ont été réalisées : elles ont mené dans plusieurs voies de recherche : soit dans un but taxonomique (10, 11, 38, 39), soit pour tenter de mettre au point un milieu sélectif (6) ou encore pour identifier très précisément

les souches utilisées lors de l'expérimentation sur champ (48). FOGLE et ALLEN (41) ont considéré que des souches de R. lupini et R. japonicum sont plus sensibles aux divers streptomycètes produisant des antibiotiques que des autres espèces de Rhizobium; par contre, LANDEPKIN et LOGHEAD (42) avaient noté qu'un certain nombre des souches de R. japonicum sont moins sensibles à l'actinomycètes produisant des antibiotiques que les autres micro-organismes du sol. L'effet des antibiotiques purifiés sur un certain nombre de souches de Rhizobium a été étudié (38, 43, 44, 45). Comme le nombre et le type d'antibiotiques testés et leur concentration étaient variables, aucune comparaison des résultats n'a été possible. GRAHAM (39) a étudié une variation de la sensibilité d'un grand nombre des souches de Rhizobium et d'Agrobactérium vis-à-vis des antibiotiques. Selon lui, la sensibilité la plus notable est celle des souches de Beijerinckia indica à l'erythromycine et il a noté que les souches à croissance lente apparaissent moins sensibles à la streptomycine, l'aureomycine et à la pénicilline G que celles à croissance rapide. Des études avec un grand nombre des souches de R. japonicum, R. leguminosarum et R. meliloti ont montré leur grande sensibilité aux antibiotiques du groupe de la tetracycline (8).

MAHLER R.L. et BEZDICEK D.F. (46) ont montré qu'un certain nombre de souches de R. leguminosarum isolé du sol sont relativement résistantes à la pénicilline, au chloramphenicol, à la polymyxine et novobiocine et sensibles à l'érythromycine, streptomycine et à la tétracycline; ils ont montré ainsi que l'identité de réponse de ces antibiotiques testés suggère que la majorité des souches de R. leguminosarum isolés sont en relation intime entre elles.

La résistance de R. leguminosarum à la pénicilline, à la polymyxine et au chloramphenicol est semblable à celle de R. japonicum d'après les résultats rapportés par ELKAN (47). L'identification des souches de Rhizobium lors de l'expérimentation sur champ a été étudiée par JOSEY^{et}BEYNON (48). La taxonomie des bactéries à l'heure actuelle présente un renouvellement d'intérêt dû au développement dans le domaine d'information scientifique, biochimique et de la génétique moléculaire.

Différentes études de la sensibilité des Rhizobium aux antibiotiques ont été menées dans un but taxonomique (10, 11, 38, 39).

Au niveau des groupes homogènes, les différences de sensibilité à certaines antibiotiques présentent un intérêt taxonomique certain. Il est classique de distinguer au sein du genre Rhizobium des souches à croissance lente et des souches à croissance rapide et de rapprocher ces dernières des Agrobacterium (10). La distinction entre les Rhizobium à croissance rapide, les Agrobacterium et les Rhizobium à croissance lente peut se faire à l'aide de la pénicilline (39). Agrobacterium et R. meliloti sont considérés comme des espèces proches du point de vue taxonomique (10, 38).

L'étude de la sensibilité des Rhizobium aux antibiotiques a été menée dans le but de mettre en évidence un milieu de sélection : il n'existe en effet pas de milieux sélectifs parfaitement satisfaisants (6, 8).

GRAHAM (6) a montré que quand une suspension du sol ou des nodules non stériles sont repiqués directement sur les boîtes de Petri contenant le milieu "yeast mannitol antibiotique agar" (YMAN), la croissan-

ce de colonies est souvent apparue en 2 à 3 jours. Plus de 99 % des colonies obtenues sont des Rhizobium par leur apparence et leurs propriétés. L'utilisation de pénicilline dans un milieu de culture a été étudiée par PATTISON et SKINNER (34) : les auteurs ont recommandé une concentration inférieure ou égale à 1 UI ; cet antibiotique a alors un effet légèrement inhibiteur sur le Rhizobium.

La résistance à certains antibiotiques comme marqueurs écologiques a été souvent envisagée (49, 50, 51), mais elle semble fréquemment affecter les propriétés symbiotiques des souches (40, 52, 53, 54, 55). De plus, ces caractères marqueurs semblent se perdre au cours de l'infection des plantes.

ABDEL-WAHAB (52) a montré que les différentes souches de R. trifolii présentent des comportements différents vis-à-vis de la pénicilline, de la streptomycine et du chloramphenicol. Il a montré également que mise à part l'augmentation en azote total des mutants pénicilline-résistants d'une souche de R. trifolii, il n'y a pas de différence significative dans l'efficacité entre les pénicilline-résistantes et les souches sensibles. SCHWINGHAMER et DALMAS (44) n'ont trouvé aucun changement dans l'efficacité chez R. leguminosarum, R. phaseoli, R. trifolii et R. meliloti devenus résistants à la pénicilline.

HAMATOVA (56) indique que la pénicilline à des concentrations comprises entre 10 et 1 000 UI augmente l'efficacité symbiotique chez certaines souches de R. trifolii, alors qu'elle n'a aucun effet sur R. leguminosarum. BALASSA (57,58) a suggéré que la transformation du marqueur résistants à la streptomycine provoque une perte à la virulence ; les

souches streptomycine résistantes et avirulentes de Rhizobium meliloti, R. lupini et R. japonicum quand elles étaient transformées en souches virulentes devenaient inefficaces et perdaient la résistance à la streptomycine. GUPTA et KLECZKOWSKA (59) n'observent pas une perte de la virulence chez R. trifolii résistant à faible concentration en streptomycine sauf chez une souche, qui perd sa virulence, tandis que SCHWINGHAMER (60) a obtenu des souches de R. leguminosarum, R. phaseoli et R. meliloti streptomycine-résistantes : ces mutants sont aussi efficaces que leurs souches parentales ; toutefois, une très légère diminution de l'efficacité est observée chez trois souches de R. trifolii résistants à cet antibiotique. La résistance à la streptomycine chez R. trifolii est la cause de différence dans l'efficacité. Le mutant résistant de R. trifolii à une concentration élevée de chloramphenicol est aussi efficace que la souche parentale (52). SCHWINGHAMER (60) a montré qu'un mutant résistant de R. leguminosarum à 1 500 µg/ml de chloramphenicol est aussi efficace que la souche parentale, tandis qu'il a observé une très légère diminution dans l'efficacité chez un de ces mutants.

Les caractères de résistance aux antibiotiques ont suscité d'importantes recherches du point de vue génétique. En effet, ceux-ci peuvent avoir une localisation variable sur le matériel génétique.

Chez de nombreuses espèces bactériennes, les différents gènes codant pour la résistance à des antibiotiques peuvent être portés par le chromosome : par exemple, sur le chromosome de E. coli se trouve les gènes de résistance à la pénicilline, au chloramphenicol, à la kasugamycine,

à l'acide nalidixique, à la rifamycine et à la streptomycine (61). Ces gènes peuvent être localisés en dehors de chromosome : c'est le cas des plasmides R ; ces éléments d'ADN extra-chromosomiques, non indispensables à la vie de la bactérie, ont une taille variant de 1/1000e à 1/10e environ. Les plasmides R. permettent de conférer une ou plusieurs résistances à différents antibiotiques, en particulier : des β . lactamine (penicilline, Ampicilline, carbonicilline), des aminosides (streptomycine, kanamycine, gentamycine), les tetracyclines, le chloramphenicol et les sulfamides. La plupart de ces molécules d'ADN sont conjugatives (ou auto-transférables) : cette fonction est codée par les gènes "tra" (transfer ability) et permet une dissémination dans les différentes espèces bactériennes, sous réserve de compatibilité (62) par conséquent une souche bactérienne donnée présentant une résistance naturelle multiple par rapport à un ensemble de souche de l'espèce, est susceptible de porter un plasmide de R.. Ceci est peu fréquent chez Rhizobium : en effet, COLE et ELKAN (63) en 1973, avaient démontré qu'une souche de R. japonicum est capable de transmettre une résistance à la penicilline G, à la néomycine et au chloramphenicol ; il s'avéra par la suite que cette souche possédait un plasmide (64) ; ceci est parfaitement vraisemblable puisque différents plasmides R exogènes s'expriment chez R. japonicum (65). A noter que quelques souches de R. japonicum possèdent des plasmides (66, 67). De plus, COLE et ELKAN (47) ont montré récemment qu'un certain nombre de souches de cette espèce sont multi-résistantes à des groupes d'antibiotiques bien déterminés ; ce phénomène n'a cependant pas encore été observé chez les autres espèces de Rhizobium, bien que des plasmides aient été mis en évidence dans des souches appartenant aux différents groupes (68, 69, 70, 71, 72).

BUT DU TRAVAIL

La symbiose entre les Rhizobium et les légumineuses aboutissant à la fixation de l'azote atmosphérique est écologiquement très importante au niveau de la biosphère. Cette association plante-bactérie présente à l'heure actuelle une grande importance dans l'amélioration des rendements agricoles.

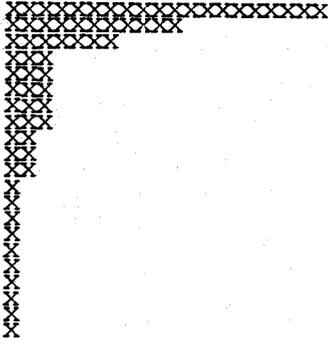
Parmi les voies de recherche, nous pouvons envisager les investigations d'ordres taxonomiques, la mise au point des milieux de culture (milieu de sélection, par exemple), et les études génétiques.

Dans ce travail, nous nous sommes proposés d'étudier la résistance d'un grand nombre de souches du genre Rhizobium et du genre Agrobacterium à diverses substances antibiotiques et antiseptiques.

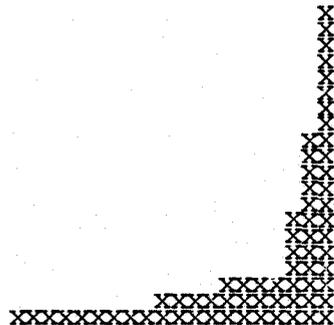
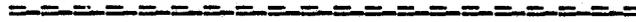
Dans un premier temps, nous avons mis au point les techniques permettant la mesure de la résistance ou la sensibilité à ces substances.

Dans un second temps, nous avons essayé de classer les bactéries en fonction de ces caractères.

Nous avons ensuite étudié les relations entre des caractères de résistance et la nodulation ; enfin, nous avons essayé de mettre en évidence des plasmides chez les souches qui se montrent résistantes à de nombreux antibiotiques.



MATERIEL ET METHODES



A - MATÉRIEL

1 - Microorganismes :

84 souches de Rhizobium et 11 souches d'Agrobacterium ont été étudiées : elles proviennent soit de la collection de notre laboratoire, soit de collections étrangères comme le Centre International d'Agriculture Tropicale en Colombie, l'Organisation de Recherche Scientifique et Industrielle du Commonwealth en Australie, le laboratoire de microbiologie de la Faculté de Gembloux en Belgique, la collection de Rhizobium de Rothamsted en Angleterre, l'Institut de Recherche de l'Ontario au Canada, le département d'agriculture de Beltsville aux Etats-Unis, l'Université de Nedland en Australie.

Des souches des principaux groupes d'inoculation connus ont été choisies : 24 souches de Rhizobium meliloti, 13 souches de Rhizobium trifolii, 9 souches de Rhizobium phaseoli, 12 souches de Rhizobium japonicum, 9 souches de Rhizobium leguminosarum, 5 souches de Rhizobium lupini, 12 souches de Rhizobium spp comprenant des souches du groupe *cowpea*. Les intitulés ainsi que les origines de chacune des souches utilisées figurent sur le TABLEAU II.

2 - Matériel végétal :

Quatre genres de légumineuses ont été étudiées :

TABIEAU II : Origine des souches utilisées.

Souches	Appellation d'origine	Reçu de	Isolement
M 2/1	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	R.U.G.	Eau Mechelen BELGIQUE
B 6	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	R.U.G.	Pommier Crown gall STRE- NANDRAM IWA U.S.A. 1963
TT 111	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	R.U.G.	U.S.A.
F/1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	R.U.G.	Daïhia ISRAEL 1961
B 37	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	R.U.G.	U.S.A.
RHIZO	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	U.S.T.L.	A.T.C.C. 13332
1771	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	R.U.G.	Vitis Vinifera IRAN
3/1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	R.U.G.	Pommier ISRAEL 1962
TR 2	<i>Agrobacterium rubi</i>	R.U.G.	Framboisier U.S.A.
KERR 38	<i>Agrobacterium</i> sp	R.U.G.	Prunier AUSTRALIE
O362	<i>Agrobacterium</i> sp	R.U.G.	Sol AUSTRALIE
M1-5	<i>Rhizobium meliloti</i>	U.S.T.L.	Medicago sativa BELGIQUE 1968
M1-5 col	<i>Rhizobium meliloti</i>	U.S.T.L.	Mutant naturel de M1-5
M5S	<i>Rhizobium meliloti</i>	U.S.T.L.	Medicago sativa
M11S	<i>Rhizobium meliloti</i>	U.S.T.L.	Medicago sativa LILLE 1972
M12S	<i>Rhizobium meliloti</i>	R.I.O.	Medicago sativa 1962
Ar 16	<i>Rhizobium meliloti</i>	S.R.M.S.	
M 17	<i>Rhizobium meliloti</i>	R.I.O.	Medicago sativa 1963
TU 20	<i>Rhizobium meliloti</i>	S.R.M.S.	
M 21	<i>Rhizobium meliloti</i>	C.I.A.T.	Medicago alba RHODESIE 1971
VE26	<i>Rhizobium meliloti</i>	S.R.M.S.	
44	<i>Rhizobium meliloti</i>	C.I.A.T.	Medicago sativa AUSTRALIE 1969
45	<i>Rhizobium meliloti</i>	C.S.I.R.O.	Medicago sativa URUGUAY 1963
SU 47	<i>Rhizobium meliloti</i>	C.S.I.R.O.	Medicago sativa AUSTRALIE 1939
A 145	<i>Rhizobium meliloti</i>	R.I.J.P.K.	
A 161	<i>Rhizobium meliloti</i>	R.I.J.P.K.	
2004	<i>Rhizobium meliloti</i>	C.I.A.T.	Non connu



Souches	Appellation d'origine	Reçu de	Isolement
444	Rhizobium meliloti	C.I.A.T.	Non connu
WU 498	Rhizobium meliloti	U.W.A.	Medicago truncatula W. AUSTRALIA 1965
WU 499	Rhizobium meliloti	U.W.A.	Medicago truncatula
2001	Rhizobium meliloti	R.C.R.	Medicago sativa
2011 E	Rhizobium meliloti	I.N.R.A.T.	Non connu
2011 Ren	Rhizobium meliloti	R.C.R.	Non connu
2011 S2	Rhizobium meliloti	U.S.T.L.	
FMI	Rhizobium meliloti	S.R.M.S.	
L11	Rhizobium leguminosarum	U.S.T.L.	Pisum sativum Lille 1972
L12	Rhizobium leguminosarum	U.S.T.L.	Pisum sativum Lille 1972
L17	Rhizobium leguminosarum 4-1	F.S.A.G.	Pisum sativum BELGIQUE 1948
L18	Rhizobium leguminosarum 4-2	F.S.A.G.	Non connu
L24	Rhizobium leguminosarum	F.S.A.G.	Viscia 1951
L25	Rhizobium leguminosarum 3HOa18/C.R.B.	C.R.B.	Pisum sativum BELGIQUE Rochelle, Ill 1933
L26	Rhizobium leguminosarum 1001R.C.R.	R.C.R.	Viscia hirsuta 1972
L27	Rhizobium leguminosarum 1045 R.C.R.	R.C.R.	Non connu
L 53	Rhizobium leguminosarum	R.I.O.	Pisum arvense 1928
P 5	Rhizobium phaseoli	U.S.T.L.	Phaseolus vulgaris Lille 1970
P 6	Rhizobium phaseoli	U.S.T.L.	Phaseolus vulgaris Lille 1970
P 12	Rhizobium phaseoli	F.S.A.G.	Phaseolus vulgaris 1960
P 15	Rhizobium phaseoli 3622 R.C.R.	R.C.R.	Non connu
P 16	Rhizobium phaseoli 3610 R.C.R.	R.C.R.	Non connu
P 94	Rhizobium phaseoli	R.I.O.	Phaseolus acutifolus Yuma, Ariz. 1948



Souches	Appellation d'origine	Reçu de	Isolement
P 95	Rhizobium phaseoli	R.I.O.	Phaseolus vulgaris
CC 365	Rhizobium phaseoli	C.S.I.R.O.	Phaseolus vulgaris
CC 511	Rhizobium phaseoli	C.S.I.R.O.	Phaseolus vulgaris
T 1	Rhizobium trifolii	R.I.O.	Trifolium sp 1962
TA 1	Rhizobium trifolii	C.S.I.R.O.	Trifolium subterraneum Bridfort, Tasmania AUSTRALIE 1968
T 3	Rhizobium trifolii	R.C.R.	Trifolium repens Ambleside ENGLAND 1942
T 5	Rhizobium trifolii	R.C.R.	Trifolium repens BLADFORD BORSET ENGLAND 1941
T 15	Rhizobium trifolii	U.S.T.L.	Trifolium pratense Lille 1969
T 18	Rhizobium trifolii	U.S.T.L.	Trifolium pratense Lille 1969
T 25	Rhizobium trifolii	U.S.T.L.	Trifolium repens Lille 1970
T 35	Rhizobium trifolii	S.A.G.	Trifolium pratense 1948
T 37	Rhizobium trifolii	R.I.O.	Trifolium hirtum 1945
T 41 3D1q25a	Rhizobium trifolii 3D1q25a/C.R.B.	C.R.B.	Trifolium incarnatum
WU 95	Rhizobium trifolii	U.W.A.	Trifolium subterraneum AUSTRALIA 1961
WU 290	Rhizobium trifolii	U.W.A.	Trifolium subterraneum AUSTRALIA 1964
CC 2480 a	Rhizobium trifolii	C.S.I.R.O.	Trifolium subterraneum Yanninicum GREECE 1965
G2 311B135	Rhizobium japonicum	S.R.M.S.	Non connu
G3 311B138	Rhizobium japonicum	S.R.M.S.	Non connu
3/15/B3	Rhizobium japonicum	F.S.A.G.	Glycine hispida
J5	Rhizobium japonicum 3-17	Genbloux	Soja 1956
J6	Rhizobium japonicum 3-24	C.S.I.R.O.	Non connu



Souches	Appellation d'origine	Reçu de	Isolement
61A76	Rhizobium japonicum	U.S.T.L.	
J 67	Rhizobium japonicum	R.I.O.	Glycine hispida JAPON 1929
J 68	Rhizobium japonicum	R.I.O.	Glycine hispida YUGOSLAVIE 1955
G 69	Rhizobium japonicum	S.R.M.S.	
CC 709	Rhizobium japonicum	C.S.I.R.O.	Glycine max
CC 1809	Rhizobium japonicum	C.S.I.R.O.	Glycine max 1968
K 61	Rhizobium lupini	U.S.T.L.	Lupinus sp LILLE 1974
K 65	Rhizobium lupini 3CZEla/C.R.B.	U.S.D.A.	Lupinus angustifolius GEORGIA 1946
K 107	Rhizobium lupini	R.I.O.	Lupinus albus GAINSVILLE 1940
K 121	Rhizobium lupini	R.I.O.	Lupinus luteus BRESIL 1959
WU 425	Rhizobium lupini	U.W.A.	Ornithopus compressus AUSTRALIE 1960
V 6	Rhizobium spp cowpea-group	U.S.T.L.	Rachis SENEGAL 1974
V 8	Rhizobium spp	U.S.T.L.	Arachis SENEGAL 1974
V 10	Rhizobium spp	U.S.T.L.	Arachis SENEGAL 1974
V 16	Rhizobium spp	F.S.A.G.	Arachis hypogaeae 1962
V 17	Rhizobium spp	F.S.A.G.	Arachis 1967
V 19	Rhizobium spp	F.S.A.G.	Youganbi CONGO
32 H 1	Rhizobium spp	C.S.I.R.O.	Non connu
122	Rhizobium spp	R.I.O.	Vigna sinensis 1920
135	Rhizobium spp	R.I.O.	Pueraria thumbergiana ROCK HILL 1939
3001	Rhizobium spp	R.C.R.	Anthylus vulneraria BEDFORT ENGLAND 1951
3002	Rhizobium spp	R.C.R.	Lotus corniculatus BEDFORT ENGLAND 1951
CB 756	Rhizobium spp	C.S.I.R.O.	Non connu



- C.I.A.T. Centre International Agricultura Tropical de COLOMBIA
- C.S.I.R.O. COMMONWEALTH Scientific and Industrial Research Organisation of
Canberra, AUSTRALIA
- R.C.R. RHOTHAMSTED Collection of RHIZOBIUM (HARPENDEN HERTFORDSHIRE, United Kingdom)
- R.I.O. Research Institute of ONTARIO, CANADA
- U.S.D.A. United States Department of Agriculture of BELTVILLE, MARYLAND U.S.A.
- U.S.T.L. Université des Sciences et Techniques de Lille, FRANCE
- U.W.A. The University of WESTERN AUSTRALIA (NEDLANDS, AUSTRALIA)
- R.I.J.P.K. Rijksdienst voor de ijsselmeerpolders kampen, THE NETHERLANDS
- S.R.M.S. Station de Recherches de Microbiologie du Sol de DIJON, FRANCE
- F.S.A.G. Faculté des Sciences Agronomiques de GEMBLoux, BELGIQUE
- R.U.G. Rijksuniversiteit Gent, BELGIUM
- I.N.R.A.T. Institut National de Recherches Agronomiques de TOULOUSE, FRANCE

- 1 - Medicago : (luzerne) variété Magali
- 2 - Trifolium : (trèfle nain) variété blanc Huia
- 3 - Pisum : (petit pois nain) variété merveille de Kelvedon
- 4 - Phaseolus : (haricot nain) variété Marbel

Les semences ont été fournies par la Maison VILMORIN.

