

N° d'ordre : 861

50376
1980
238

50376

1980

238

Consultation s/ place

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"

Mention MICROBIOLOGIE

par

Danielle BURG

**ASPECTS DU COMPORTEMENT CHIMIOTACTIQUE
CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI**



Soutenue le 11 Décembre 1980 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury

J. GUILLAUME
R. TAILLIEZ
J.C. DERIEUX
J. KREMBEL
J. BOUVIER

1 ex

50376
1980
238

d'ordre : 861

50376
1980
238

Consultation s/ place
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"

Mention MICROBIOLOGIE

par

Danielle BURG

**ASPECTS DU COMPORTEMENT CHIMIOTACTIQUE
CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI**



Soutenu le 11 décembre 1980 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury

J. GUILLAUME
R. TAILLIEZ
J.C. DERIEUX
J. KREMBEL
J. BOUVIER

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE, sous la direction de Monsieur le Professeur J.B. GUILLAUME. Nous tenons à lui exprimer ici nos plus vifs remerciements pour son appui, ses précieux conseils, l'intérêt et la compréhension qu'il a toujours montrés à notre égard. Qu'il soit assuré de notre profonde reconnaissance.

Nous tenons également à remercier Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ pour ses critiques et les conseils précieux qu'il nous a prodigués tout au long de ce travail.

Nous remercions Monsieur le Professeur J.C. DERIEUX d'avoir consacré une partie de son temps à la lecture attentive du manuscrit et de l'amabilité avec laquelle il a bien voulu accepter de faire partie de notre jury.

Que Monsieur le Professeur J. KREMBEL trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance pour avoir accepté de juger notre travail et de participer à notre jury.

Nous sommes reconnaissants à Messieurs S. SZMELCHMAN et J. BOUVIER de nous avoir permis de faire un stage dans leur laboratoire au moment d'initier cette recherche. Nous remercions Monsieur le Professeur J. BOUVIER d'accepter de juger notre travail et de participer à notre jury.

Enfin, nous tenons à remercier tous les chercheurs, le personnel du laboratoire ainsi que tous ceux dont l'affection ou l'amitié nous ont soutenus.

T A B L E D E S M A T I E R E S

INTRODUCTION

I ETAT ACTUEL CONNAISSANCES SUR LE CHIMIOTACTISME BACTERIEN,

I.1. ETUDE DU CHIMIOTACTISME : LES DIFFERENTES TECHNIQUES	3
I.2. MECANISME GLOBAL DU CHIMIOTACTISME	11
I.3. PERCEPTION DES MODIFICATIONS DE L'ENVIRONNEMENT	15
I.4. FONCTIONNEMENT DES FLAGELLES	25
I.5. CONTROLE ET TRANSMISSION	30

II COMPORTEMENT CHIMIOTACTIQUE DE RHIZOBIUM

II.1. GENERALITES SUR LA SYMBIOSE ET LA SPECIFITE DE L'ASSOCIATION	37
II.2. COMPORTEMENT CHIMIOTACTIQUE DE <u>RHISOBIUM</u> ET SYMBIOSE	44

MATERIEL ET METHODES

I MATERIEL BACTERIEN ET VEGETAL	45
I.1. LA SOUCHE BACTERIENNE	45
I.2. LA LEGUMINEUSE	45

II MILIEUX ET TAMPON

II.1. MILIEU W DE WRIGHT

II.2. MILIEU T.Y.

II.3. MILIEU R.C.

II.4. MILIEU R.H.B₁

II.5. MILIEU M₉A

II.6. MILIEU N.T.

II.7. TAMPON C.W.

III COLORANTS ET SOLUTIONS

III.1. COLORANTS DES FLAGELLES POUR
PREPARATIONS OBSERVABLES EN
MICROSCOPIE OPTIQUE

III.2. SOLUTIONS UTILISEES POUR LES
OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE
ELECTRONIQUE

III.3. DESINFECTANT POUR GRAINES
DE LUZERNE

IV TECHNIQUES D'OBSERVATION DE LA CILIATURE

IV. 1. EN MICROSCOPIE OPTIQUE

IV. 2. EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

V TECHNIQUES D'OBSERVATION DU DEPLACEMENT BACTERIEN	51
VI TECHNIQUES D'ETUDE DU CHIMIOTACTISME	52
VI.1. PREPARATION DE LA SOUCHE BACTERIENNE	52
VI.2. TECHNIQUE EN BOITE DE PETRI	53
VI.3. TECHNIQUE EN CAPILLAIRE	54
VII PREPARATION D'EXSUDATS RACINAIRES	57
VIII DOSAGE DES ACIDES AMINES	60

RESULTATS

I ETUDE DE LA MOBILITE DE LA SOUCHE	61
I.1. CILIATURE	61
I.2. CONDITION DE MOBILITE	63
A-En milieux faiblement gélosés	63
B-En milieu liquide	65
I.3. COMMENTAIRES	67
II ETUDE DE LA REPONSE CHIMIOTACTIQUE EN CAPILLAIRE	70
II.1. INFLUENCE DE DIVERS PARAMETRES SUR LA REPONSE CHIMIOTACTIQUE	70
II.2. COMMENTAIRES	78

III COMPORTEMENT CHIMIOTACTIQUE DE RHIZOBIUM
EN PRESENCE D'EFFECTEURS SIMPLES

III.1. REMARQUES PRELIMINAIRES

III.2. ACTION DE CERTAINS SUCRES
ET DERIVES

III.3. ACTION DE LA BIOTINE ET DE LA
THIAMINE

III.4. ACTION DES ACIDES AMINES

III .5. COMMENTAIRES

IV COMPORTEMENT CHIMIOTACTIQUE DE RHIZOBIUM
EN PRESENCE DE SUBSTANCES D'ORIGINE VEGETALE

IV.1. REPONSE DE RHIZOBIUM AUX EXSUDATS
RACINAIRES

IV.2. DOSAGE DES ACIDES AMINES LIBRES
REPONSE DE RHIZOBIUM A DES MELANGES
RECONSTITUES

IV.3. COMMENTAIRES

DISCUSSION GENERALE-CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

La première manifestation visible de l'installation de la symbiose Rhizobium-légumineuse est une accumulation préférentielle de la bactérie dans la rhizosphère que la seule prolifération ne peut justifier.