3 - Milieux de culture :

a) Milieu gélosé d'ISWARAN :

Les souches sont obtenues par repiquages réguliers sur milieu d'ISWARAN gélosé (73) dont la composition est la suivante :

K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4, 7 H_2O$	0,2 g
$FeCl_3 6 H_2O$	0,01 g
NaCl	0,2 g
Mannitol	10 g
Gluconate de potassium	1,5 g
Extrait de levure (Difco).....	2 g
Agar Difco	15 g
Eau distillée.....	1 litre

pH : 6,8 - 7

Le milieu est stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes.

b) Milieu TY :

Les souches sont cultivées sur milieu TY liquide décrit par BERINGER (74) ; sa composition est la suivante :

Tryptone.....	5
Extrait de levure (Difco).....	3 g
CaCl ₂ , 6 H ₂ O	1,3 g
Eau distillée	1 litre

pH 6,8

Le milieu est stérilisé à l'autoclave à 120° C, durant 20 minutes.

c) Milieu complet RC gélifié :

Il est utilisé pour la germination de petites graines de légumineuses afin de contrôler la stérilité et la germination, et présente la composition suivante :

K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O.....	0,2 g
Extrait de levure (Difco).....	1 g
Bacto agar (Difco).....	15 g
Eau distillée.....	1 litre

pH 7,2

On le stérilise à l'autoclave à 120° C, pendant 20 minutes. La source de carbone (glucose) est additionnée de façon à avoir une concentration de 1 pour cent ; celle-ci est préalablement stérilisée à 105° C pendant 30 minutes.

d) Milieu de NICOL et THORNTON :

Le milieu utilisé pour la culture de légumineuse présente la composition suivante :

K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4, 7 H_2O$	0,2 g
NaCl.....	0,1 g
Fe PO_4	1 g
$Ca_3 (PO_4)_2$	2 g
$FeCl_3$	0,01 g
Eau distillée.....	1 litre

pH = 7

Ce milieu est autoclavé (30 mn à 105° C) après avoir été réparti en tubes.

4 - Antibiotiques :

16 antibiotiques ont été sélectionnés : ils appartiennent aux grands groupes habituellement reconnus parmi ces substances :

- Groupe de Bétalactamines :

- . Penicilline et Ampicilline
- . Cefalotine
- . Streptomycine
- . Kanamycine
- . Gentamycine

- Groupe du chloramphénicol

- Groupe des Tétracyclines :

- . Tétracycline
- . Minocycline

- Groupe de Macrolides :
 - . Erythromycine
- Groupe apparenté aux macrolides :
 - . Lincomycine
- Novobiocine
- Groupe des polypeptides :
 - . Polymyxine B
 - . Colistine
- Sulfamides :
 - . Sulfadiazine

Ces antibiotiques ont été utilisés sous forme de disques de 6 mm de diamètre, distribués par l'Institut Pasteur dont les charges sont les suivantes :

Penicilline : 6 μg ; Ampicilline : 10 μg ; Cefalotine : 30 UI ; Streptomycine : 10 UI ; Kanamycine : 30 UI ; Gentamycine : 15 μg ; Chloramphenicol : 30 μg ; Tétracycline : 30 UI ; Minocycline : 30 UI ; Erythromycine : 15 UI ; Lincomycine : 15 μg ; Novobiocine : 30 UI ; Polymyxine B : 36 μg ; Colistine : 60 μg ; Sulfadiazine : 200 μg ; Acide nalidixique : 30 μg .

Pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), les antibiotiques ont été fournis par les laboratoires : Upjohn (novobiocine, Lincomycine) ; Eli Lilly (Erythromycine, Cefalotine) ; P fizer (Tétracycline, Polymyxine) ; Winthrop (Acide Nalidixique) ; Theraplix (Sulfadiazine) ; Roussel (Chloramphenicol) ; Sita (Kanamycine) ; Specia (Streptomycine) ; Sarbach (Penicilline) ; Schenck (Gentamycine) ; Bristol (Ampicilline) ; Bellon (Colistine) ; Lederle (Minocycline).

5 - Antiseptiques :

Des antiseptiques appartenant aux principaux groupes connus ont été sélectionnés en excluant ceux qui neutralisent de façon trop importante le milieu utilisé ; ont été finalement retenus (*):

- 1 - Bromure de dioctyl dimethyl ammonium : 50 % matière active
- 2 - Chlorure d'alkyl dimethyl benzyl ammonium : 50 % matière active
- 3 - Glyoxal..... : 80 %
- 4 - Glutaraldehyde..... : 50 %
- 5 - Gluconate de chlorhexidine..... : 20 %
- 6 - Formol..... : 30 %

(*): aimablement fournis par le laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Pharmacie (LILLE II).

B - MÉTHODES

1 - Réalisation des antibiogrammes et mesure des zones d'inhibition en milieu gélatiné :

Les antibiogrammes ont été réalisés sur milieu d'ISWARAN décrit ci-dessus. Ce milieu permet une bonne culture des souches à croissance rapide comme R. meliloti ou R. leguminosarum mais également des souches à croissance lente pour lesquelles il a été décrit (R. japonicum ou R. lupini) ; un seul milieu peut aussi être utilisé pour toutes les souches. Le pH de ce milieu ne varie pratiquement pas au cours de la culture ; ceci est important lors de la réalisation d'antibiogrammes. Ils sont réalisés sur boîte carrée (120 mm x 120 mm) à l'aide d'un distributeur automatique de disques (Institut Pasteur production). 50 ml de milieu d'ISWARAN sont coulés dans chaque boîte. 5 ml d'une suspension bactérienne de densité optique connue sont ajoutés ; l'excès de liquide est ensuite éliminé et les boîtes sont placées à l'étuve à 37° C pendant 10 minutes. Après application des disques, les boîtes sont incubées à 30° C jusqu'à ce qu'une culture soit observée. Ceci demande 2 à 5 jours suivant les souches ; les diamètres des zones d'inhibition sont alors mesurés.

2 - Détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide (CMI) :

Une solution concentrée de chacun des antibiotiques est d'abord réalisée selon la technique décrite par la pharmacopée américaine

TABLEAU III

Preparation of Stock Solutions and Test Dilutions of Antibiotic Standard.

Antibiotic	Prior Drying	Stock Solution				Test Doses	
		Solvent	Diluent	Concentration per ml	Use Within	Diluent	Median ¹
Amphotericin B	Yes	Dimethylsulfoxide	Same	1 mg ²	1 day	B. 10 ³	1.0 µg
Ampicillin	No	Water ³	Same	100 µg	7 days	B. 3 ³	0.1 µg
Bacitracin	Yes	B. 1	Same	100 U	7 days	B. 1	1.0 U
Capreomycin	Yes	Water	Same	1 mg	7 days	Water	100 µg
Carbenicillin	No	B. 1	Same	1 mg	14 days	B. 1	20 µg
Cephalexin	No	B. 1	Same	1 mg	7 days	B. 1	20 µg
Cephalothin	Yes	B. 1	Same	1 mg	5 days	B. 1	1.0 µg
Chloramphenicol	No	Alcohol (10 mg/ml) ⁴	B. 1	1 mg	30 days	B. 1	50 µg
Clindamycin	No	Water	B. 3	1 mg	30 days	B. 3	1.0 µg
Cloxacillin	No	B. 1	Same	1 mg	7 days	B. 1	5.0 µg
Colistimethate Sodium	Yes	Water (10 mg/ml) ⁴	B. 6	1 mg	1 day	B. 6	1 µg
Cycloserine	Yes	Water	Same	1 mg	30 days	B. 1	50 µg
Dactinomycin	Yes	Methanol (10 mg/ml) ⁴	B. 3	1 mg	7 days	B. 3	1.0 µg
Dicloxacillin	No	B. 1	Same	1 mg	7 days	B. 1	5.0 µg
Doxycycline	No	0.1 N hydrochloric acid	B. 4	1 mg	5 days	B. 4	0.1 µg
Erythromycin	Yes	Methanol (10 mg/ml) ⁴	B. 3	1 mg	14 days	B. 3	1.0 µg
Gentamicin	Yes	B. 3	Same	1 mg	30 days	B. 3	0.1 µg
Griseofulvin	No	Dimethylformamide	Same	1 mg	3 months	B. 3	5.0 µg
Kanamycin Sulfate	No	B. 3	Same	1 mg	30 days	B. 3	5.0 µg
Lincomycin	No	Water	Same	1 mg	30 days	B. 3	2.0 µg
Methicillin Sodium	No	B. 1	Same	1 mg	4 days	B. 1	10 µg
Mincycline	No	0.1 N hydrochloric acid	B. 4	1 mg	2 days	B. 4	0.1 µg
Mithramycin	Yes	Water	B. 1	100 µg	1 day	B. 1	1.0 µg
Nafcillin	No	B. 1	Same	1 mg	2 days	B. 1	2.0 µg
Neomycin	Yes	B. 3	Same	1 mg	14 days	B. 3	1.0 µg
Nystatin	Yes	Dimethylformamide	Same	1000 U ⁵	1 day	B. 6	20 U
Oxacillin	No	B. 1	Same	1 mg	3 days	B. 1	5.0 µg
Oxacillin Sodium	No	B. 1	Same	1 mg	3 days	B. 1	5.0 µg
Oxytetracycline	No	0.1 N hydrochloric acid	Same	1 mg	4 days	B. 4	0.25 µg
Penicillin G	No	B. 1	Same	1000 U	2 days	B. 1	1.0 U
Penicillin V	No	Methanol (2 ml)	B. 1	100 U	4 days	B. 1	1.0 U
Polymyxin B Sulfate	Yes	Water (10,000 U/ml) ⁴	B. 6	10,000 U	14 days	B. 6	10 U
Rifampin	No	Methanol	B. 1	1 mg	1 day	B. 1	5.0 µg
Spectinomycin	No	Water	Same	1 mg	30 days	Water	50 µg
Streptomycin	Yes	B. 3	Same	1 mg	30 days	B. 3	1.0 µg
Streptomycin Sulfate	Yes	Water	Same	1 mg	30 days	Water	50 µg
Tetracycline	Yes	0.1 N hydrochloric acid	Same	1 mg	1 day	B. 4	0.25 µg
Vancomycin Hydrochloride	Yes	Water	Same	400 µg	7 days	B. 4	10 µg
Viomycin	Yes	Water	Same	1 mg	7 days	Water	100 µg

¹ Concentration, Units (U) or µg per ml.² The test dilutions of the standard should be prepared first in the indicated solvent, at concentrations 20 times the final concentrations.³ "B." stands for "Buffer" and refers to the phosphate buffers defined elsewhere.⁴ Where "Water" is specified, Purified Water, page 540, is to be used.⁵ Prepare the standard test dilutions and the sample test dilution simultaneously.⁶ Parenthetic expression indicates the final concentration of the antibiotic in the solvent.

PHOSPHATE BUFFERS

Prepare as follows or by other suitable means the phosphate buffers required for the antibiotic under assay. (The buffers are designated by numbers corresponding to those employed in the Federal Register.)

Buffer No. 1, 1 percent, pH 6.0—Dissolve 2.0 g of dibasic potassium phosphate and 8.0 g of monobasic potassium phosphate in 1000 ml of water. Adjust the pH with 18 N phosphoric acid or 10 N potassium hydroxide to 6.0 ± 0.05 .

Buffer No. 3, 0.1 M, pH 8.0—Dissolve 16.73 g of dibasic potassium phosphate and 0.523 g of monobasic potassium phosphate in 1000 ml of water. Adjust the pH with 18 N phosphoric acid or 10 N potassium hydroxide to 8.0 ± 0.1 .

Buffer No. 4, 0.1 M, pH 4.5—Dissolve 13.61 g of monobasic potassium phosphate in 1000 ml of water. Adjust the pH with 18 N phosphoric acid or 10 N potassium hydroxide to 4.5 ± 0.05 .

Buffer No. 6, 10 percent, pH 6.0—Dissolve 20.0 g of dibasic potassium phosphate and 80.0 g of monobasic potassium phosphate in 1000 ml of water. Adjust the pH with 18 N phosphoric acid or 10 N potassium hydroxide to 6.0 ± 0.05 .

Buffer No. 10, 0.2 M, pH 10.5—Dissolve 35.0 g of dibasic potassium phosphate in 1000 ml of water, and add 2 ml of 10 N potassium hydroxide. Adjust the pH with 18 N phosphoric acid or 10 N potassium hydroxide to 10.5 ± 0.1 .



(75) (TABLEAU III) ; à partir de la solution de l'antibiotique stérilisée par filtration sur filtre de $0,22 \mu$ de porosité, des dilutions sont réalisées dans le milieu d'ISWARAN. L'opération est effectuée en tubes à hémolyse (hauteur 84mm, diamètre 12mm) à raison de 1 ml par tube. Chaque tube est inoculé à l'aide de 0,05 ml de suspension bactérienne de densité optique 0,5 (mesuré à 620 nm de longueur d'onde). Après homogénéisation, les tubes sont placés à 30° C en agitation jusqu'à ce qu'une croissance soit observée dans les tubes témoins sans antibiotiques. Ceci demande 2 à 5 jours selon les souches. Le premier tube ne présentant pas de culture bactérienne est celui qui donne la valeur de la CMI.

3 - Réalisation des antiseptogrammes :

Des dilutions de chaque antiseptique sont réalisées dans l'eau distillée. Des disques de papier de 6 mm de diamètre (Institut Pasteur) sont plongés dans la solution d'antiseptiques de concentration déterminée lors d'un essai préliminaire ; les disques sont utilisés après avoir enlevé l'excès de liquide.

Les antiseptogrammes sont réalisés dans des boîtes de 90 mm de diamètre. Toutes les autres conditions (inoculation, temps, ...) sont identiques à celles utilisées pour la réalisation des antibiogrammes.

4 - Tests de nodulation in vitro :

L'infectivité représente la capacité d'infecter les racines de certaines légumineuses et d'y provoquer l'apparition des nodules. Ce caractère se note (inf +). Il se différencie difficilement de la spécificité

d'hôte. L'efficience définit la qualité de l'association Rhizobium-légumineuse qui aboutit à la fixation d'azote moléculaire: Cette qualité d'une souche de Rhizobium capable d'induire une telle association se note (eff +). Ces propriétés sont étudiées pour quatre espèces de légumineuses : Luzerne, Trèfle, Haricot et Petit Pois.

a) Stérilisation des graines :

Petites graines (ex : Luzerne, Trèfle) : les graines sont d'abord triées et réparties dans une boîte de Petri. On ajoute une goutte de détergent (Teepol) et on recouvre les graines de 20 ml environ de chlorure mercurique à 2,5 g/litre. On laisse agir 5 minutes en agitant. On élimine cette solution au moyen d'une pipette Pasteur branchée sur une trompe à vide. Les graines sont rincées 6 à 8 fois à l'eau distillée stérile.

Pour les grosses graines (ex : Haricot, Petit Pois) : la stérilisation de ces graines est effectuée à l'aide d'une solution d'hypochlorite de calcium à 80 g/litre préalablement filtrée. Celle-ci doit être utilisée juste après sa préparation. Le temps de stérilisation et les procédés de rinçage sont les mêmes que pour les luzernes et les trèfles.

b) Germination des graines :

La technique de mise en culture varie également en fonction de la taille des graines :

Pour les petites graines : on dépose stérilement une vingtaine de graines à la surface de boîte contenant un milieu riche (RCG glucosé)

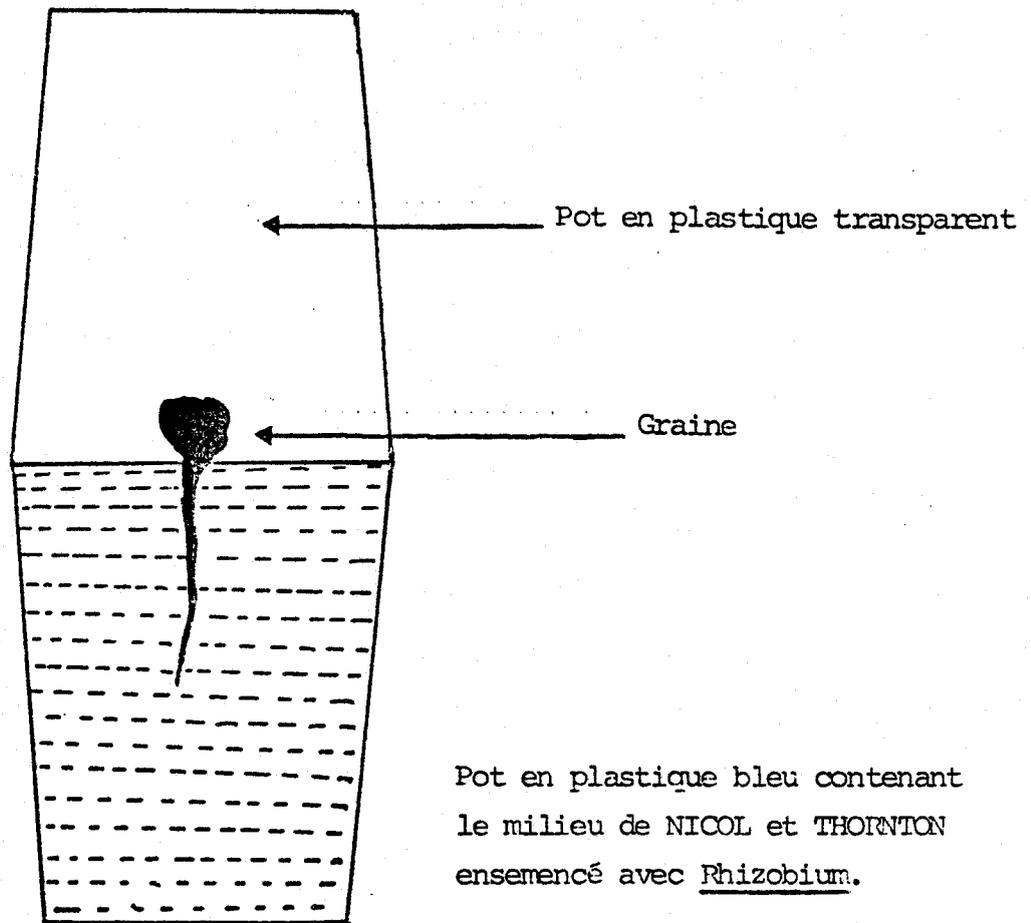
afin de contrôler la stérilité de la germination. La germination dure 2 à 4 jours à 30° C. La racine atteint alors 1 à 2 cm de longueur.