Peut-être est-ce là, pour la plante, une façon d'exercer sa sélectivité - par le biais du chimiotachisme - sur son association avec Rhizobium ?

Avant d'exposer et de commenter nos résultats, nous ferons le point des connaissances d'une part sur le chimiotactisme bactérien et d'autre part sur les aspects de la spécificité de l'association Rhizobium-légumineuse pour y situer le phénomène chimiotactique.

.....

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

.....

I - ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LE CHIMIOACTIVITE BACTERIENNE

Les bactéries mobiles, en contrôlant leurs déplacements, peuvent améliorer leur environnement. Elles sont, en effet, capables de nager vers des composés, tels des nutriments favorables à leur survie et de fuir ceux qui peuvent leur être nocifs. Elles contrôlent donc les conditions de leur environnement selon un processus analogue au comportement "essai-erreur" des espèces supérieures. Cette aptitude, répandue chez les êtres vivants, se retrouve également chez un grand nombre de bactéries qualifiées souvent d'êtres inférieurs (78).

Le chimiotactisme bactérien, ce mouvement d'approche ou de fuite à l'encontre de produits chimiques, a été découvert il y a un siècle par ENGELMANN (56) et PFEFFER (119) et fut très étudié à l'époque.

Après une longue période de silence, un regain d'intérêt est apparu ces dernières années comme en témoignent les articles de synthèse écrits par les auteurs suivants, à qui l'on doit, par ailleurs, l'essentiel des connaissances sur ce sujet : ADLER (2, 4) ; BERG (24) ; KOSHLAND (76,77,78) ;

MACNAB (85) ; SEYMOUR et DOETSCH (129) .

Des récepteurs situés à la périphérie de la bactérie reçoivent des "signaux". Ceux-ci sont alors traités par la "machinerie" chimiotactique. L'"information" est ensuite transmise au flagelle, provoquant sa rotation inverse et une volte-face rapide de la bactérie, appelée "culbute" (tumble en anglais).

C'est la régulation de la fréquence de ces culbutes, en relation directe avec la présence de certains composés du milieu, qui détermine le déplacement de la bactérie : attirance ou chimiotactisme positif (par diminution de la fréquence des culbutes), éloignement ou chimiotactisme négatif (par augmentation de la fréquence des culbutes).

Cette apparente simplicité ne recouvre pas moins de six problèmes fondamentaux :

- Comment se meut une bactérie dans un gradient de composés attractifs ou répulsifs ?
- Comment la bactérie détecte ces composés ?
- Comment se fait la transmission de l'information au flagelle ?
- Comment le flagelle produit-il le mouvement ?
- Comment le flagelle répond-il à l'informa-

tion sensorielle pour provoquer un changement approprié de direction ?

- Dans le cas d'informations sensorielles multiples ou contradictoires, comment se fait l'intégration ?

Une réponse à ces questions exige l'emploi simultané de techniques bactériologiques, biochimiques, génétiques, microscopiques et cinématographiques.

I. 1. ETUDE DU CHIMIOTACTISME: LES DIFFERENTES TECHNIQUES.

Les travaux antérieurs à 1965, bien que toujours valables, présentent un caractère assez subjectif. ADLER et son équipe de chercheurs ont mis au point deux techniques principales permettant la définition des conditions de mobilité et de chimiotactisme, ainsi que l'évaluation quantitative de la réponse chimiotactique.

La première de ces méthodes appelée "méthode de migration en boîte de Pétri" (Plate Method, expression anglaise d'ADLER (148) se déroule en milieu semi-solide. Pour la visualisation d'une réponse chimiotactique positive (attraction), un inoculum bactérien est déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant un milieu minimum de croissance faiblement gélosé et

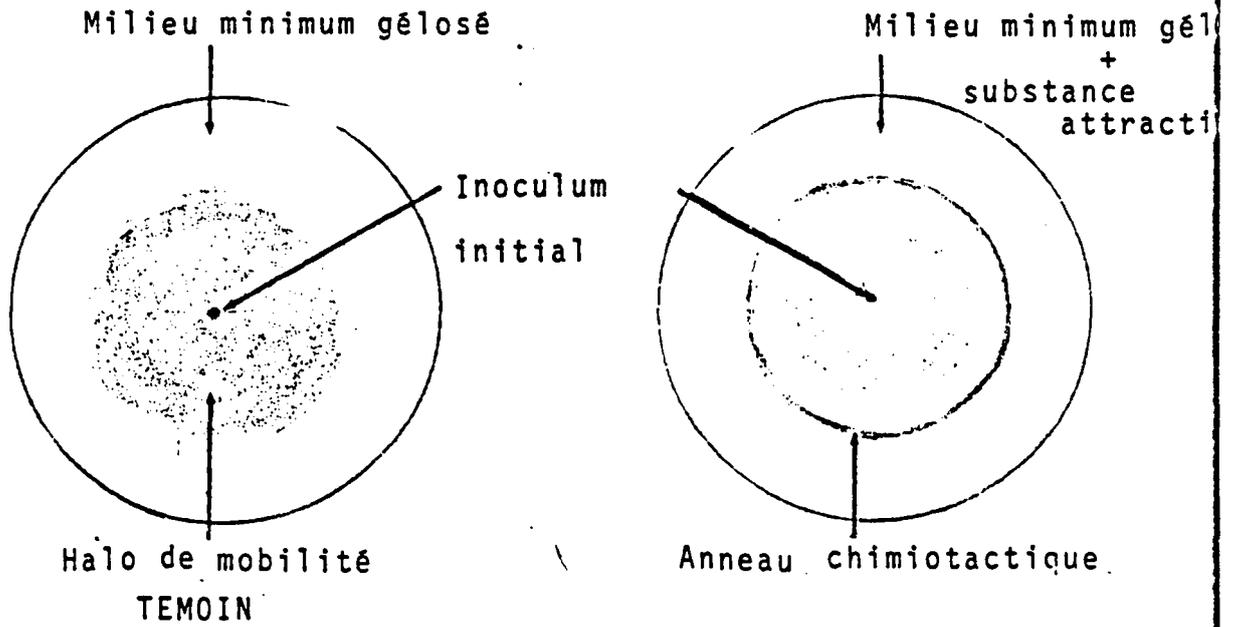


FIGURE N° 1

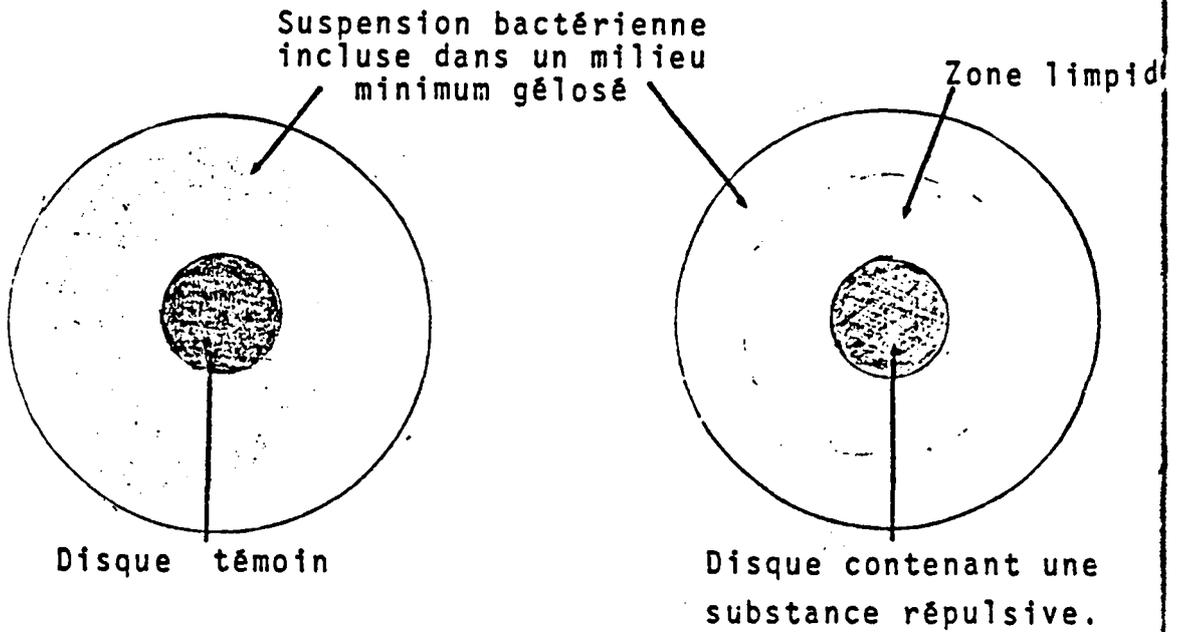


FIGURE N° 2



la substance attractive choisie. En consommant cette substance, les bactéries créent elles-mêmes un gradient "qu'elles poursuivent". Il est alors aisé d'observer l'anneau bactérien se développant autour du point d'inoculation (FIGURE N° 1).

Le principe de mise en évidence d'une réponse négative (répulsion) est légèrement différent (FIGURE N° 2). Les bactéries sont incluses dans un milieu semi-solide et l'ensemble est coulé en boîte de Pétri. Des disques fortement gélosés contenant la substance répulsive y sont insérés. Rapidement les bactéries "fuient" les environs des disques et des zones limpides auréolent les disques ; les figures observées rappellent un peu celles des antibiogrammes.

La deuxième méthode est appelée "méthode de migration en capillaire" ("Capillary Method", selon ADLER (1)). Elle consiste en un dénombrement des bactéries ayant migré dans un capillaire contenant la substance à tester. Elle permet donc l'évaluation quantitative de la réponse chimiotactique.