Pour les grosses graines : des boîtes de Petri en verre (diamètre 140 mm) sont tapissées d'une couche de coton hydrophile de 5 mm d'épaisseur environ, elle-même recouverte d'un disque de papier filtre ; l'ensemble est imbibé de 100 ml d'eau du robinet ; après emballage dans un papier kraft et d'aluminium, les boîtes sont autoclavées à 120° C pendant 20 minutes. Sept graines désinfectées sont alors déposées stérilement dans ces boîtes et placées 48 heures à 72 heures dans une étuve dont la température est réglée à 30° C.

c) Inoculation des graines :

Pour les petites graines : les plantules dont les racines ont atteint 1 à 2 cm sont immergées pendant 3 heures dans une suspension bactérienne concentrée (culture en phase exponentielle de croissance).

Pour les grosses graines : la culture bactérienne est centrifugée, lavée et remise en suspension dans l'eau distillée stérile, l'inoculation est réalisée directement dans les récipients de culture décrits ci-après.



d) Mise en culture :

1 - Petites graines : les graines germées sont transplantées à raison d'une plantule par tube de culture. Dans chaque tube (220 mm de hauteur et 20 mm de diamètre) contenant 20 ml de milieu de NICOL et THORNTON, une bandelette de papier Whatman 3 de 8,5 x 1,5 cm pliée à la partie supérieure en forme de "N" assure le maintien de la graine à la surface du liquide et permet de lui garder une humidité suffisante. Ces tubes contenant le support et le milieu liquide sont bouchés avec de la gaze renfermant du coton et stérilisés par autoclavage pendant 30 minutes à 105° C (car à 120° C, on note une variation du pH). L'inoculation s'effectue dans la serre avec 16 heures d'éclairément et 8 heures d'obscurité. La température est de 20 à 25° C et l'humidité est de 80 %. L'apparition des nodules demande 10 à 20 jours.

2 - Grosses graines : les graines germées sont mises en culture à l'aide du dispositif ci-dessus : un pot en matière plastique stérile de 200 ml est rempli stérilement de milieu NICOL et THORNTON. Le couvercle est alors placé à l'aide d'une emporte pièce stérilisé à la flamme. La graine germée est déposée sur le couvercle, la racine plongeant dans le milieu ; un second récipient en plastique transparent est placé sur le premier la culture s'effectue en serre dans les mêmes conditions que précédemment ; l'apparition des nodules est notée après environ un mois. L'ablation des cotylédons a été effectuée selon la technique de BONNIER et BROUWERS (76) ; en effet, des réserves azotées existant en quantité importante dans les cotylédons risquent de retarder l'apparition des nodules.

5 - Mise en évidence des plasmides par analyse électrophorétique :

Nous avons utilisé la technique de WOHLLEBEN et SIMON (77). Pour préparer le matériel à analyser, on centrifuge 15 ml d'une suspension bactérienne de D.O.1 (600 nm) cultivée dans le milieu TY pendant 5 minutes à 8000 tours/minutes dans le rotor SS 34 à 4° C. Le culot est remis en suspension dans du tampon TE froid (Tris 50 mM, EDTA acide éthylène diamine - tetra acétique) 20 mM pH 8. On centrifuge à nouveau et on reprend le culot dans 150 ml de Tris 50 mM pH 8 contenant 25 % en saccharose. Toutes les opérations qui suivent sont effectuées dans un petit tube Eppendorf (1,5 ml) : des retournements permettent une agitation douce. On ajoute 100 ml de lysozyme à 5 mg/ml dans du Tris 50 mM pH 8. On laisse 20 minutes dans un bain de glace, ensuite on ajoute 200 µl d'EDTA, 250 mM pH 8 et on laisse 10 minutes dans la glace. La lyse est effectuée par addition de 250 µl de SDS (sodium

dédécyl sulfate) à 15 % dans le tampon TE. On porte alors à 55° C pendant 5 minutes en retournant le tube régulièrement. On laisse refroidir et on ajoute 250 μ l de NaCl (5 M) en mélangeant rapidement à température ambiante, puis on laisse dans la glace pendant 6 heures minimum. On centrifuge ensuite pendant 10 minutes à 4° C dans la centrifugeuse Eppendorf 5412. On récupère le surnageant auquel on ajoute 0,313 volume de PEG (polyéthylène glycol) 6000 à 42 % dans le tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7. On laisse dans la glace pendant 6 heures minimum. On centrifuge ensuite pendant 10 minutes dans la centrifugeuse Eppendorf 5412. Le culot est remis en suspension dans 50 à 100 μ l de tampon TES (Tris 50 mM NaCl 50 mM EDTA 5 mM pH 8). On fait un dépôt de 20 à 50 μ l en présence de bleu de bromophénol et on fait migrer l'ADN dans un gel d'Agarose à 6 ‰ dans le tampon Tris 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA, 2,5 mM pendant 3 à 5 heures sous un courant d'intensité 50 mA. Après électrophorèse, le gel est trempé pendant 30 minutes dans un bain de bromure d'ethidium à 1 μ g/ml dans l'eau ; ensuite, on photographie le gel sous une illumination de longueur d'onde 302 nm avec un filtre pour ultraviolet et un filtre orange.

6 - Calculs et interprétations statistiques :

Les relations entre les diamètres des zones d'inhibition en milieu gélifié et les concentrations minimales inhibitrices en milieu liquide (CMI) sont étudiées selon la méthode proposée par ERICSSON et Coll (78) : les diamètres des zones d'inhibition y sont exprimés en mm ; la valeur de chaque CMI (en mg/ml) est transformée en logarithme à base 2, qui est ensuite complété de 5 (= x). Les droites de regression $y = f(x)$

sont établies pour chaque antibiotique avec 4 à 6 couples de valeurs expérimentales. L'utilisation de la méthode dite des moindres carrés assure le calcul de la pente (p_0) et de l'ordonnée à l'origine (y_0) et permet de déterminer le tracé de la droite.

$$y = y_0 + p_0 x$$

ou la pente

$$p_0 = \frac{\sum (x - \bar{x}) (y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

et l'ordonnée à l'origine $y_0 = \bar{y} - p_0 \bar{x}$

sachant que : y = diamètre (en mm) d'inhibition en milieu gélifié

\bar{y} = valeur moyenne des mesures de y effectuées

et que : $x = (\log_2 \text{CMI}) + 9$

\bar{x} = valeur moyenne des mesures de x effectuées

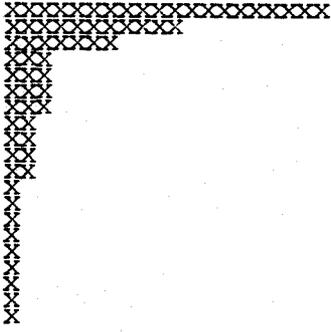
La liaison fonctionnelle entre les variables est déterminée statistiquement par l'estimation du coefficient de corrélation r

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x}) (y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

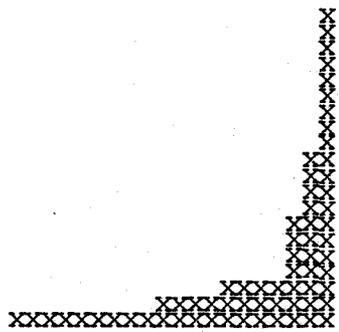
Le risque pris α (exprimé en %) est alors précisé par le test du "t" de Student pour les n mesures effectuées : avec $(n-2)$ degrés de liberté la table de FISHER et YATES (79) donne l'ordre de grandeur de α pour chaque valeur de :

$$t = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \sqrt{n - 2}$$

Tous nos calculs sont effectués sur calculatrice "Hewlett-Packard" HP 91.



R E S U L T A T S



A - ÉTUDE DE LA RÉSISTANCE AUX SUBSTANCES ANTIBIOTIQUES

Pour chacun des 16 antibiotiques étudiés, nous avons choisi 4 à 6 souches pour lesquelles nous avons mesuré le diamètre de zone d'inhibition et la valeur de la CMI. Nous avons essayé après analyse statistique d'établir une relation entre ces deux paramètres.

La mesure de la résistance ou de la sensibilité à un antibiotique peut se réaliser selon deux techniques :

- la détermination de la CMI en milieu liquide permet de définir la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes avec une bonne précision. Cette technique dite de "dilution en milieu liquide" est longue à réaliser et il est nécessaire de tester chaque bactérie isolée vis-à-vis de nombreux antibiotiques ;

- la détermination des diamètres des zones d'inhibition qui se réalise sur milieu solide (méthode des disques) permet également la détermination de la résistance (ou de la sensibilité). Cette technique est simple et rapide à mettre en oeuvre.

Nous avons voulu utiliser les résultats de cette deuxième technique à la détermination de la CMI. Dans un premier temps, nous avons

pour chaque antibiotique essayé quelques souches distinctes (entre 4 et 6) donnant des diamètres des zones d'inhibition de différentes valeurs. Les valeurs des CMI en milieu liquide ont été mesurées pour chacune de ces souches. Une relation entre les diamètres des zones d'inhibition et les valeurs de la CMI a été recherchée par analyse statistique (Droite de régression selon la méthode décrite par ERICSSON) (78) : la plupart des mesures des diamètres des zones d'inhibition ont été immédiatement converties en CMI et nous ont permis de classer les souches étudiées en fonction de leur résistance.

1 - Mise en évidence des relations existant entre les zones d'inhibition en milieu solide et la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide :

La CMI se définit comme la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber dans un milieu, toute culture visible de la souche étudiée.

Dans un essai préliminaire, nous avons pour les 16 antibiotiques mesuré les CMI et les diamètres des zones d'inhibition pour 4 souches distinctes. Nous avons alors essayé d'établir une relation linéaire entre le diamètre de zone d'inhibition $d = y$ (en mm) et la valeur de la CMI exprimée en :

$$x = (\log_2 \text{CMI}) + 9$$

Lorsque l'analyse statistique (test de coefficient de corrélation r) a montré l'existence d'une liaison significative au risque de 5 %, nous avons établi la droite de régression :

$$y = y_0 + p_0 x$$

et nous avons confirmé la linéarité de cette droite par le test du "t" de STUDENT.

Dans le cas où la valeur calculée de r est inférieure à celle des tables (soit à 0,9500 pour un nombre de degrés de libertés $ddl = 4 - 2 = 2$), nous n'avons pas considéré la liaison comme significative entre les paramètres ; nous avons alors augmenté le nombre d'expériences en déterminant les valeurs de x et y pour une ou deux souches supplémentaires ; les mêmes tests ont ensuite été réalisés. Nous n'avons jamais étudié pour un antibiotique donné plus de 6 souches, à cause du temps nécessaire à une telle expérimentation.

Les résultats obtenus figurent dans le TABLEAU IV. Nous donnons également sur les FIGURES 1, 2, 3 et 4 les droites obtenues pour les antibiotiques utilisés.

Sur le TABLEAU IV ne figurent que les résultats de 15 antibiotiques : en effet, la lincomycine s'est révélée inactive pour 93 souches sur les 95 étudiées ; nous n'avons donc pas calculé la droite de régression pour cet antibiotique. Deux équations de droites ne peuvent être estimées comme satisfaisantes, il s'agit de la gentamycine et de la polymyxine B; en effet l'estimation du coefficient de corrélation, et la valeur du "t" de STUDENT montrent que les valeurs du risque α sont supérieures à 5 % : dans ces conditions la relation établie ne peut être considérée comme statistiquement valable ; nous raisonnerons donc, dans la suite de ce travail, pour ces deux antibiotiques sur des valeurs de diamètres et non sur des valeurs de CMI.

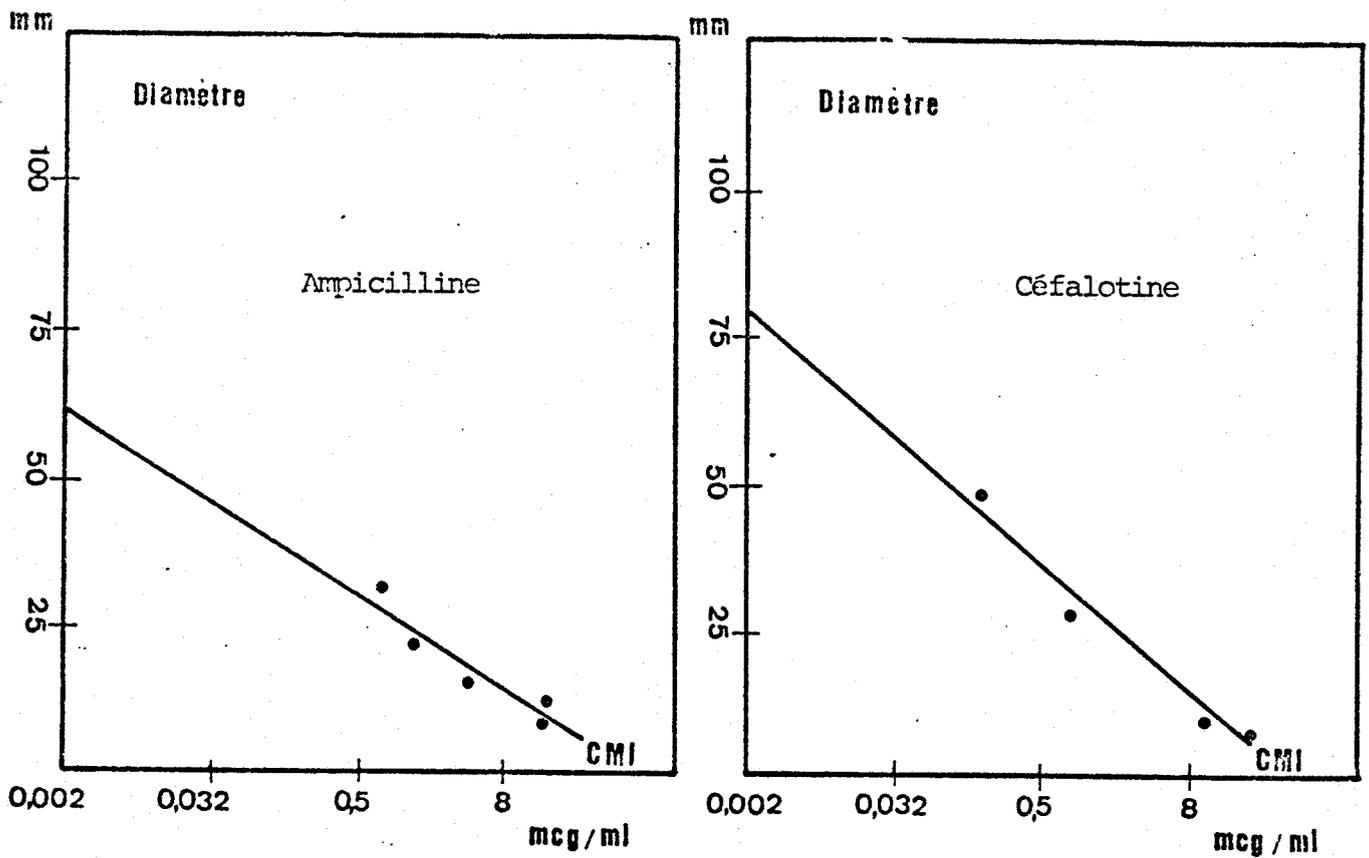
Antibiotiques	Nombre de souches utilisées	Equation de la droite de regression	Risque
		(*) 1	
Penicilline	5	$y = 76,000 - 5,000 x$	$0,02 > \alpha > 0,01$
Ampicilline	5	$y = 58,876 - 3,165 x$	$0,02 > \alpha > 0,01$
Cefalotine	4	$y = 79,700 - 4,340 x$	$0,02 > \alpha > 0,01$
Streptomycine	4	$y = 53,048 - 3,452 x$	$0,01 > \alpha > 0,001$
Kanamycine	4	$y = 40,286 - 1,978 x$	$0,05 > \alpha > 0,02$
Gentamycine	5	$y = 70,000 - 4,750 x$	$0,2 > \alpha > 0,10$ (*) ²
Chloramphenicol	4	$y = 105,571 - 7,229 x$	$\alpha \approx 0,05$
Tetracycline	4	$y = 108,022 - 7,758 x$	$0,05 > \alpha > 0,02$
Minocycline	6	$y = 79,254 - 4,881 x$	$0,02 > \alpha > 0,01$
Erythromycine	4	$y = 62,096 - 3,370 x$	$0,02 > \alpha > 0,01$
Novobiocine	4	$y = 115,773 - 6,409 x$	$0,01 > \alpha > 0,001$
Polymyxine	5	$y = 39,750 - 2,800 x$	$0,2 > \alpha > 0,10$ (*) ²
Colistine	4	$y = 47,200 - 3,600 x$	$0,01 > \alpha > 0,001$
Sulfadiazine	5	$y = 395,610 - 23,171 x$	$0,01 > \alpha > 0,001$
Acide nalidixique	4	$y = 87,100 - 4,463 x$	$0,02 > \alpha > 0,01$

(1) Y est exprimé en mm, $x = (\log_2 \text{CMI}) + 9$

(2) Ces valeurs de α ne permettent pas de considérer l'équation de la droite comme satisfaisante.

TABLEAU IV : RELATIONS ENTRE LES DIAMETRES DE ZONES D'INHIBITION ET LES VALEURS DE CMI.





La linéarité des 4 droites a été établie statistiquement (voir détails dans le texte).