Grâce à ces deux techniques complémentaires, ADLER a pu établir l'essentiel de ce que l'on connaît sur la "perception" bactérienne. Le comportement chimiotactique de n'importe quelle souche de bactéries peut être étudié aisément : la définition des conditions physicochimiques du chimiotactisme,

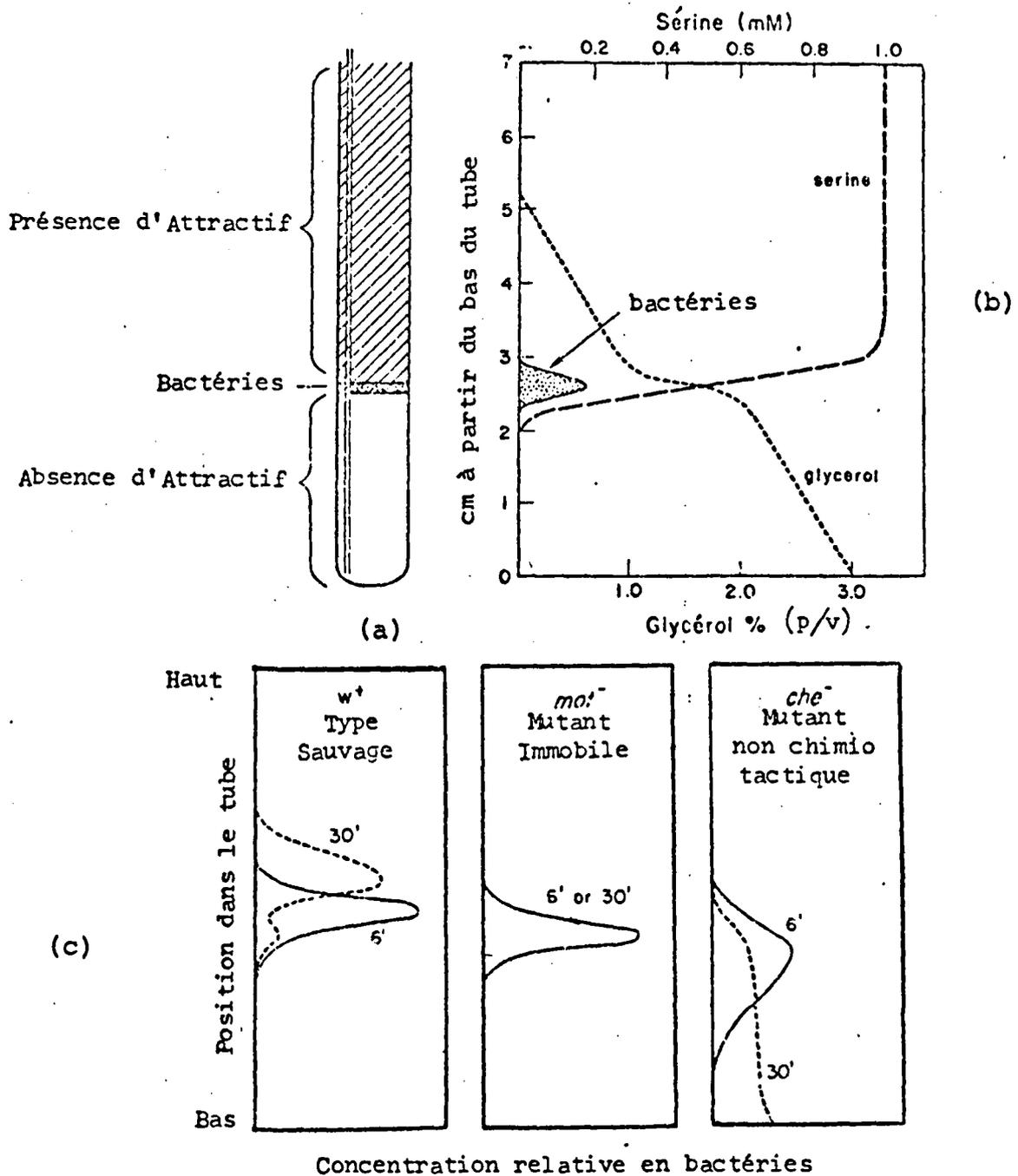


FIGURE N° 3 : TECHNIQUE DE DAHLQUIST (40).

a-dispositif expérimental

b-répartition de la population bactérienne en fonction du gradient

c-comparaison du comportement de deux types de mutants

l'évaluation quantitative de la réponse, la détermination des concentrations optimales et liminaires, l'étude du comportement bactérien en présence de deux substances actives se font par la technique en milieu liquide (migration en capillaire) ; la méthode en milieu semi-solide sert à l'étude systématique de substances variées, permet une première estimation du domaine de concentrations appropriées, et l'isolement de diverses classes de mutants.

On conçoit qu'elles soient toutes deux très utilisées dans l'analyse du comportement chimiotactique (3,8, 36,82,91,92,94,95,115,139,140,150,151).

Les autres techniques ne présentent pas cette facilité et cette souplesse d'utilisation, mais deviennent nécessaires pour une meilleure connaissance du phénomène chimiotactique. Ainsi, l'étude de la distribution d'une population bactérienne au sein d'un gradient défini se fait grâce au dispositif décrit FIGURE N° 3 que l'on doit à DAHLQUIST (40). En mesurant la dispersion d'un rayon laser par les bactéries, il est possible de comparer les comportements de diverses souches et de leurs mutants, dans un gradient préformé dont on peut par ailleurs modifier les caractéristiques.