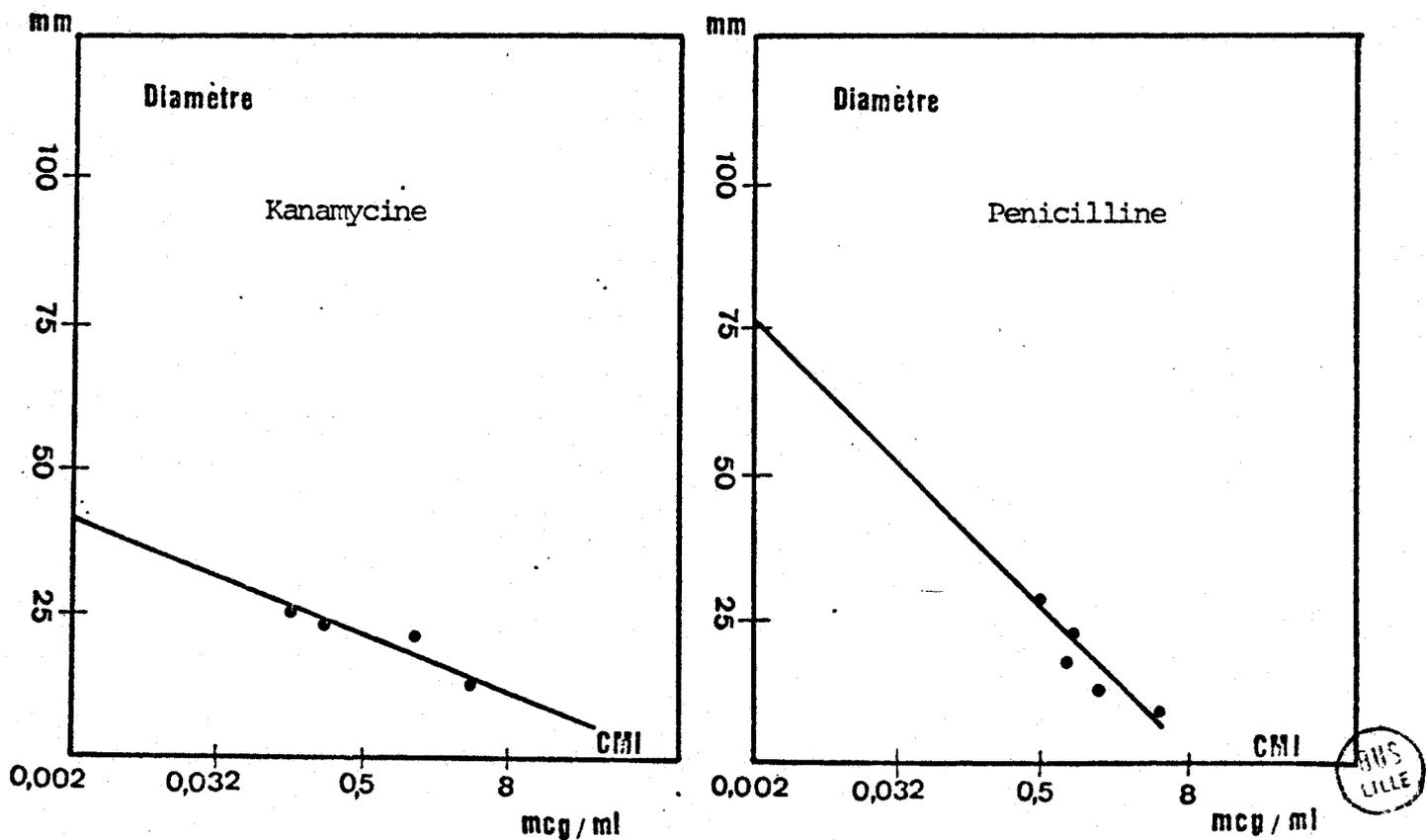
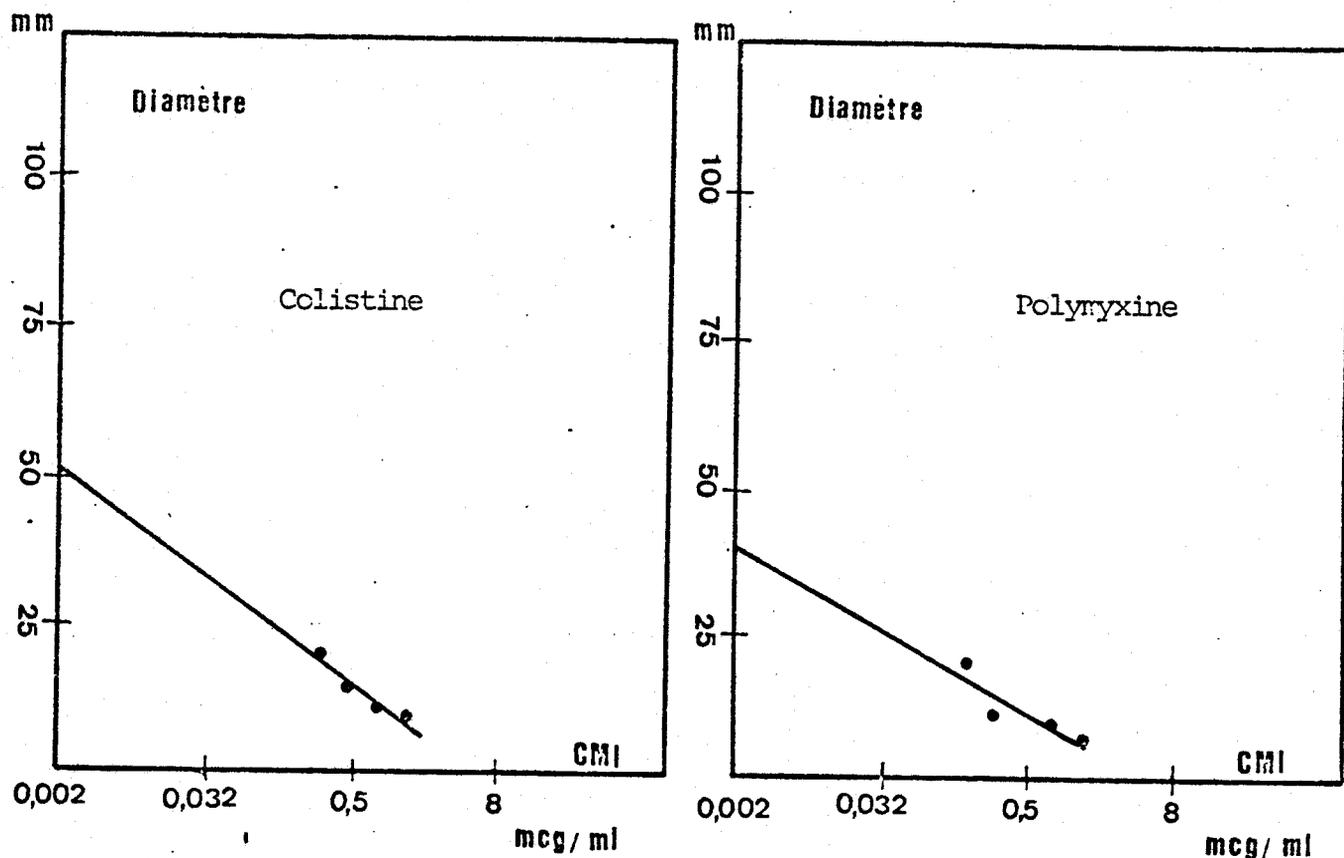


FIGURE 1 : Droites de régression donnant la valeur des diamètres de zone d'inhibition en fonction des CMI pour l'ampicilline, la céfalo-tine, la kanamycine et la penicilline.



La linéarité des droites a été établie statistiquement sauf pour la polymyxine : voir détails dans le texte.

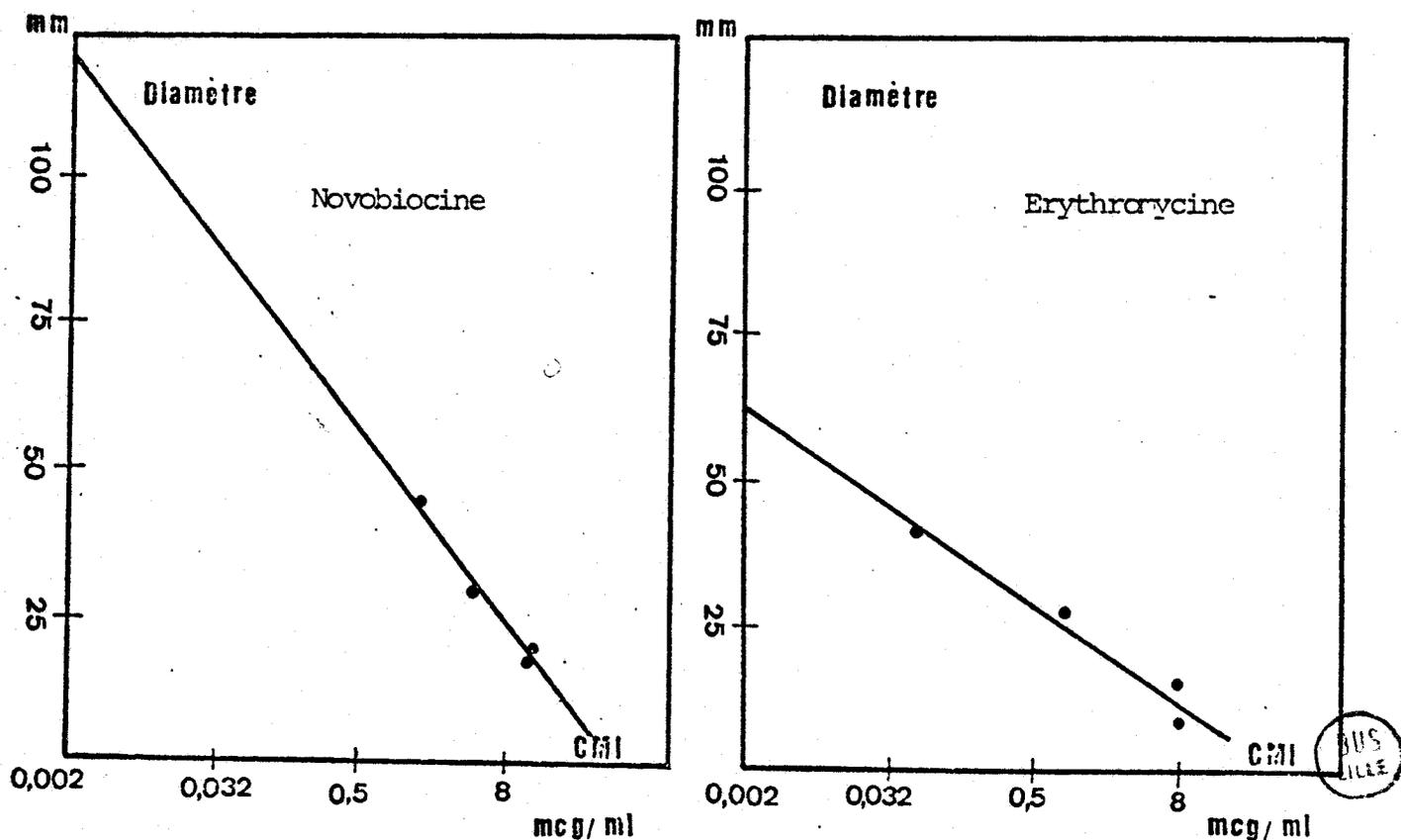
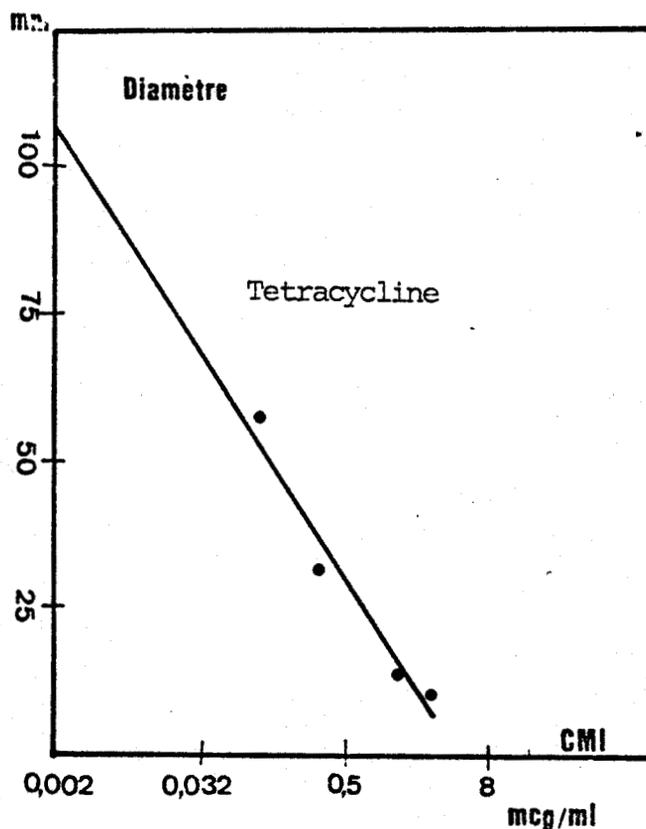


FIGURE 2 : Droites de régression donnant la valeur des diamètres de zone d'inhibition en fonction des CMI pour la colistine, la polymyxine, la novobiocine et l'erythromycine.



La linéarité des 3 droites a été établie statistiquement : voir détails dans le texte.

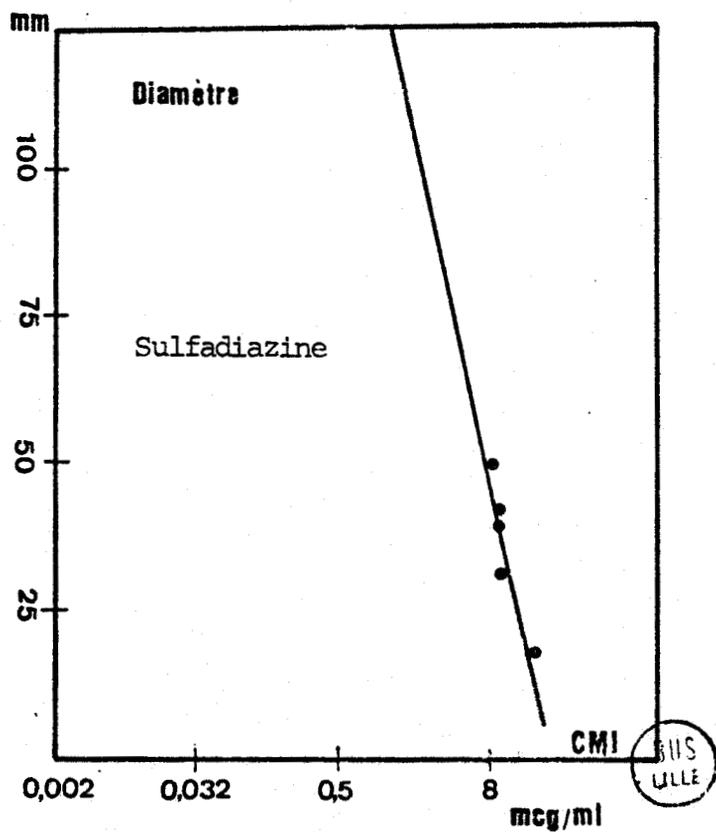
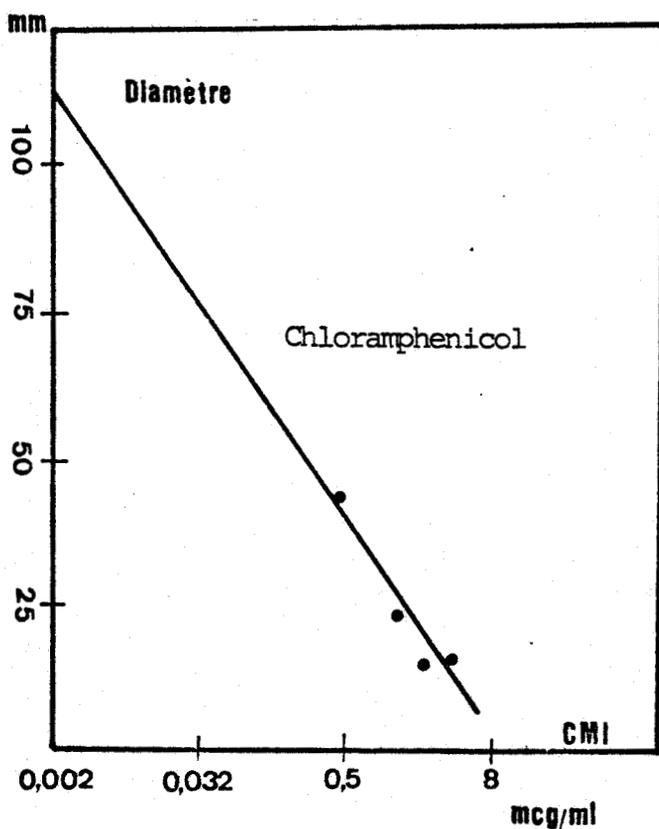
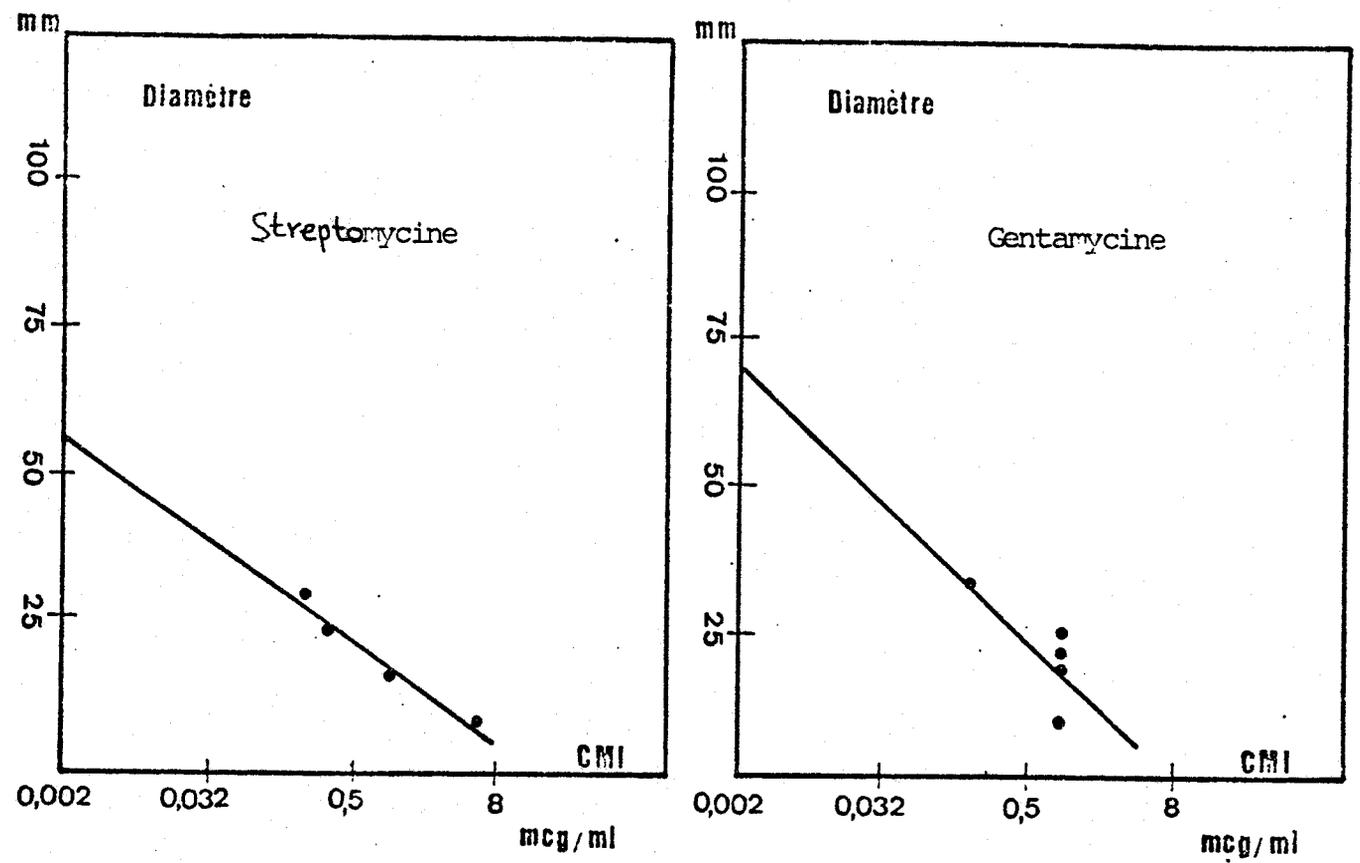


FIGURE 3 : Droites de regression donnant la valeur des diamètres de zone d'inhibition en fonction des CMI pour la tetracycline, le chloramphenicol et le sulfadiazine.



La linéarité des droites a été établie statistiquement sauf pour la gentamycine : voir détails dans le texte.

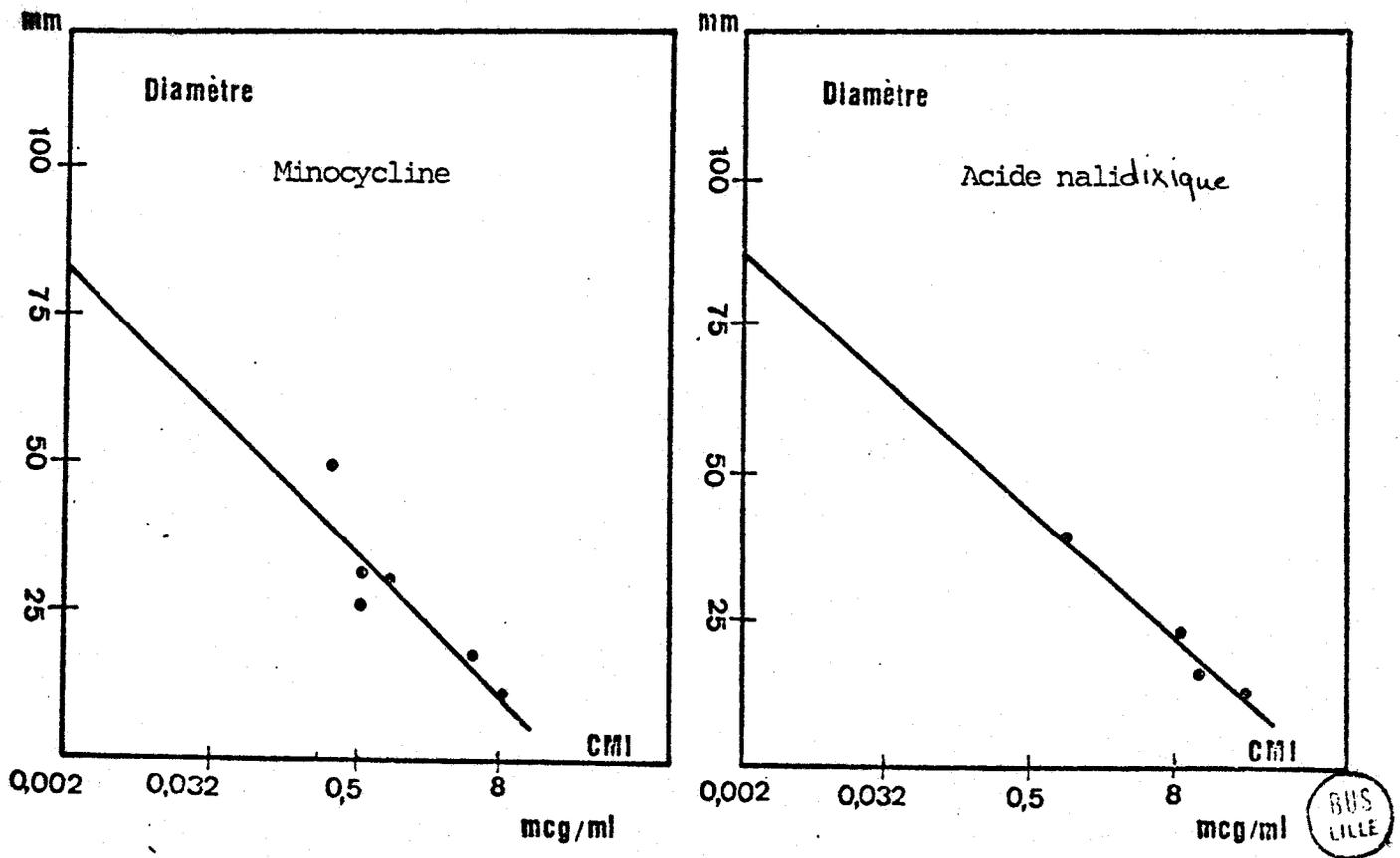


FIGURE 4 : Droites de regression donnant la valeur des diamètres de zone d'inhibition en fonction des CMI pour la Streptomycine, la gentamycine, la minocycline et l'acide nalidixique

BUS LILLE

PHOTO 1 : Détermination de la CMI en milieu liquide (souche
vis-à-vis

2 - Distribution des valeurs de CMI pour l'ensemble des souches étudiées :

Les 13 droites de régression parfaitement définies, et dont la linéarité est statistiquement vérifiée au risque de 5 % ou un risque inférieur, permettent de déterminer les valeurs des CMI pour chaque souche connaissant les diamètres des zones d'inhibition.

Pour présenter les résultats donnant les CMI de l'ensemble de nos souches vis-à-vis des 15 antibiotiques, nous avons arbitrairement déterminé 3 classes de la façon suivante : pour chacun des antibiotiques, si la CMI se situe dans la classe de concentration la plus élevée (par exemple : $CMI < 32 \mu g/ml$ pour la pénicilline) la souche est considérée comme résistante à l'antibiotique. Les concentrations inférieures à cette limite ont ensuite été divisées arbitrairement en deux classes (exemple $0,75 < CMI < 16$ et $16 < CMI < 32$ pour la pénicilline). Ceci permet de mieux rendre compte des résultats obtenus et éventuellement de différencier les groupes formés.

Le classement en trois sous-groupes est donné dans le TABLEAU V.

Un certain nombre d'antibiotiques ne donne pas des résultats exploitables immédiatement, soit parce qu'il n'est pas possible de tirer une idée de la sensibilité des différents groupes de Rhizobium, du fait de la dispersion des souches dans les 3 classes de CMI choisies (par exemple ; cefalotine, kanamycine, ampicilline, streptomycine), soit parce que la sensibilité de différents groupes est identique. Par contre,

TABLEAU V

Antibiotiques	Nombre de souches	R. <i>psittaci</i>		R. <i>triticii</i>		R. <i>prescottii</i>		R. <i>jaegericum</i>		R. <i>canimorsum</i>		R. <i>gyp</i>		R. <i>Abelii</i>	
		24	13	9	12	9	5	12	11						
PENICILLINE	0,75 < CMI < 16 ¹	0	4	1	0	3	5	4	0						
	16 < CMI < 32	0	1	0	2	1	0	0	0						
	CMI > 32	24	8	8	2	5	0	8	11						
AMPICILLINE	0,128 < CMI < 16	7	10	1	8	4	4	6	5						
	16 < CMI < 256	15	3	5	4	5	0	1	5						
	CMI > 256	2	0	3	0	0	1	5	1						
CEFALOTINE	0,5 < CMI < 32	0	5	1	11	2	3	5	1						
	32 < CMI < 256	5	4	0	1	3	2	1	2						
	CMI > 256	19	4	8	0	4	0	6	8						
STREPTOMYCINE	0,256 < CMI < 4	14	11	1	11	6	3	5	1						
	4 < CMI < 32	7	1	0	1	1	2	5	2						
	CMI > 32	3	1	8	0	2	0	2	8						
KANAMYCINE	0,008 < CMI < 4	18	11	5	9	4	2	2	6						
	4 < CMI < 64	6	2	4	3	5	2	9	5						
	CMI > 64	0	0	0	0	0	1	1	0						
GENTAMYCINE	18 < d < 32 ²	6	7	2	3	0	0	1	1						
	10 < d < 18	15	6	6	9	8	2	7	6						
	d < 10	3	0	1	0	1	3	4	4						
CHLORAMPHENICOL	0,5 < CMI < 8	4	7	1	10	3	5	8	3						
	8 < CMI < 32	19	5	7	2	6	0	2	8						
	CMI > 32	1	1	1	0	0	0	2	0						
TETRACYCLINE	0,25 < CMI < 1	19	10	6	0	5	0	4	9						
	1 < CMI < 16	5	3	3	12	4	5	6	2						
	CMI > 16	0	0	0	0	0	0	2	0						
MINOCYCLINE	0,128 < CMI < 2	22	11	4	11	6	1	5	7						
	2 < CMI < 16	2	2	2	1	2	3	4	4						
	CMI > 16	0	0	3	0	1	1	3	0						
ERYTHROMYCINE	0,128 < CMI < 1	0	2	1	0	1	0	0	0						
	1 < CMI < 4	2	5	1	11	3	3	4	1						
	CMI > 4	22	6	7	1	5	2	8	10						
NOVOBIOCINE	4 < CMI < 16	1	5	3	6	3	1	2	1						
	16 < CMI < 64	23	7	6	6	6	4	9	4						
	64 < CMI < 128	0	1	0	0	0	0	1	6						
POLYMYXINE	14 < d < 22 ²	14	7	2	1	0	0	0	1						
	8 < d < 14	9	5	2	7	6	0	4	2						
	d < 8	1	1	5	4	3	5	8	8						
COLISTINE	0,2 < CMI < 1	12	5	2	1	0	0	0	2						
	1 < CMI < 4	12	8	3	9	7	1	6	3						
	CMI > 4	0	0	4	2	2	4	6	6						
SULFADIAZINE ³	64 < CMI < 128	22	9	8	10	5	5	9	7						
	128 < CMI < 250	2	1	1	2	4	0	2	4						
	CMI > 250	0	3	0	0	0	0	1	0						
ACIDE NALIDIXIQUE	4 < CMI < 32	3	8	4	11	3	2	3	3						
	32 < CMI < 512	20	5	5	1	6	2	7	6						
	CMI > 512	1	0	0	0	0	1	2	2						

(1) CMI exprimée en µg/ml

(2) d = diamètre exprimé en mm

(3) Des colonies résistantes apparaissent fréquemment dans la zone d'inhibition avec la sulfadiazine

TABLEAU V : DISTRIBUTION DES VALEURS DE CMI POUR LES 95 SOUCHES ETUDIÉES.



avec d'autres antibiotiques, on peut faire des constatations intéressantes :

- Pour la pénicilline, toutes les souches de R. meliloti et d'Agrobacterium et un nombre important de R. trifolii et de R. phaseoli sont résistantes à des concentrations supérieures à 32 µg/ml. R. japonicum, R. lupini, au contraire, sont beaucoup plus sensibles à cet antibiotique.

- Pour l'ampicilline, la majorité des souches de R. trifolii, R. lupini et de R. japonicum sont sensibles, tandis que les souches de R. leguminosarum, R. meliloti, R. phaseoli, R. spp et d'Agrobacterium sont plus résistantes.

- Pour la streptomycine, la plupart des souches de R. trifolii, R. japonicum, sont sensibles; R. meliloti, R. leguminosarum, R. lupini et R. spp sont moins sensibles. R. phaseoli et Agrobacterium par contre, sont résistants : 8 souches sur 11 d'Agrobacterium et 8 sur 9 de R. phaseoli ont une CMI supérieure à 32 µg/ml.

- Pour la kanamycine, R. meliloti, R. trifolii, R. japonicum sont remarquablement sensibles, tandis que R. phaseoli, R. leguminosarum, R. lupini, R. spp et Agrobacterium sont moyennement sensibles.

- Pour la gentamycine: toutes les souches de Rhizobium et d'Agrobacterium sont variables dans leur sensibilité.

- Pour le chloramphenicol, R. japonicum et R. lupini sont plus sensibles que la majorité des souches des autres groupes.

- Pour la tetracycline, la majorité des souches de R. meliloti, R. trifolii, R. phaseoli, R. leguminosarum et Agrobacterium sont sensibles ;

par contre, R. japonicum, R. lupini et R. spp sont moins sensibles.

- Pour la minocycline : R. meliloti, R. trifolii, R. japonicum et Agrobacterium sont sensibles ; par contre, R. phaseoli, R. spp, R. lupini, R. leguminosarum le sont moins.

- Avec l'erythromycine, la majorité des souches de R. meliloti, R. phaseoli, R. spp et Agrobacterium sont résistantes, tandis que les souches des autres groupes le sont moins.

- Pour la novobiocine, la seule remarque intéressante concerne l'Agrobacterium : 6 souches sur 11 sont résistantes à la concentration de plus de 64 $\mu\text{g/ml}$; par contre la majorité des souches des autres groupes ont une CMI de plus de 16 $\mu\text{g/ml}$.

- Avec la polymyxine, la majorité des souches d'Agrobacterium, R. spp, R. lupini sont résistantes et ont une zone d'inhibition inférieure à 8 mm sur milieu gélosé, tandis que R. meliloti présente le groupe le plus sensible vis-à-vis des autres groupes, dont 14 souches ont une zone d'inhibition entre 14 et 22 mm.

- Pour la colistine, la plupart des souches d'Agrobacterium et R. spp et R. lupini sont résistantes et ont une CMI plus de 4 $\mu\text{g/ml}$; par contre, la majorité des souches des autres groupes sont variables dans leur sensibilité.

- Pour la sulfadiazine : la majorité des souches de Rhizobium et d'Agrobacterium sont sensibles à la concentration plus de 64 $\mu\text{g/ml}$.

- Pour l'acide nalidixique, seul le groupe de R. japonicum montre une sensibilité intéressante ; 11 souches sur 12 ont une CMI inférieure à 32 µg/ml. Par contre, la majorité des autres groupes montre une sensibilité variable.

3 - Répartition des souches résistantes :

Dans le but de détecter l'existence de polyrésistance chez certaines souches, il s'est avéré nécessaire de fixer des valeurs de CMI au-delà desquelles les souches peuvent être considérées comme résistantes ; à défaut d'autres critères, les niveaux des résistances retenues sont ceux habituellement utilisés dans le domaine médical : ils figurent dans le TABLEAU VI en µg/ml lorsque la CMI a pu être déterminée, ou en mm quand cette valeur n'a pu être calculée.



Le TABLEAU VII indique pour chaque groupe le nombre de souches résistantes à chaque antibiotique.

Le TABLEAU VIII indique pour chaque souche la résistance ou la sensibilité aux 16 antibiotiques.

Toutes les souches de R. meliloti sont résistantes à la pénicilline, à la cefalotine et à la lincomycine. Sur les 24 souches étudiées, 21 sont résistantes à l'acide nalidixique, 23 à la novobiocine, 22 à l'erythromycine et 17 à l'ampicilline.

Valeur de la CMI en µg/ml

Penicilline	16
Ampicilline	16
Cefalotine	32
Streptomycine	32
Kanamycine ^e	64
Chloramphenicol	32
Tetracycline	16
Minocycline	16
Erythromycine	4
Novobiocine	16
Colistine	4
Sulfadiazin _e	128
Acide nalidixique	32

Valeur diamètre en mm

Gentamycine	10
Polymyxine B	8

TABLEAU VI : NIVEAUX DE RESISTANCES CHOISIS.



Anti-biotiques	Nombre de souches							
	<i>R. meliloti</i>	<i>R. trifolii</i>	<i>R. phaseoli</i>	<i>R. japonicum</i>	<i>R. leguminosarum</i>	<i>R. lupini</i>	<i>R. spp</i>	<i>Agrobacterium</i>
	24	13	9	12	9	5	12	11
Penicilline	24	9	8	4	6	0	8	11
Ampicilline	17	3	8	4	5	1	6	6
Cefalotine	24	8	8	1	7	2	7	10
Streptomycine	3	1	8	0	2	0	2	8
Kanamycine	0	0	0	0	0	1	1	0
Gentamycine	3	0	1	0	1	3	4	4
Chloramphenicol	1	1	1	0	0	0	2	0
Tetracycline	0	0	0	0	0	0	2	0
Minocycline	0	0	3	0	1	1	2	0
Erythromycine	22	6	7	1	5	2	8	10
Novobiocine	23	8	6	6	6	4	10	10
Polymyxine	1	1	5	4	3	5	8	8
Colistine	0	0	4	2	2	4	6	6
Sulfadiazine	2	4	1	2	4	0	3	4
Acide nalidixique	21	5	5	1	6	3	9	8
Lincomycine	24	13	9	10	9	5	12	11

TABLEAU VII : DISTRIBUTION DES SOUCHES RESISTANTES.

	Peni- cilline	Ampi- cilline	Cefa- lotine	Strepto- mycine	Kana- mycine	Genta- mycine	Chloram- phenicol	Tetra- cycline	Mino- cycline	Erythro- mycine	Novo- biocine	Poly- myxine	Colis- tine	Sulfadia- zine	Acide nalidixique
--	------------------	------------------	-----------------	--------------------	-----------------	------------------	----------------------	-------------------	------------------	--------------------	------------------	-----------------	----------------	-------------------	----------------------

Agrobacterium

1 M2/1	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R
2 B6	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S
3 TIIII	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R
4 ZUTRA F1	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
5 NRRL B37	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
6 RHIZOGENES	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R
7 NCPP B1771	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8 ZUTRA 3/1	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R
9 TR2	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R
10 KERR 38	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
11 O362	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R

R. meliloti

12 2001	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	R
13 2011R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
14 2011D	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R
15 12/R10	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
16 17/R10	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
17 SU47	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
18 44	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
20 U45	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
21 WU 498	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
22 WU 499	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
23 444	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
24 21	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R



26 2004	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
28 M55	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
29 M115	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
30 A16	K	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
31 A161	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
32 VE26	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
33 201152	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R
34 A 145	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
35 M15Mu	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
36 M15	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
37 Fml	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
103 Tu20	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R

R. leguminosarum

38 L26	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
39 L27	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S
41 L53	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
42 L24	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
43 L12	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R
44 L17	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R
45 L18	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R
46 L25	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
47 L11	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R

R. phaseoli

48 CC511	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
49 P15	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R
50 P94	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S
51 P95	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
52 P5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S



53 P6	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R
54 P12	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R
55 P16	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
101 CC365	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S

R. japonicum

56 J5	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
57 315 B3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
58 J6	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
59 J8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
60 J67	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
61 J68	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
62 G3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
63 G2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
64 G69	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
65 CC709	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
66 CC1809	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
67 61A76	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R. trifolii

71 WU 290	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
72 WU 95	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
73 CC 2480 a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
74 TA 1	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
75 TRIF 3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
76 TRIF 5	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
77 TRIF 1	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	R
78 TRIF 37	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
79 TRIF 41	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
81 T155	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R



82 T185	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
83 T255	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
84 T355	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R

Coupea + Rsp

85 V10S	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R
86 V175	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R
87 V195	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
88 V85	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
89 V65	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R
90 V165	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R
91 3241	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R
92 CB756	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
93 3001	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
94 3002	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
95 135	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S
96 122	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S	R

R. lupini

97 K655	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R
98 K121S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R
99 K107	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S
100 K615	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R
102 WU425	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S

TABLEAU VIII : Sensibilité ou résistance de chaque souche.



Pour R. trifolii, toutes les souches sont résistantes à la lincomycine, tandis que 9 souches sur 13 sont résistantes à la pénicilline, 8 à la cefalotine, 8 à la novobiocine, 6 à l'erythromycine, 5 à l'acide nalidixique et 4 à la sulfadiazine.

Pour R. phaseoli, toutes les souches sont résistantes à la lincomycine et 8 souches sur 9 sont résistantes à la pénicilline, l'ampicilline, la cefalotine, la streptomycine, 7 souches résistantes à l'erythromycine, 6 à la novobiocine, 5 souches à la polymyxine et à l'acide nalidixique.

Pour R. japonicum, la majorité des souches de R. japonicum sont sensibles aux antibiotiques étudiés sauf à la lincomycine vis-à-vis de laquelle 10 souches sur 12 sont résistantes. On peut noter que 4 souches sont résistantes à la pénicilline, à l'ampicilline et à la polymyxine, 6 souches sont résistantes à la novobiocine.

Toutes les souches de R. leguminosarum sont résistantes à la lincomycine, 7 sur 9 à la cefalotine, 6 à la pénicilline, à la novobiocine et à l'acide nalidixique ; 5 à l'ampicilline et à l'erythromycine.

Pour R. lupini, toutes les souches sont résistantes à la lincomycine et à la polymyxine, 4 souches sont résistantes à la colistine et à la novobiocine, 3 à l'acide nalidixique et à la gentamycine.