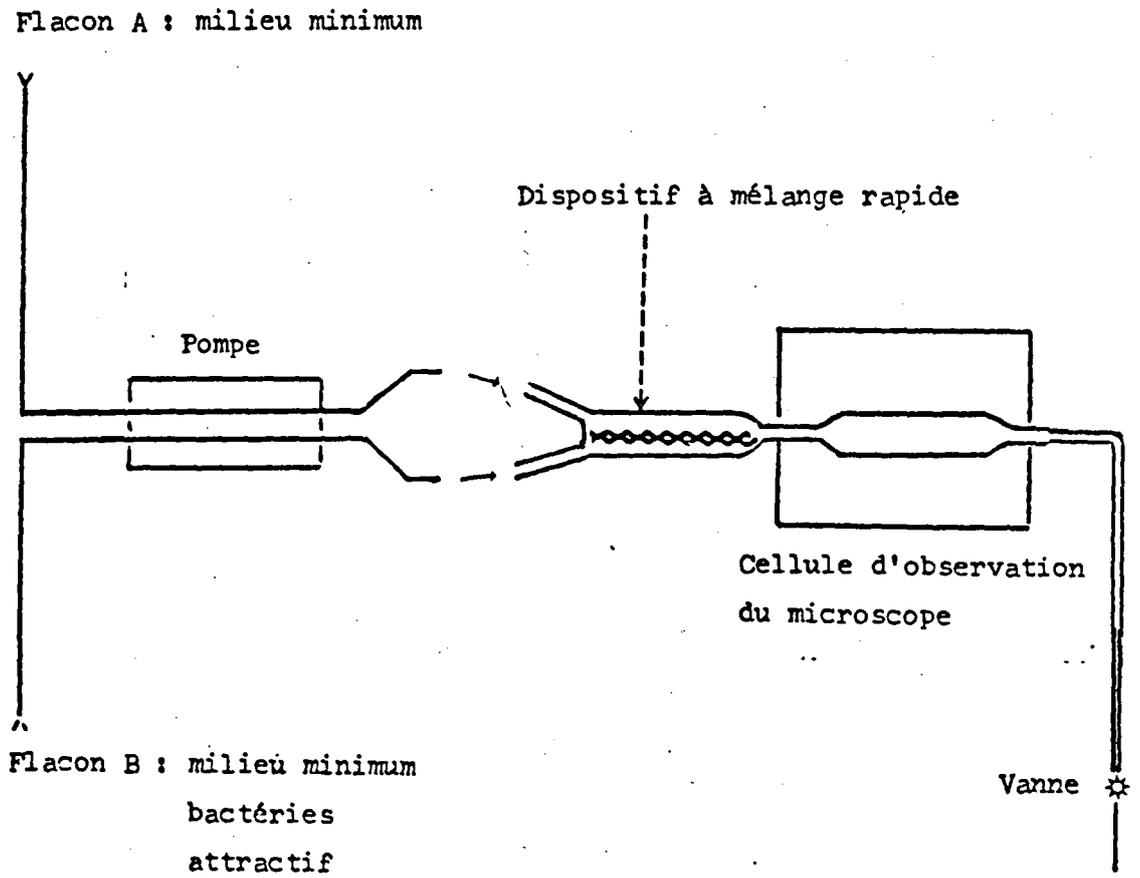


FIGURE N° 4 : SCHEMA DE L'APPAREIL A GRADIENT TEMPOREL
selon MACNAB et KOSHLAND (86).



Actuellement, le déplacement d'une bactérie peut être suivi et enregistré graphiquement. Le premier dispositif "pisteur" (Tracker) a été conçu par BERG (22). Une suspension bactérienne est placée dans une chambre rendue mobile grâce à un système électronique de compensation : à chaque déplacement de la bactérie correspond un déplacement inverse de la chambre. La bactérie, pour l'observateur au microscope, semble immobile tandis que les mouvements de la cellule d'observation sont enregistrés. BERG et BROWN (26) puis LOVELY et ses collaborateurs ont perfectionné et adapté le système pour suivre plus aisément la trajectoire de bactéries très rapides telles les Salmonella (84).

Conçu à l'origine pour établir si le système bactérien de détection était réellement temporel (sensibilité à une concentration différente de celle régnant antérieurement), MACNAB et KOSHLAND (86) ont imaginé un appareillage (semblable à celui utilisé en cinétique enzymatique) qui se révèle actuellement utile à l'étude du comportement chimiotactique. Suspension bactérienne et solution à tester sont rapidement mélangées et envoyées vers une cellule d'observation d'un microscope (FIGURE N° 4). La concentration en substance attractive (ou répulsive) est à ce moment là isotrope. Etant donné la rapidité du mélange (de l'ordre de 200 millisecondes), on peut considérer que les bactéries reçoivent un stimulus équivalent à celui

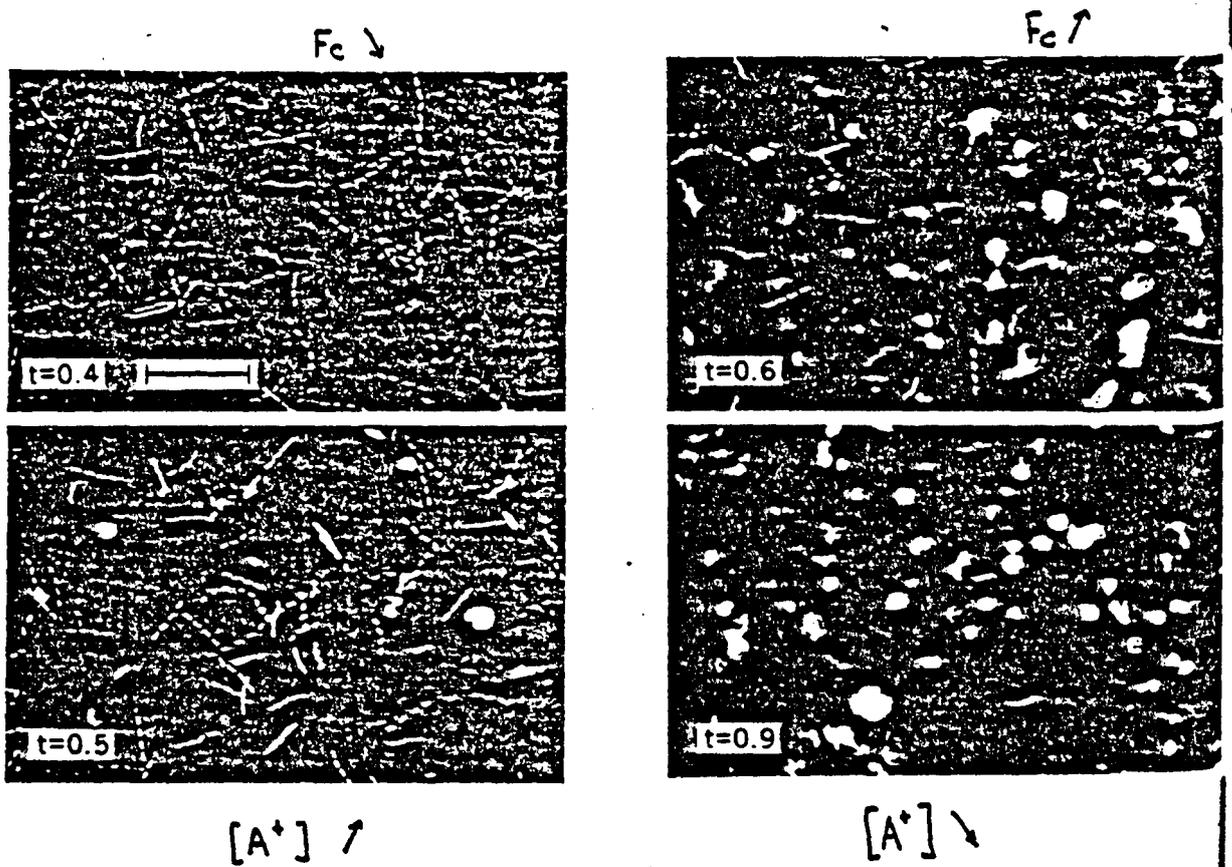


FIGURE N° 5 : REPRODUCTION DES CLICHES OBTENUS PAR
MACNAB ET KOSHLAND (86).

A : ATTRACTIF.

F_c : FREQUENCE DES CULBUTES.



qu'elles rencontreraient en nageant soit dans le sens d'un gradient, soit à contresens . En réglant correctement le temps de pose d'un appareil photographique et en disposant d'un éclairage stroboscopique, on obtiendra les clichés reproduits en FIGURE N° 5 .

Il est à signaler que de tels gradients temporels peuvent également être instaurés par voie enzymatique (35) .

Les expériences de SILVERMAN et SIMON (131) sont les plus "spectaculaires". Cultivés sur glucose, les E. coli ne synthétisent qu'un seul flagelle. A l'aide d'anticorps anti-flagelline les bactéries monoflagellées sont "piégées" par leur flagelle sur une lame de verre. Au microscope, on voit alors la bactérie tourner autour d'un point fixe constitué par le flagelle. C'est ainsi qu'il a été possible d'expliquer le mouvement d'une bactérie en fonction du sens de rotation du flagelle, en l'absence et en présence d'une substance attractive (131,83,137).

I.2 - MECANISME GLOBAL DU CHIMIOTACTISME

En l'absence de toute stimulation (c'est-à-dire en l'absence de substances attractives ou répulsives à moins que ce ne soit à concentration constante) une bactérie telle que Escherichia coli ou Salmonella typhimurium exécute une course

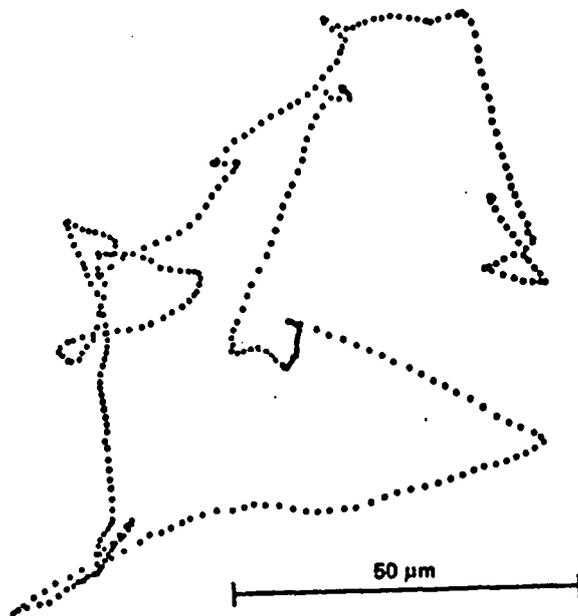


FIGURE N° 6 : TRAJECTOIRE DE E. COLI d'après BERG (23).