Pour R. spp, toutes les souches sont résistantes à la lincomycine, 10 sur 12 à la novobiocine, 9 à l'acide nalixique, 8 à la polymyxine, à l'erythromycine, à la pénicilline, 7 à la cefalotine et 6 souches à la colistine et à l'ampicilline.

Pour l'Agrobacterium, toutes les souches sont résistantes à la lincomycine et à la pénicilline. 10 souches sur et à la cefalotine
 11 sont résistantes à la novobiocine, à l'erythromycine, 8 sont résistantes à l'acide nalidixique, à la polymyxine et à la streptomycine, 6 à la colistine et à l'ampicilline.

Le TABLEAU VIII nous montre que sur la totalité des souches de Rhizobium et d'Agrobacterium, 70 sont résistantes à la pénicilline, 50 à l'ampicilline, 67 à la cefalotine, 24 à la streptomycine, 2 à la kanamycine, 16 à la gentamycine, 5 au chloramphenicol, 2 à la tétracycline, 7 à la minocycline, 67 à l'erythromycine, 83 à la novobiocine, 35 à la polymyxine, 24 à la colistine, 20 à la sulfadiazine, 58 à l'acide nalidixique et 93 à la lincomycine.

En plus des observations précédentes qui concernent les différences de niveaux de résistance entre les groupes d'inoculation, il apparaît que les résistances à la pénicilline, à l'ampicilline, à la cefalotine, à l'erythromycine, à la novobiocine, à l'acide nalixique et à la lincomycine, sont observées fréquemment. Les résistances à la polymyxine et à la colistine sont moins observées. Les résistances à la streptomycine, à la gentamycine, au chloramphenicol, à la tétracycline, à la minocycline et à la sulfadiazine sont par contre beaucoup plus rares. Seules 5 souches sont résistantes au chloramphenicol, 2 à la lincomycine et 2 à la tétracycline.

B - ANTISEPTIQUES

Au vu des résultats intéressants obtenus avec les antibiotiques, nous avons voulu les compléter en étudiant la sensibilité de nos souches, vis-à-vis d'une autre classe d'agents antibactériens, les antiseptiques.

1 - Essais préliminaires :

Avant d'entreprendre l'étude de la sensibilité des souches aux antiseptiques, il nous fallait déterminer la concentration des solutions à utiliser. Pour cela, nous avons effectué un essai sur différentes dilutions décimales des antiseptiques sélectionnés sur 6 souches représentant les principaux groupes de Phizobium. Les résultats sont réunis dans le TABLEAU IX. Il apparaît dans ce tableau que les concentrations intéressantes sont situées entre la dilution au 1/10e et la dilution au 1/100e. Nous avons donc décidé pour la suite de notre travail d'utiliser les solutions antiseptiques qui nous ont été fournies diluées au 1/50e.

2 - Réalisation des Antiseptogrammes :

Les résultats sont reportés sur les TABLEAUX X, XI, XII, XIII, XIV et XV. Nous y avons classé les souches selon les diamètres des zones d'inhibition obtenues sur gélose.

Dilutions Souches de <u>Rhizo-</u> <u>bium</u>	Formol			Glutaral- dehyde			Glyoxal			Gluconate de chlorhexidine			Chlorure d'al- kyl dimethyl benzyl ammo- nium			Bromure de dioctyl di- methyl am- monium		
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
M 17	64	37	22	32	19	8	9	6	6	26	14	10	27	18	11	43	29	11
P 15 S	52	31	16	30	14	6	9	6	6	15	9	6	18	6	6	38	22	6
L 26	70	39	23	37	20	10	12	6	6	24	10	6	23	11	6	50	27	6
Tri 1	66	40	19	27	15	6	10	6	6	16	8	6	26	10	6	43	24	7
G 3	54	28	11	39	15	6	13	6	6	23	10	6	30	14	10	52	25	12
V 19	47	25	9	32	11	6	23	6	6	14	9	6	14	8	6	26	9	6

TABLEAU IX : Détermination de la concentration de l'antiseptique à utiliser en milieu solide : les diamètres des zones d'inhibition sont exprimés en mm.



PHOTO : Antiseptogrammes réalisés en milieu solide.

Souche

Le TABLEAU X concernant le formol montre que la majorité des souches de R. meliloti, de R. phaseoli, de R. japonicum, de R. spp et de Agrobacterium donnent des diamètres de zone d'inhibition compris entre 35 et 55 mm. La majorité des souches de R. leguminosarum, de R. trifolii et de R. lupini sont un peu plus sensibles (diamètres entre 46 et 66 mm). Remarquons que sur 9 souches de R. phaseoli, 6 donnent une zone d'inhibition comprise entre 36 et 45 mm à cet antiseptique. Le TABLEAU XI concerne les résultats obtenus avec le glutaraldehyde : la majorité des souches de chaque groupe donnent des diamètres des zones d'inhibition compris entre 20 et 30 mm. Le TABLEAU XII concerne le glyoxal : pratiquement toutes les souches donnent des diamètres des zones d'inhibition inférieurs à 10 mm.

Sur le TABLEAU XIII sont répartis les résultats obtenus avec le gluconate de chlorhexidine ; la majorité des souches de chaque groupe donnent des diamètres compris entre 10 et 19 mm.

Le TABLEAU XIV concerne le chlorure d'alkyl dimethyl benzyl ammonium : les souches qui donnent des diamètres les plus importants appartiennent aux groupes R. japonicum et R. lupini. Au contraire les souches d'Agrobacterium semblent beaucoup moins sensibles.

Le TABLEAU XV enfin concerne le bromure de didécyl dimethyl ammonium : les souches les plus sensibles appartenant aux groupes R. japonicum et R. lupini, les Agrobacterium semblent les moins sensibles à ce composé.

FORMOL

TABLEAU X

Nombre de souches Diamètres (mm)	R. meli-	R. legu-	R. tri-	R. pha-	R. japo-	R. lu-	R. spp	Agrobac-
	loti	minosarum	folii	seoli	nicum	pini		terium
	24	9	13	9	12	5	12	11
25 $\leftarrow d \leftarrow 35$	1	0	1	0	2	0	3	2
36 $\leftarrow d \leftarrow 45$	12	2	1	6	4	0	3	4
46 $\leftarrow d \leftarrow 55$	11	3	5	3	6	4	5	5
56 $\leftarrow d \leftarrow 65$	0	4	5	0	0	1	1	0
$d \geq 65$	0	0	2	0	0	0	0	0

GLUTARALDEHYDE

TABLEAU XI

Nombre de souches Diamètres (mm)	R. meli-	R. legu-	R. tri-	R. pha-	R. japo-	R. lu-	R. spp	Agrobac-
	loti	minosarum	folii	seoli	nicum	pini		terium
	24	9	13	9	12	5	12	11
10 $\leftarrow d \leftarrow 14$	0	0	0	0	0	0	1	0
15 $\leftarrow d \leftarrow 19$	3	2	2	2	1	0	2	1
20 $\leftarrow d \leftarrow 24$	12	3	2	4	1	1	0	3
25 $\leftarrow d \leftarrow 29$	7	2	6	2	9	1	7	5
30 $\leftarrow d \leftarrow 35$	1	2	3	1	1	3	2	2

TABLEAUX X et XI : Répartition des souches de Rhizobium et d'Agrobacterium en fonction des diamètres des zones d'inhibition (en mm) en milieu solide, pour le formol et le glutaraldehyde.

TABLEAU XII

GLYOXALE

Diamètres (mm)	Nombre de souches							
	R. meliloti	R. leguminosarum	R. trifolii	R. phaseoli	R. japonicum	R. lupini	R. spp	Agrobacterium
	24	9	13	9	12	5	12	11
6 < d < 10	21	9	13	9	12	5	12	11
10 < d < 15	3	0	0	0	0	0	0	0

GLUCONATE DE CHLORHEXIDINE

TABLEAU XIII

Diamètres (mm)	Nombre de souches							
	R. meliloti	R. leguminosarum	R. trifolii	R. phaseoli	R. japonicum	R. lupini	R. spp	Agrobacterium
	24	9	13	9	12	5	12	11
6 < d < 10	2	1	0	0	0	0	0	2
10 < d < 14	15	5	9	8	5	3	7	8
15 < d < 19	6	3	4	1	6	0	5	1
20 < d < 24	1	0	0	0	1	1	0	0
25 < d < 30	0	0	0	0	0	1	0	0

TABLEAUX XII et XIII Répartition des souches de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* en fonction des diamètres des zones d'inhibition (en mm) en milieu solide, pour le glyoxale et le gluconate de chlorhexidine.



CHLORURE D'ALKYLDIMETHYL BENZYL AMMONIUM

TABLEAU XIV

Diamètres (mm)	Nombre de souches							
	R. meli- loti	R. legu- minosarum	R. tri- folii	R. pha- seoli	R. japo- nicum	R. lupi- ni	R. spp	Agrobac- terium
	24	9	13	9	12	5	12	11
d < 10	0	0	1	0	0	0	0	0
10 < d < 14	3	0	0	3	0	0	1	6
15 < d < 19	16	6	3	2	3	0	5	5
20 < d < 24	4	0	5	3	3	1	3	0
25 < d < 29	0	3	4	1	4	3	3	0
30 < d < 35	1	0	0	0	2	1	0	0

BROMURE DE DIDECYLDIMETHYL AMMONIUM

TABLEAU XV

Diamètres (mm)	Nombre de souches							
	R. meli- loti	R. legu- minosarum	R. tri- folii	R. pha- seoli	R. japo- nicum	R. lupi- ni	R. spp	Agrobac- terium
10 < d < 19	0	0	1	0	0	0	1	0
20 < d < 29	2	3	0	1	0	0	1	5
30 < d < 39	21	3	10	4	3	0	6	5
40 < d < 49	1	3	2	4	5	4	3	0
50 < d < 60	0	0	0	0	4	1	1	1

TABLEAUX XIV et XV : Répartition des souches de Rhizobium et d'Agrobacterium en fonction des diamètres des zones d'inhibition (en mm) en milieu solide, pour le chlorure d'alkyldimethyl benzyl ammonium et le bromure de didecyldimethyl ammonium.

C - NODULATION

Dans l'ensemble, la plupart des souches appartenant à chaque groupe d'inoculation ont une sensibilité vis-à-vis des antibiotiques (voir TABLEAU XIII) ; cependant, quelques souches se comportent différemment de celles composant l'ensemble de groupes et on pourrait se demander s'il ne s'agissait pas d'une erreur de dénomination ; c'est pourquoi, nous avons étudié la nodulation pour les quatre principaux groupes :

- R. meliloti,
- R. trifolii,
- R. leguminosarum,
- R. phaseoli.

Parmi chaque groupe, quatre souches ont été étudiées : deux souches correspondant à la sensibilité moyenne du groupe et deux présentant une résistance marquée aux antibiotiques ; il s'agit des souches 2011 Se, 2001 pour R. meliloti, Tri 18, Tri 1 pour R. trifolii, L 18, L12 pour R. leguminosarum et P5, P15 pour R. phaseoli. Les résultats de ces expériences concernant l'apparition des nodules, ainsi que le temps nécessaire et leur nombre par plantule sont consignés dans le TABLEAU XVI . Les photos pages 66 bis et ter, illustrent une partie de ces résultats.

Toutes les souches de R. meliloti ont été soumises à la nodulation sur la plantule de luzerne. Nous avons pour R. trifolii remarqué

que les deux souches T18, T1 montrent une activité nodulante très basse par rapport aux autres deux souches de R. trifolii. Les résultats obtenus avec R. phaseoli et R. leguminosarum montrent une activité nodulante pour les quatre souches étudiées dans chaque groupe. L'ablation chez les grosses graines d'une grande partie des cotylédons, nous a montré une rapidité au niveau de la nodulation et également un ralenti de la croissance de la plantule. La photo page 66 ter montre une activité physiologique de la plantule de haricot à qui on a retiré les cotylédons.

Il apparait donc que les souches ayant un comportement normal du point de vue de leur résistance aux antibiotiques, appartiennent bien au groupe dans lequel elles avaient été classées. Par ailleurs, si ces souches ont acquis une résistance importante aux antibiotiques, celle-ci n'a aucune influence sur la nodulation.

Souches	Nombre d'antibiotiques auxquels la souche est résistante	Temps de nodulation (t)	Nombre de nodules par plantule
M 499	8	10 à 14 jours	18
M 2011en	7		5
2001	9	10 à 20 jours	2
2011 §2	10		6
Tri 35	4	20 à 30 jours	23
Tri 3	4		15
Tri 1	8		16
Tri 18	9		7
P 16	8	20 à 30 jours	56
P CC 511	8		7
P 15	10		15
P 5	4		12
L 53	1	15 à 21 jours	20
L 24	4		134
L 18	10		27
L 12	8		95

TABLEAU XVI : Test de nodulation "in vitro".



D - PLASMIDES

En ce qui concerne la recherche de plasmide par la technique de l'électrophorèse en gel d'Agarose écrite par SIMON et WOHLLEBEN (77), nous avons étudié 16 souches appartenant aux quatre principaux groupes de Rhizobium à croissance rapide : R. meliloti (wu 499, 2001, 2011 en, 2011 se), R. phaseoli (P 16, CC511, P5, P15), R. trifolii (Tri 35, Tri 3, Tri 1, Tri 18), R. leguminosarum (L 24, L 53, L 18, L 12). Nous n'avons pu actuellement mettre en évidence de l'ADN extra chromosomique que pour les souches suivantes : R. meliloti Wu 499, 2001, R. trifolii Tri 3, R. phaseoli P 16, R. leguminosarum L 12. Il faut préciser que la souche 2011 str 3 possède un plasmide d'un poids moléculaire d'environ 260 megadalton qui a été mise en évidence au Laboratoire par BECHET et GUILLAUME (72) ainsi que par SPITZBARTH et coll. (80).

La résistance aux antibiotiques peut être soit de nature chromosomique et cela concerne en général la résistance "naturelle", soit de nature plasmidique et, dans ce cas, il s'agit d'une résistance acquise et le plus souvent d'une résistance à plusieurs antibiotiques.

En examinant le TABLEAU VIII, on pourrait se demander si les souches appartenant aux différents groupes et présentant des caractères de polyrésistance par rapport aux autres nombres de ces groupes ne portaient pas des plasmides de résistance.

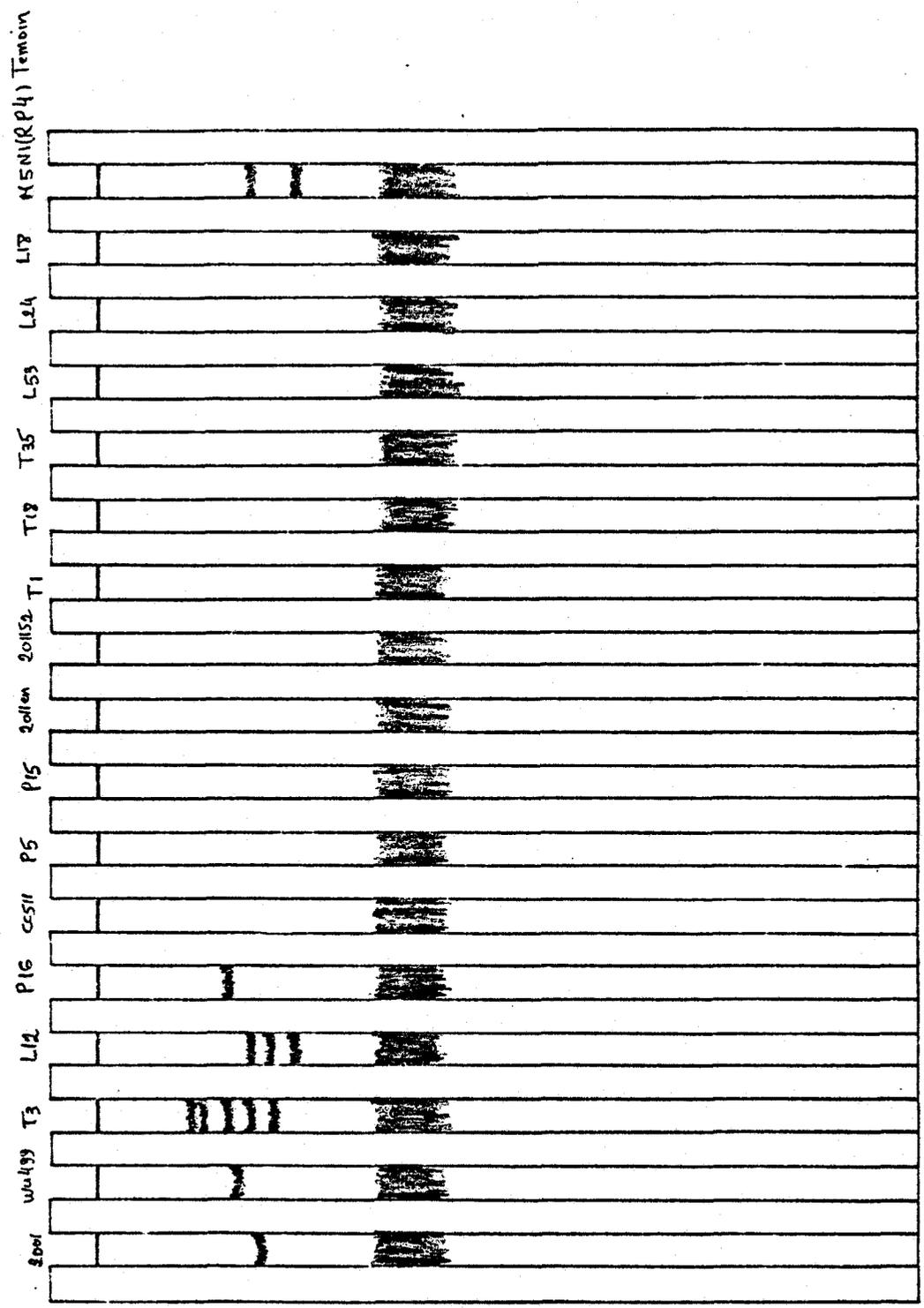
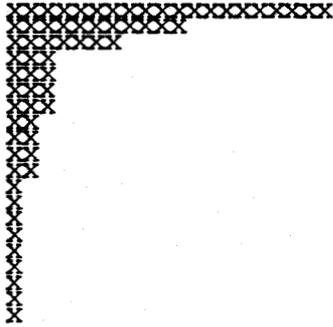


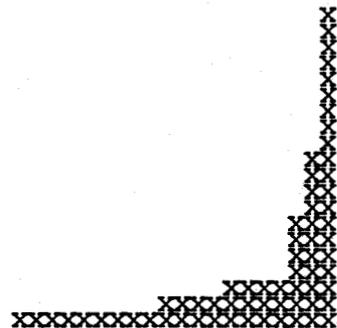
FIGURE : Représentation schématique des bandes correspondant aux plasmides des différentes souches de Rhizobium après 4 heures de migration par électrophorèse en gel d'agarose à 0,6 %.



Photographie d'un gel d'agarose coloré par le bromure d'éthidium et illuminé à 302 nm. Les deux souches dont les noms figurent font partie des souches étudiées dans ce travail.



DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE



Les Rhizobium et les Agrobacterium, comme beaucoup d'autres bactéries à Gram négatif sont sensibles à de nombreuses substances antibiotiques et à des agents toxiques organiques comme des colorants à des herbicides et aussi à des hormones. Les résultats obtenus au cours de notre travail montrent que les différentes souches des groupes de Rhizobium et le groupe Agrobacterium présentent des comportements différents vis-à-vis des antibiotiques. Seule la Lincomycine qui est un inhibiteur des bactéries à Gram positif semble inactive sur la quasi totalité des souches utilisées. Nous pouvons envisager l'utilisation de cet antibiotique dans le milieu de culture ou il peut être incorporé même à dose importante (600 µg /ml). La penicilline à faible concentration semble également pouvoir être utilisée dans de tels milieux sélectifs. Ceci confirme le travail de PATTISON et SKINNER (34) qui recommandent l'utilisation de cet antibiotique dans le milieu de culture à faible concentration (1 UI/ml) car, selon eux, une concentration plus d'un UI/ml dans le milieu de culture a un effet bactéricide très important pour le microorganisme du sol. GRAHAM (6) a également envisagé l'utilisation de la penicilline dans le milieu sélectif ; l'érythromycine et la novobiocine, toujours à très faible concentration, pourraient améliorer également la sélection des milieux de culture. Les autres substances antibiotiques sont actives sur certains groupes d'inoculation et moins actives sur d'autres, mais les résultats obtenus au sein de chaque groupe ne montrent pas la même homogénéité : si R. meliloti, R. japonicum, les Agrobacterium et à l'exception

d'une souche de R. phaseoli apparaissent assez homogènes, il n'en est pas de même pour R. trifolii, R. leguminosarum et R. spp où les résultats sont plus variables d'une souche à l'autre. Pour le groupe R. spp, il s'agit d'une observation banale puisque celui-ci est constitué des souches éloignées les unes des autres, efficaces sur des plantes très différentes. Quant à R. lupini; le faible nombre de souches étudiées ne permet pas de conclure à l'homogénéité ou à l'hétérogénéité du groupe. Au niveau des groupes homogènes, les différences de sensibilité à certains antibiotiques présentent un intérêt taxonomique certain, mais ces substances sont également susceptibles d'améliorer les sélectivités de milieu adapté à l'isolement des bactéries appartenant à ces groupes. Il est classique de distinguer, au sein du genre Rhizobium, des souches à croissance lente et des souches à croissance rapide et de rapprocher de ces dernières les Agrobacterium (10). Dans notre travail, cette distinction peut se faire assez nettement à l'aide de la pénicilline et de la tétracycline : toutes les souches d'Agrobacterium et de R. meliloti étudiées résistant à des doses supérieures à 32 µg/ml de pénicilline, les souches de Rhizobium à croissance lente (R. japonicum et R. lupini) sont relativement plus sensibles à cet antibiotique. GRAHAM (39) observe des résultats semblables pour R. meliloti et Agrobacterium, mais les souches à croissance lente étudiées par cet auteur apparaissent plus résistantes que les nôtres à la pénicilline. Les conditions expérimentales et les souches utilisées différentes des nôtres, expliquent sans doute ces divergences. Cet auteur constate également que R. leguminosarum et R. trifolii sont plus sensibles à la pénicilline que les souches précédemment citées; nous observons les mêmes résultats pour un certain nombre de souches mais l'hétérogénéité de ces groupes rend toute généralisation difficile. Pour les constituants tels que tétracycline et minocycline qui sont les antibiotiques les plus actifs sur le Rhizobium et l'Agrobacterium cette remarque est

observée par VINTIKA (81) ainsi que par SKRDLETA (82) dont les travaux sont repris par VINCENT (8). Cependant la tetracycline est plus active sur les souches à croissance rapide que sur celles à croissance lente. L'isolement des souches à croissance lente pourrait donc être facilité par l'utilisation des faibles doses de tetracycline. L'isolement de R. meliloti et des Agrobacterium pourrait être également amélioré par l'addition de penicilline à des concentrations de l'ordre de 32 µg/ml.

Les Agrobacterium et le Rhizobium meliloti sont considérés comme des espèces proches du point de vue taxonomique (10) (11). Nos résultats obtenus avec la streptomycine et la polymyxine présentent à ce titre, un intérêt taxonomique évident, puisque les Agrobacterium apparaissent souvent comme résistants aux concentrations auxquelles sont sensibles les R. meliloti.

Une étude réalisée par MAHLER et BEZDICEK (46) sur des souches de R. leguminosarum, isolées du sol, montre que les pourcentages de souches résistantes à la pénicilline, streptomycine, tetracycline, erythromycine, novobiocine, polymyxine, sont assez voisins de ceux observés par nous-mêmes. Les souches étudiées par ces auteurs semblent par contre plus résistantes au chloramphenicol. Cependant ces souches sont différentes des nôtres, et la définition de limites de résistance l'est également.

On sait que le Rhizobium est plus tolérant que d'autres microorganismes à l'action de diverses substances antibiotiques simplement du fait qu'il est en contact direct avec la flore bactérienne et fongique du sol qui les synthétisent : le Rhizobium s'est adapté à l'action des métabolites élaborées par cette microflore et est devenu apte à la compétition avec elle.

Les résultats obtenus dans ce travail montrent une variation importante dans la sensibilité des souches de Rhizobium et d'Agrobacterium vis-à-vis de la pénicilline, lincomycine, streptomycine, polymyxine, colistine, ampicilline, cefalotine, gentamycine, chloramphenicol.

Nous n'avons pas remarqué une différence significative dans l'infectivité des pénicillines-résistants, cefalotine-résistant, polymyxine-résistant, colistine-résistant, streptomycine-résistant. Cependant avec les résultats obtenus, il semble que pour le Rhizobium trifolii, les souches résistantes à un ou à deux antibiotiques, ont mieux nodulé que celles qui résistent à plusieurs (4 ou 5 antibiotiques); nous avons vu aussi qu'une souche de R. leguminosarum qui est résistante à six antibiotiques a nettement moins nodulé que les autres souches qui sont résistantes seulement à 1 ou 2 antibiotiques.

Plusieurs travaux concernant l'efficacité des souches résistantes et des souches sensibles ont été envisagés : SCHWINGHAMER et DALMAS (44) n'ont trouvé aucun changement dans l'efficacité des R. leguminosarum, R. phaseoli, R. trifolii et R. meliloti devenus résistants à la pénicilline, tandis que HAMATOVA (56) indique que la pénicilline à la concentration comprise entre 10 et 1000 UI augmente l'efficacité symbiotique chez certaines souches de R. trifolii, alors qu'elle n'avait aucun effet sur R. leguminosarum. L'efficacité symbiotique des mutants résistants aux antibiotiques dépend des structures de ces composés et de leur mode d'action (60, 83, 84).

ABDEL WAHAB (52) a montré que les différentes souches de mutants pénicilline résistants ne présentent aucune différence significa-

tive pour l'efficience avec les souches sensibles ; d'autre part, il a montré qu'avec le chloramphenicol, la plupart des mutants résistants à des doses comprises entre 10 et 15 µg/ml présentent une efficience similaire à celle des souches sensibles.

Grâce aux résultats que nous avons obtenus, nous avons remarqué une augmentation considérable de la vitesse de nodulation chez les légumineuses à grosses graines lors de l'ablation des cotylédons : dans ce cas, la croissance de la plantule est plus lente. Notre travail confirme celui de BONNIER (76) pour les grosses graines.

Au cours de notre travail, nous avons mis en évidence quelques souches ayant un comportement anormal du point de vue de leur résistance aux drogues par rapport à l'ensemble des souches étudiées appartenant au même groupe : on a ainsi trouvé, par exemple, des souches polyrésistantes. L'identification de ces souches est d'un grand intérêt chez Rhizobium : en effet, d'une part, de nombreux auteurs ont établi des relations pouvant exister entre résistance anormale et perte de l'efficience (40, 55, 85) ; d'autre part, chez la presque totalité des souches de Rhizobium, on a mis en évidence des plasmides (66, 70, 71), mais aucune propriété de ces bactéries n'a pu être reliée à leur présence ; or, il est bien connu que les plasmides portent souvent des gènes de résistance aux antibiotiques.

Dans notre étude, l'existence de plasmides chez certaines souches de Rhizobium à croissance rapide a été prouvée. Nous n'avons pas mis en évidence les plasmides pour toutes les souches choisies, car la méthode de lyse et la technique utilisée ne permettent de mettre en évidence des plasmides que pour le R. meliloti (72).

Pourtant plusieurs travaux ont prouvé l'existence de l'ADN extrachromosomique chez différentes espèces de Rhizobium (66,70,71,72). Il semble donc que la lyse n'est pas bien pratiquée, ou que la technique n'est pas parfaitement adaptée à mettre en évidence la présence de plasmides ; malgré l'existence d'ADN extrachromosomique chez R. japonicum (66), ainsi que chez R. meliloti (72) et chez R. de lotus (hétérogène) (70) le rôle des plasmides dans la symbiose - Rhizobium-légumineuse est resté ambigu jusqu'à aujourd'hui : la présence de plasmides ne paraît pas liée à l'activité fixatrice puisque certaines souches efficaces (capables de fixer l'azote) sont apparemment dépourvues de plasmides (71,86). Par contre, les souches non infectieuses ou inefficaces possèdent des plasmides (69,70). D'autre part, d'autres auteurs, après traitement par des agents curatifs comme l'acridine orange, ont pu supprimer chez R. trifolii, l'efficacité (87) ou l'infectivité (88, 89). Le transfert de certains plasmides R des autres bactéries au Rhizobium a été réalisée soit par conjugation (90,91,92, soit par transformation (93, 94).

Le taux de l'ADN plasmidique par rapport à l'ADN total peut être très variable ; en effet, cela dépend du nombre de copies du plasmide par cellule, de la taille des plasmides et de la fixation à la membrane lors de la replication. A ce moment là, il y a probablement liaison avec des protéines qui peuvent être dénaturées par l'emploi de détergents ioniques, d'où perte de la structure super-hélicoïdale du plasmide.

Il faut préciser que la technique de lyse employée qui donne de bons résultats avec la plupart des souches de R. meliloti, n'est

probablement pas aussi efficace du point de vue de la conservation de la structure tertiaire des plasmides des autres espèces de Rhizobium : en effet, celle-ci est peut être plus sensible au détergent employé (SDS).

Concernant la résistance multiple aux antibiotiques pour nos souches étudiées, nous n'avons pas pu mettre en évidence une souche polyrésistante, donc aucune relation ne peut être établie entre les souches résistantes et l'existence de plasmides ; par conséquent, ces deux caractères ne sont probablement pas associés. COLE et ELKAN ont observé le phénomène de polyrésistance chez R. japonicum (47) : selon ces auteurs, les résistances apparaissent fréquemment groupées ce qui permet de suspecter une résistance "plasmidique".

En ce qui concerne les antiseptiques, nous n'observons à peu près aucune différence de sensibilité entre groupes d'inoculation pour le glutaraldéhyde, le glyoxal et le gluconate de chlorhexidine. Le formol donne des résultats un peu plus variables : les souches les plus sensibles semblent appartenir aux groupes des R. leguminosarum, R. trifolii et R. lupini. Les Agrobacterium, R. meliloti et R. japonicum ont une sensibilité moyenne. Les souches les plus sensibles appartenant au groupe de R. phaseoli. Quant aux ammonium quaternaires, chlorure d'alkyl diméthyl ammonium, les Rhizobium à croissance lente R. japonicum et R. lupini sont plus sensibles que ceux des autres groupes. Les Agrobacterium semblent les plus résistants à ces composés, mais sont assez peu différents des R. meliloti,

R. phaseoli, R. leguminosarum et R. trifolii. L'étude de la sensibilité des Rhizobium et d'Agrobacterium aux antiseptiques n'offre pas l'intérêt que présente l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. En effet, les sensibilités aux antiseptiques sont en général assez homogènes et ne permettent pas de faire de distinction nette entre groupes d'inoculation. Seuls les ammonium quaternaires apparaissent particulièrement actifs sur les souches à croissance lente et présentent à ce titre un intérêt taxonomique.

ANNEXES

Les tableaux suivants donnent les valeurs (en mm) des diamètres de zone d'inhibition mesurés en milieu solide pour les diverses souches de Rhizobium et d'Agrobacterium vis-à-vis des antibiotiques étudiés.

Rh.meliloti

± : zone d'inhibition qui apparait
(mais existence de petites colonies)

x : petites colonies autour du disque

Antibio- tiques Souches	Ery	Sulf	OMP	Kam	Nov	Lin	Stre	Pen	Ctn	Gen	Amp	Fet	Col	Nal	Pol	Min
Mel-2011 S2	±11	±24	15	12	23	6	6	6	6	10	16	45	14	16	16	38
Mel-U 45	10	32	8	20	126	6	15	6	6	17	11	46	22	15	18	31
MI-5 Muq	20	±38	14	23	22	6	±14	6	6	12	12	39	12	15	11	32
Meli 2001	12	±34	0	19	20	6	±12	6	6	12	10	35	12	17	8	30
Meli Tu20	14	36	17	14	32	6	21	6	6	9	16	52	13	22	11	44
Meli 2011 Ren	6	±38	7	19	24	6	30	6	6	17	13	43	21	16	18	38
M 145	24	±25	8	25	21	6	20	6	6	23	12	33	12	13	11	28
M 115	11	±29	14	16	27	6	6	6	6	17	22	52	21	22	18	44
M 44	12	32	13	22	28	6	10	6	8	22	13	48	23	11	17	46
M 55	6	31	13	20	30	6	29	6	6	17	18	49	20	22	18	43
FMI	8	±25	8	19	25	6	16	6	6	17	16	44	21	17	17	38
WU 499	10	23	8	19	22	6	10	6	6	15	6	44	19	14	15	44
A 16	19	±32	15	24	28	6	10	6	6	12	21	41	15	28	14	38
MI-5 Col	6	34	23	19	29	6	30	6	8	16	17	52	13	24	17	47
M 21	6	±38	11	22	21	6	28	6	6	15	6	45	23	15	17	45
WU 498	18	30	23	18	26	6	17	6	6	16	±28	50	19	25	18	38
M 12	13	32	18	28	25	6	20	6	±12	23	24	46	24	6	20	41
444	14	±35	22	27	27	6	6	6	8	13	26	49	22	16	19	38
2004	15	35	8	22	22	6	19	6	6	20	12	37	12	15	4	37
V26	18	26	10	21	25	6	8	6	6	19	13	37	13	16	13	35

BUS
L111

Rh. trifolii

Antibio- tiques Souches	Ery	Sulf	CMP	Kam	Nov	Lin	Str.	Pen.	Ctn	Gen	Amp	Tet	Col	Nal	Pol	Min
Tri 41	24	25	15	29	26	6	24	6	9	27	31	49	13	28	20	42
Tri 1	16	33	6	19	16	6	10	6	6	17	15	43	13	17	12	38
Tri 37	35	+32	20	36	35	6	26	6	26	32	30	52	13	26	13	46
TAI	39	+36	13	23	26	6	28	6	6	21	22	53	22	26	19	48
WU 95	28	6	28	32	31	6	28	6	6	26	17	54	20	29	17	48
WU 290	27	+27	18	32	38	6	20	6	16	28	22	49	23	32	20	43
Tri 5	25	+32	24	22	44	6	25	+9	18	26	28	36	22	30	22	39
Tri 25	22	+31	24	32	45	6	20	6	x10	15	18	52	21	27	20	44
Tri 18 S	16	6	12	18	17	6	6	6	6	15	x10	11	15	11	13	19
Tri 35	25	22	12	19	27	6	23	+13	+26	19	32	48	13	20	11	38
Tri 3	26	6	28	24	28	6	26	x24	24	17	x28	53	14	x18	11	45
CC 2480 a	24	26	34	15	34	6	22	17	26	12	34	44	10	27	9	47
Tri 15	22	+26	29	24	27	6	19	x14	x29	14	28	30	10	22	8	29

BUS
LILLE

Rh. leguminosarum

Antibio- tiques Souches	Ery	Sulf	OMP	Kan	Nov	Lin	Stre	Pen	Ctn	Gen	Amp	Tet	Col	Nal	Pol	Min
L 26	13	+30	12	16	23	6	29	6	6	11	18	51	13	20	10	40
L 27	21	+34	14	15	39	6	20	6	6	13	x13	12	10	30	7	11
L 53	32	+28	46	25	37	6	21	20	27	15	35	47	11	27	9	46
L 24	41	+31	18	24	26	6	16	x18	12	12	16	32	11	28	11	46
L 25	28	+23	20	24	25	6	17	+11	+14	15	31	48	11	16	10	44
L 18	15	+30	11	17	26	6	6	6	6	11	13	38	8	15	7	29
L 17	13	24	12	18	20	6	6	6	6	10	17	39	11	15	9	30
L 11	28	+18	28	17	26	6	20	19	29	13	13	36	11	x23	10	32
L 12	24	19	17	21	36	6	15	6	17	13	24	46	8	24	7	45

BUS
LILLE

Rh. phaseoli

Antibio- tiques Souches	Ery	Sulf	CMP	Kan	Nov	Lin	Stre	Pen	Ctn	Gen	Amp	Tet	Col	Nal	Pol	Min
CC 511	13	38	10	27	23	6	6	6	6	18	14	50	13	18	13	46
CC 365	26	39	11	20	42	6	6	6	6	21	6	12	19	38	16	14
P 16 s	13	37	8	25	27	6	6	6	6	19	14	46	10	16	11	44
P 95	32	34	13	23	38	6	6	6	6	22	6	12	20	32	16	16
P 94	9	+30	6	27	27	6	6	6	6	8	6	9	6	31	6	13
P 6	12	27	9	16	27	6	6	6	6	12	x12	42	6	16	6	30
P 5	24	+23	28	16	33	6	16	22	35	15	28	47	9	30	7	42
P 12	11	31	10	17	29	6	6	6	6	12	x12	45	6	17	6	31
P 15s = 3610	18	28	11	14	21	6	6	6	6	11	x11	40	6	18	6	29

BUS
LILLE

Rh. japonicum

Antibio- tiques Souches	Ery	Sulf	CMP	Kan	Nov	Lin	Stre	Pen	Ctn	Gen	Amp	Tet	Col	Nal	Pol	Min
J 85	28	33	18	23	28	6	23	31	44	17	40	34	14	36	12	36
16 A 76	26	27	29	24	33	8	25	6	27	22	17	36	18	38	16	42
J 67	28	32	20	23	32	6	23	11	34	17	32	34	14	35	12	37
G 69	28	34	24	23	32	6	23	32	33	17	34	32	16	36	14	34
CC 1809	28	32	22	25	32	6	25	28	34	18	30	32	15	33	13	32
315 B3	26	34	25	26	24	29	24	33	36	20	37	38	15	32	13	39
J 68	28	36	22	26	32	6	24	32	34	17	32	32	15	35	14	34
J 5	26	27	30	16	31	6	19	x11	31	12	15	33	10	31	8	35
J 6	26	24	30	16	31	0	18	x12	32	17	17	30	10	30	9	31
G 2	30	52	20	17	32	6	15	34	33	11	33	31	7	28	6	46
G 3	30	36	27	19	30	6	16	28	35	32	33	32	9	29	7	46
CC 709	16	+13	16	25	31	6	16	6	+14	+12	+11	17	7	23	6	22



- Cowpea group
- Rh. non spécifique
- Rh. lupini

Antibio- tiques Souches	Ery	Sulf	CMP	Kan	Nov	Lin	Stre	Pen	Ctn	Gen	Amp	Tet	Col	Nal	Pol	Min
V 10	13	6	6	7	32	6	13	6	6	12	6	6	7	6	6	18
V 16	30	32	24	18	26	6	15	27	36	11	35	34	8	24	7	32
V 8 s	x14	+18	x22	19	18	6	+16	6	6	+11	6	12	6	+18	6	15
V19 s	6	+16	24	14	24	6	6	6	6	6	6	6	6	23	6	11
V 17	17	36	30	16	26	6	14	6	14	10	35	46	11	19	9	38
V 6. s	9	+32	6	17	30	6	+16	6	6	11	6	16	9	6	6	25
3001	31	30	24	27	26	6	17	6	36	20	34	42	13	21	11	38
3002	28	31	23	17	27	6	16	19	32	12	28	34	9	25	8	30
RSP 122	22	32	23	16	22	6	13	21	29	10	18	31	8	20	7	37
135	24	48	12	14	36	6	6	6	6	13	6	11	10	28	8	12
CB 756	31	36	26	18	29	6	x18	x31	32	12	x28	39	9	25	8	30
32 H	7	+28	10	13	19	6	12	6	6	9	7	42	12	x11	11	37
WU 425	30	32	25	17	28	6	16	31	37	13	30	32	8	26	7	31
121	18	29	22	7	33	6	14	24	29	8	27	24	6	6	6	14
107	27	32	21	26	25	6	17	22	16	8	30	24	8	32	7	26
65	18	27	20	25	26	6	21	x20	x14	9	6	14	6	22	6	24
61	26	30	24	16	24	6	15	14	30	11	25	31	9	21	7	30