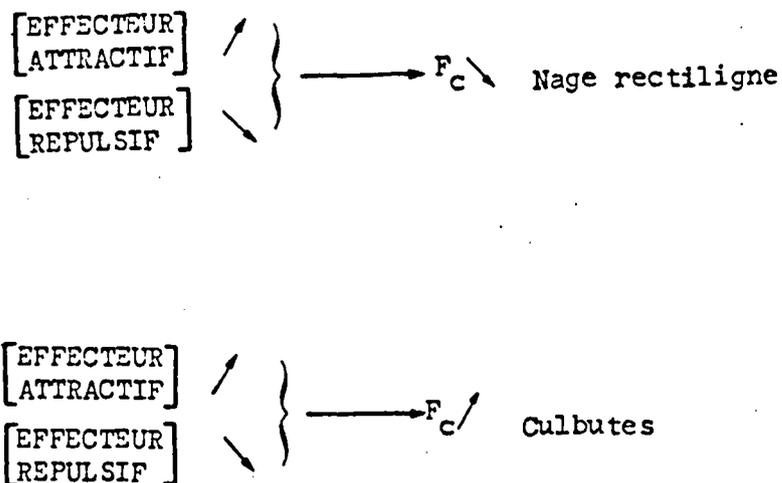


FIGURE N° 7 : EFFETS DES VARIATIONS DE CONCENTRATIONS
EN EFFECTEURS SUR LA FREQUENCE DES CULBUTES

aléatoire (FIGURE N° 6) : elle effectue de courts déplacements en ligne droite (pendant 1 s en moyenne) entrecoupés de brusques changements de direction qui durent 0,1 s (22).
Vraisemblablement, ces culbutes sont constituées en fait d'une succession de courses brèves et de volte-face (23).

Par contre, dès que la bactérie rencontre des concentrations croissantes en substances attractives, ses culbutes sont moins fréquentes (autrement dit les courses en ligne droite deviennent plus longues). Si les concentrations en attractif décroissent la fréquence des culbutes augmente (26 , 86).

En ce qui concerne les substances répulsives, l'inverse se produit : des bactéries soumises à un gradient positif de répulsif culbutent plus souvent, tandis qu'en présence d'une diminution de concentration la fréquence des culbutes baisse et tend même vers zéro (147).

La FIGURE N° 7 résume les effets des variations de concentration en substance chimique sur la fréquence des culbutes d'une bactérie .

Il est à signaler que la suppression des culbutes est consécutive à de plus faibles variations absolues de concentration que celles provoquant une augmentation de fréquence des culbutes (26 , 76).

Tout ceci s'applique non seulement à un gradient spatial (par exemple, concentration à droite supérieure à celle de gauche) mais aussi à un gradient temporel (concentration actuelle supérieure à celle régnant antérieurement). Grâce à leurs dispositifs MACNAB, KOSHLAND (86), BROWN et BERG (35) montrent que les réponses chimiotactiques sont transitoires : après quelques secondes les bactéries retrouvent leur comportement "normal".

Le fait qu'une bactérie se "souviene" de ce que la concentration antérieure était différente de celle à laquelle elle est soumise, laisse supposer l'existence d'une "mémoire bactérienne" (86, 87, 76).

L'hypothèse d'une comparaison entre les concentrations régnant aux pôles de la bactérie n'a pas été complètement écartée bien que la différence doit être trop faible pour être détectable (86 ; 76).

Quoi qu'il en soit, la caractéristique principale du chimiotactisme est cette régulation de la fréquence des culbutes (FIGURE N° 7). Le déplacement apparemment fortuit des bactéries est "orienté" : les trajets rectilignes sont prolongés lorsque la bactérie évolue vers un environnement favorable, raccourcis dans le cas contraire.

I.3 - PERCEPTION DES MODIFICATIONS DE L'ENVIRONNEMENT

L'effeteur

A priori, on peut admettre que dans leur milieu les bactéries reconnaissent les substances elles-mêmes ou des produits du métabolisme de ces substances tels le pyruvate ou l'ATP.

ADLER (2 , 4) a clairement établi que les bactéries reconnaissent les substances elles-mêmes :

(a) Des composés chimiques hautement métabolisables ne sont pas attractifs ;

(b) Des composés chimiques non métabolisables sont attractifs : les analogues non métabolisables de métabolites attractifs attirent les bactéries et des mutants incapables d'utiliser une substance attractive sont malgré tout attirés par cette dernière (2,10,11);

(c) Des composés attractifs sont actifs même en présence de substances métabolisables par ailleurs non attractives ;

(d) Des attractifs à structure voisine entrent en compétition les uns avec les autres mais non avec ceux de structure différente ;

(e) Des mutants présentant une déficience de la fonction chimiotactique mais un métabolisme normal ont été isolés ;

(f) Le transport de la substance n'est ni nécessaire ni suffisant pour qu'elle soit attractive (2,10, 67,112,113).

La bactérie, capable de détecter la substance elle-même, est donc équipée d'un système sensoriel qui mesure les changements de concentration et répercute l'information au(x) flagelle(s).

La réponse est transitoire⁽¹⁾, et c'est là un fait particulier pour les bactéries ; en effet, normalement à une augmentation de concentration en lactose, par exemple, correspond (dans une certaine mesure) une augmentation du transport, du métabolisme du lactose, du taux de synthèse de β -galactosidase.

Afin de mieux souligner cette caractéristique fonctionnelle, ADLER (4) a proposé d'appeler "système chimio sensoriel" ("Chemosensor" en anglais) le système responsable de la séquence sensorielle de la fonction chimiotactique réservant le terme "chimiorécepteur" ("Chemoreceptor" en anglais) au composant recevant ou se liant à la substance détectée. Ce sys

(1) A l'image de l'organisation du système nerveux des êtres supérieurs, les bactéries semblent dotées d'un "système phasique" (à adaptation rapide, responsable de la réponse transitoire) et "d'un système tonique" (à adaptation lente, responsable de la permanence de la réponse).