BHS
LILLE

Agro-bacter

Antibio- tiques Souches	Ery	Sulf	CMP	Kan	Nov	Lin	Stre	Pen	Ctn	Gen	Amp	Tet	Col	Nal	Pol	Min
M 2/1	16	x26	10	13	+16	6	6	6	6	10	11	40	6	+15	6	30
B 6 Bily	9	+20	17	19	28	6	6	6	6	11	x22	46	7	29	6	37
TT 111	22	33	20	19	29	6	12	6	12	15	21	32	10	6	7	38
Zutra F/1	23	+22	11	18	19	6	6	6	6	12	x12	41	7	15	6	30
N RRL B37	8	24	20	31	26	6	6	6	9	22	30	40	22	32	20	31
Zutra 3/1	15	31	17	20	21	6	8	6	6	11	x18	50	20	6	6	46
TR 2	14	32	10	14	+17	6	6	6	6	9	+12	41	6	16	6	32
Kerr 38	16	32	9	23	+14	6	6	6	6	18	10	42	10	13	11	40
3602	11	+23	10	12	+15	6	6	6	6	9	+12	36	6	13	6	30
Rhizogenes	14	+25	10	13	+16	6	6	6	6	8	6	39	6	+14	6	29
NC PP B1771	30	28	35	26	36	6	28	6	24	14	29	51	12	36	10	45

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - BLONDEAU R. - 1977
La symbiose Rhizobium-légumineuses et les problèmes d'infectivité
d'efficience et de spécificité d'hôte.
Ann. Biol. T. XVI, FASG. 11-12, 481-516
- 2 - DE ROSNAY J. - 1978
La fixation de l'azote : un espoir contre la faim dans le monde.
La recherche, 17, 10-11
- 3 - LIMPAN J.C. and CONYBEARE A.B. - 1936
Bull. N. J. Agric. Exp. Sta. 607
- 4 - BRETH S.A. - 1975
The return of Medic.
Relevé du cimmyt today, 3 : 1-16
- 5 - POSTGATE J. - 1976
La fixation biologique de l'azote.
La recherche, N° 66, Vol. 7, 335-347
- 6 - GRAHAM P.H. - 1969
Selective medium for growth of Rhizobium.
Appl. Microbial., 17, 769-770
- 7 - GRAHAM P.H. - 1963
Vitamine requirements of root nodule bacteria
J. Gen. Microbiol., 30, 245-248
- 8 - VINCENT J.M. - 1977
Rhizobium : general microbiology. In a treatise on dinitrogen fixation
section III. Biology eds Hardy, R.W.F. and Silver, W. S. pp. 277-366
New-York : Wiley Interscience .

- 9 - VINCENT J.M. - 1974
Root-nodules symbioses with Rhizobium. The biology of nitrogen fixation
(A. QUISPÉL, Editor).
Frontiers of Biology, 33 : 265-341
- 10 - GRAHAM P.H. - 1964
The application of computer techniques to the taxonomy of the nodule.
J. Gen. Microbiol. 35 : 511-517
- 11 - MOFFETT M.L. and COLWELL R.R. - 1968
Adonsonian analysis of the Rhizobiaceae
J. Gen. Microbiol. 51 : 246-266
- 12 - BUCHANAN R.E. et GIBBONS N.E. - 1974
Bergey's Manual of determinative bacteriology. 8th edition.
The Williams and Willeins Co., Baltimore
- 13 - BREED R.S., MURRAY E.G.D. et SMITH N.R. - 1957
Bergey's Manual of determinative bacteriology 7th edition,
The Williams and Wilkins Co., Baltimore
- 14 - BONNIER C. - 1962
Relation entre la spécificité et l'efficacité des souches de Rhizobium.
Ann. Inst. Pasteur, 103, 403
- 15 - NORRIS P.S. - 1965
Acid production by Rhizobium. Aunifying concept.
Plant and Soil, 22, 143-166
- 16 - LONERAGAN J.F. and DOWLING E.J. - 1958
The interaction of calcium and hydrogen ions in the nodulation of
subterranean clover
Aust. J. agric. Res., 9, 464-472

- 17 - LOWTHER W.L. - 1970
Calcium in the nodulation and growth of legumes.
Ph. D. thesis, University of Western Australia. Nedlands
- 18 - LOWTHER W.L. and LONERAGAN J.F. - 1968
Calcium and nodulation in subterranean clover (Trifolium subterraneum L.)
Plant. Physiol., 43, : 1362-1366
- 19 - LOWTHER W.L. and LONERAGAN J.F. - 1970
Calcium in the nodulation of legumes. Proceeding of the eleventh international Grasslands conference, 446-450
- 20 - MUNNS D.N. - 1970
Nodulation of Medicago sativa in solution culture. Calcium and pH requirements during infection.
Plant and Soil, 32, 90-102
- 21 - WILSON D.O. and REISENAUER H.M. - 1970
Effects of some heavy metals on the cobalt nutrition of Rhizobium meliloti.
Plant and Soil, 32, 81-89
- 22 - GRAHAM P.H. - 1976
Identification and classification of root nodule bacteria. In symbiotique nitrogen fixation in plants ed. Nutman, P.S., pp : 99-112, Cambridge : Cambridge University Press.
- 23 - DOKU E.V. - 1970
Effect of day-length and water on nodulation of cowpea (vigna unguiculata L.) in Ghana. Exper. Agric., 6, 13-18
- 24 - ISWARAN V., SUNDARA RAO W.V.B., JAUHRI K.S. and MAGHU S.P. - 1970
Effect of temperature on survival of Rhizobium japonicum in soil and peat.
Mysore J. Agric. Sci., 4, 105-107

- 25 - ROPONEN I., VALLE E. and ETTALA T. - 1970
Effect of temperature on the culture medium on growth and nitrogen fixation of inoculated legumes and Rhizobia.
Physiol. Plant, 23 : 1198-1205
- 26 - WILKINS J. - 1967
The effects of high temperature on certain root nodules bacteria
Aust. J. Agric. Rec : 18, 299-304
- 27 - BONNIER C. - 1960
Symbiose Rhizobium-légumineuse. Aspects particuliers aux régions tropicales.
Ann. Inst. Pasteur, 98, 538-556
- 28 - GIBSON A.H. - 1971
Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes.
Plant and Soil, special volume, 139-152
- 29 - SCHREVEN D.A. VAN - 1964
The effect of some actinomycetes on Rhizobia and Agrobacterium radiobacter
Plant and Soil, 21, 283-302
- 30 - VISONA L. et TARDIEUX P. - 1964
Antagonistes des Rhizobium dans la rhizosphère du trèfle et la luzerne.
Ann. Inst. Pasteur, 107.S, 297-302
- 31 - ROBINSON R.S. - 1946
The antagonistic action of the by-products of a culture of Aspergillus wentii on the legume bacteria.
J. Bact. 51 : 129
- 32 - WIERINGA K.T. - 1963
Organismes isolés du sol des Apennins, producteurs d'antibiotiques envers diverses souches de Rhizobium.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 105 : 417-425

- 33 - BROUGHTON W.J., CHAN P.Y., PADMANABHAN S. and TAN I.K.P. - 1975
Rhizobia in tropical legumes. I. Preliminary studies of antibiotic sensitivity, pH and temperature optima.
Malaysian Agric. Res., 4 : 141-153
- 34 - PATTISON A.C. and SKINNER F.A. - 1974
The effects of antimicrobial substances on Rhizobium spp and their use in selective media.
J. Appl. Bact., 37 : 239-250
- 35 - IBRAHIM A.N. - 1970
Growth inhibition of Rhizobia by certain antagonistic organisms.
Bot. poloniae Acta Soc. Vol. 49 : 333-338
- 36 - ABDEL-GHAFFAR A.S., ALLEN O.N. - 1950
The effects of certain microorganisms on the growth and function of Rhizobia.
Trans. 4th. Internat. Con., Soil Sci. 3
- 37 - KAMEL M., IBRAHIM A.N., SHATA A. - 1970
Occurance of antagonistic organisms in the rhizosphere of garden - bean plants
Folia microbiologica
- 38 - DAVIS R.J. - 1962
Resistance of Rhizobia to antimicrobial agents
J. Bact., 84 : 187-188
- 39 - GRAHAM P.H. - 1963
Antibiotic sensitivities of the root nodule bacteria.
Aust. J. Biol. Sci. Vol. 16, 557-559
- 40 - HENDRY G.S., JORDAN D.C. - 1969
Ineffectiveness of viomycin-resistant mutants of Rhizobium meliloti.
Canad. J. Microbiol. 15 : 671-675

- 41 - FOGLE C.E. and ALLEN O.N. - 1948
Associative growth of actinomycetes and Rhizobia.
Proc. 48th Gen. Mtg. Soc. Amer. Bact., Minneapolis, Vol. 1, p. 53
- 42 - LANDERKIN G.B. and LOGHEAD A.G. - 1948
A comparative study of the activity of fifty antibiotic actinomycetes
against a variety of soil bacteria.
Canad. J. Res. C 26 : 501-506
- 43 - NILSSON P.E. - 1957
The influence of antibiotics and antagonists on symbiotic nitrogen
fixation in legume cultures.
K. Lantbrhögsk. Ann., 23, 219-253
- 44 - SCHWINGHAMER E.A., and DALMAS R.L. - 1961
Studies on induced variation in the rhizobia. II Radiation sensitivity and
indication of antibiotic resistance markers.
Appl. Microbiol., 9, 410-414
- 45 - KECSKES M. and MANNINGER E. - 1960
Püfung der resistenz von Rhizobien. Stämm en gogen antibiotika und
Sulphanamide.
Naturwissenschaften, 47, 162-163
- 46 - MAHLER R.L. and BEZDICEK D.F. - 1978
Diversity of Rhizobium leguminosarum in the palouse of Eastern Washington
Appl. Environ. Microbiol., 36, 780-782
- 47 - COLE M.A. and ELKAN G.H. - 1979
Multiple antibiotic resistance in Rhizobium japonicum.
Appl. Environ. Microbiol., 37, 867-870

- 48 - JOSEY D.P., BEYNON J.L., JOHNSTON A.W.B. and BERINGER J.E. - 1979
Strain identification in Rhizobium using intrinsic antibiotic resistance
J. Appl. Bact. 46, 343-350
- 49 - BROCKWELL J., SCHWINGHAMER E.A. and GAULT R.R. - 1977
Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into fields environments. V. A critical examination of the stability of antigenic and streptomycin - resistance markers for identification of strains of Rhizobium trifolii.
Soil. Biol. Biochem. 9 : 19-24
- 50 - OBATON M. - 1971
Utilisation de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des Rhizobium.
C. R. Acad. Sci. Ser. D. 272 : 2630-2633
- 51 - SCHWINGHAMER E.A. and DUDMAN W.I. - 1973
Evaluation of spectinomycin resistance as a marker for ecological studies with Rhizobium spp.
J. Appl. Bact. 36 : 263-272
- 52 - ABDEL WAHAB S.M., RIFAAT O.M., AHMED K.A., HAMDI Y.A. - 1976
Resistance to antibiotics in Rhizobium trifolii and its relation to nitrogen fixation.
Zbl. Bakt. Abt II, Bd 131 : 170-176
- 53 - LEVIN R.A., MONTGOMERY M.P. - 1974
Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutant of Rhizobium japonicum.
Plant and Soil 41 : 669-676
- 54 - PAIN A.N. - 1979
Symbiotic properties of antibiotic-resistant and auxotrophic mutants of Rhizobium leguminosarum.
J. Appl. Bact. 47 : 53-64

- 55 - PANKHURST C.E. - 1977
Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast and slow growing strains of Rhizobium nodulating lotus species.
Canad. J. Microbiol. 23 : 1026-1033
- 56 - HAMATOVA E. - 1960
The effect of penicillin on the symbiosis of Rhizobia with leguminous plants.
Plant. Prod., 33, 71-90
- 57 - BALASSA G. - 1963
Genetic transformation of Rhizobium.
A review of the work of Balassa, R. Bact. Rev., 27, 228-241
- 58 - BALASSA R. - 1957
Durch desoxyribonukleinsäuren induzierte veränderungen bei Rhizobium
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung, 4, 85-95
- 59 - GUPTA B.M. and KLECZKOWSKA J.
A study of some mutations in a strain of Rhizobium trifolii
J. Gen. Microbiol., 27, 473-476
- 60 - SCHWINGHAMER E.A. - 1967
Effectiveness of Rhizobium as modified by mutation for resistance to antibiotics
Antonic van Leeuwenhoek, 33, 121-136
- 61 - BACHMANN B.J., LOW K.B. and TAYLOR A.L.
Recalibrated linkage map of Escherichia coli K 12
Bacteriol. Rev., 40 (1976), 116-167
- 62 - CLOWES R.C. - 1972
Molecular structure of bacterial plasmides
Bacterial. Rev., 36, p 361-405

- 63 - COLE M.A. and ELKAN G.H. - 1973
Antimicrob. Agent Chemother. 4, 248
- 64 - KLIJEN G.E., P. JEMISON, R.A. HAAK et A.G. MATTHYSSE - 1975
Physical evidence of a plasmid in Rhizobium japonicum
Experientia, 31 : 532-533
- 65 - KUYKENDALL L.D. and G.H. ELKAN - 1976
Rhizobium japonicum derivatives differing in nitrogen fixing efficiency and
carbohydrate utilisation.
Appl. Environ. Microbiol., 1976, 32 : 511-519
- 66 - LUYINDULA N., G. TSHITENGE, P. LURQUIN et L. LEDOUX - 1975
Etude des plasmides de Rhizobium japonicum.
Arch. Int. physiol. Biochim. 83 : 199-200
- 67 - DENNIS C. GROSS, ANNE K. VIDAVER and ROBERT V. KLUCAS - 1979
Plasmids, Biological properties and efficacy of nitrogen fixation in
Rhizobium japonicum strains indigenous to alkaline soils.
J. Gen. Microbiol., 1979, 114 : 257-266
- 68 - CASSE F., C. BOUCHER, J.S. JULLIOT, M. MICHEL and J. DENARIE - 1979
Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti
using agarose gel electrophoresis.
J. Gen. Microbiol. 113 : 229-242
- 69 - NUTI M.P., LEDEBOER A.M., LEPIDI A.A. et SCHILPEROORT R.A. - 1977
Large plasmids in different Rhizobium species.
J. Gen. Microbiol. 100 : 241-248
- 70 - TSHITENGE G., LUYINDULA N., LURQUIN P.F. et LEDOUX L. - 1975
Plasmid deoxyribonucleic acid in Rhizobium vigna and Rhizobium trifolii
Biochim. Biophys. Acta 414 : 357-361

- 71 - ZURKOWSKI W. et Z. LORKIEWICZ - 1976
Plasmid DNA in Rhizobium trifolii.
J. Bacteriol. 128 : 481-484
- 72 - BECHET M. et J.B. GUILLAUME - 1978
Mise en évidence d'ADN extrachromosomique chez Rhizobium meliloti.
Can. J. Microbiol. 24 : 960-966
- 73 - ISWARAN V., ABHISWAR SEN and APTE R. - 1975
A simple medium for quick growth of Rhizobium japonicum.
Zbl. Bakt Abt. 11, 128 : 23-24
- 74 - BERINGER J.E. - 1973
Genetic studies with Rhizobium leguminosarum.
Thesis - PHD
- 75 - U.S. Pharmacopeia, Nineteenth revision - 1975
USP Conventions Inc. 12 601 Twinbrook parkway, Rockville
- 76 - BONNIER C. et BROUWERS L. - 1959
Nodulation en tubes de verre, de légumineuses à grosses graines cultivées
Bull. Inst. Agron. et Stat. Rech., Gembloux, 26, 4, 317-321
- 77 - WOHLLEBEN W. and SIMON R. - 1979
Identification of Rhizobium plasmids.
Communication au Congrès de Spitzingsee (R.F.A.)
- 78 - ERICSSON H.M. and SHERRIS J.C. - 1971
Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaboration
study.
Acta path. and microbiol. scandinav., section B, suppl. 217, 8-90
- 79 - FISHER A. et YATES F. - 1953
Statistical tables for biological, agricultural and medical research
Editées par MM. OLIVER and BOYED Ltd, Edinburgh.

- 80 - SPITZBARTH M., PÜHLER A. and HEUMANN W. - 1979
Characterization of plasmids isolated from Rhizobium meliloti.
Arach. Microbiol. 1979, 121 : 1-8
- 81 - VINTIKA J. and VINTIKOVA H. - 1958
For. Soc. Agr. Sci. 7 : 349
- 82 - SKRDLETA V. - 1965
Ved. Pr. Vysk. UST. Rostl. Vyroby, Prahe-Ruzyne - 177
- 83 - SCHWINGHAMER E.A. - 1968
Loss of effectiveness and infectivity in mutants of Rhizobium resistant
to metabolic inhibitors.
Can. J. Microbiol., 14 : 355-367
- 84 - MACKENZIE C.R. and JORDAN D.C. - 1970
Cell wall phospholipid and viomycin resistance in Rhizobium meliloti
- 85 - SCHWINGHAMER E.A. - 1963
Association between antibiotic resistance and ineffectiveness in mutant
strains of Rhizobium spp.
Can. J. Microbiol. 10 : 221-233
- 86 - REIJNDERS L., VISSER L., AALBERS M.J., VANKAMMEN A. et HOUWERS A. - 1975
A comparison of DNA from free living and endosymbiotic Rhizobium
leguminosarum (strain PRE).
Biochim. Biophys. Acta, 414 : 206-216
- 87 - DUNICAN L.K. et CANNON F.C. - 1971
Genetic control of symbiotic properties in Rhizobium : evidence for
plasmid control.
Plant Soil sp. vol. 73-79

- 88 - 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
- 89 - SURKOWSKI W., HOFFMAN M. et LORKIEWICZ - 1973
Effect of acriflavine and sodium-dodecyl sulphate on infectiveness of Rhizobium trifolii.
Acta Microbiol. Pol. Ser. A, 5 : 55-60
- 90 - BERINGER J.E. - 1976
The demonstration of conjugation in Rhizobium leguminosarum
p. 91-97 in P.S. Nutman (ed.), Symbiotic nitrogen fixation in Plants
Cambridge University Press, Cambridge.
- 91 - DAITTA N. and HEDGES R.W. - 1972
Host ranges of R factors
J. Gen. Microbiol., 70 : 453-460
- 92 - DAITTA N. and HEDGES R.W., SHAW E.T., SYKES R.B. and RICHMOND M.H. - 1971
Properties of an R factor from Pseudomonas aeruginosa.
J. Bacteriol., 108 : 1244-1249
- 93 - DUNICAN L.K. and TIERNEY A.B. - 1973
Transformation of an R.-factor from Pseudomonas aeruginosa into
Rhizobium trifolii.
Mol. Gen. Genet. 126 : 187-190
- 94 - O'GARA F. and DUNICAN L.K. - 1973
Transformation and physical properties of R. factor RP 4 transferred
from Escherichia coli to Rhizobium trifolii.
J. Bacteriol., 116 : 1177-1180