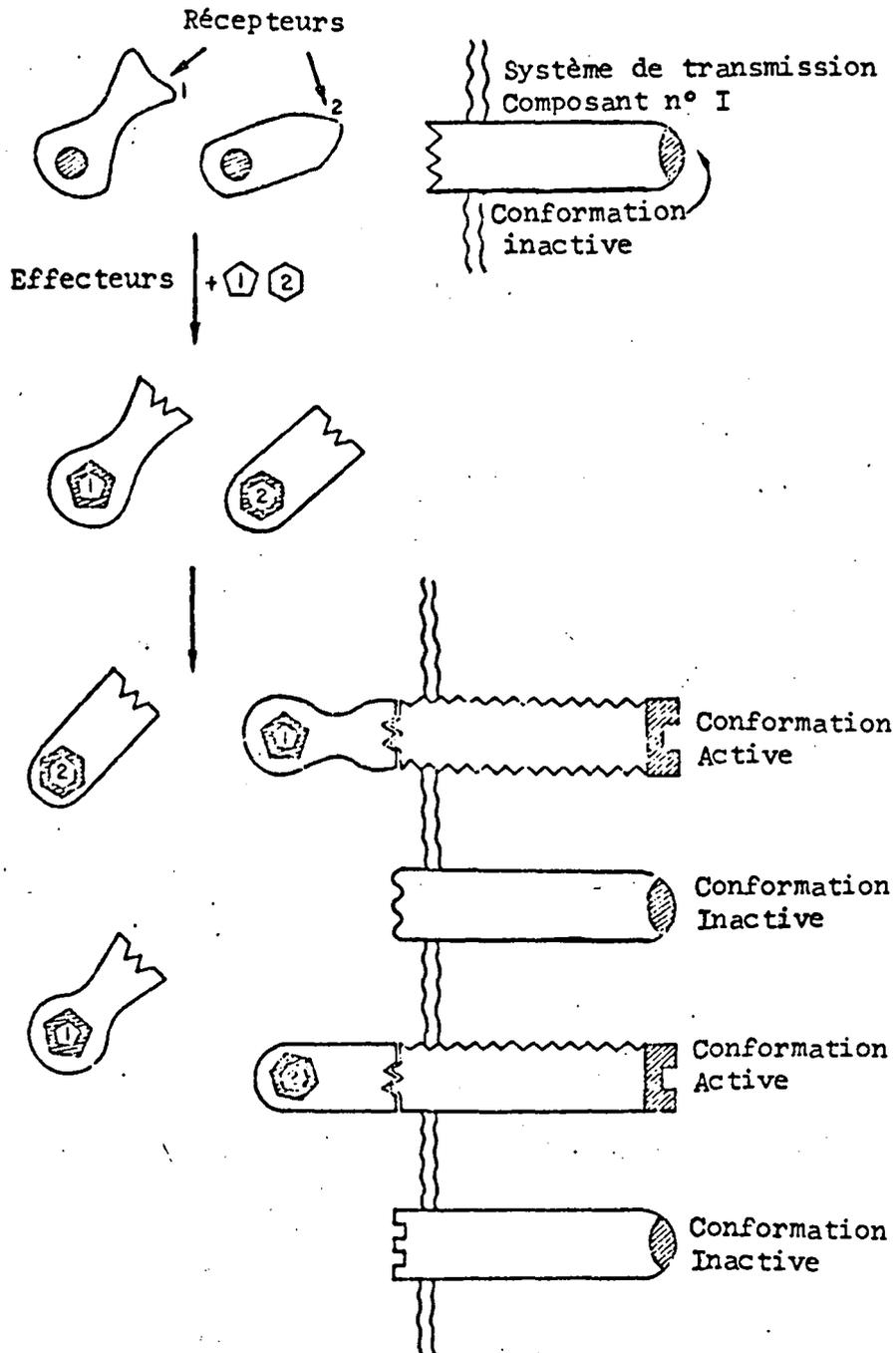


FIGURE N° 8 : SEQUENCE SENSORIELLE DU CHIMIO-TACTISME
d'après KOSHLAND (78).

me sensoriel comprend aussi un "transmetteur" ("signaller" en anglais) qui signale au(x) flagelle(s) tout changement intervenu au niveau du chimiorécepteur occupé par l'effecteur.

La FIGURE N° 8 due à KOSHLAND (78) illustre la séquence sensorielle de la fonction chimiotactique.

Le métabolisme du composé attractif ne participant pas à sa détection, le mécanisme de la réponse chimiotactique positive n'est pas fonction de la valeur nutritive de la substance pour la bactérie.

De même, le chimiotactisme négatif n'est pas lié à la nocivité du composé (148) :

- les effecteurs à activité répulsive sont décelés à des concentrations bien trop faibles pour être toxiques ;
- les composés toxiques ne sont pas obligatoirement répulsifs ;
- les substances répulsives ne sont pas obligatoirement toxiques (cas d'acides aminés hydrophobes pour E. coli)

Le fait que le métabolisme ou le transport de l'effecteur ne soit pas nécessaire au chimiotactisme signifie simplement que les bactéries possèdent deux fonctions distinctes. Il ne fait aucun doute que l'intérêt de la fonction chimiotactique doit être de faire évoluer la bactérie vers un environnement meilleur.

Les systèmes chimiosensoriels : nombre, spécificité et nature

- Nombre et Spécificité :

Les effecteurs chimiques ont été classés dans divers systèmes chimiosensoriels en fonction des critères suivants :

(a) Pour un certain nombre de systèmes sensoriels, des mutants, présentant une déficience dans la réponse chimiotactique correspondante, appelés mutants spécifiquement non-chimiotactiques, ont pu être isolés (2,8,148,6,66).

(b) Par des expériences de compétition menées entre deux effecteurs A et B : A est utilisé à une concentration suffisante pour saturer les récepteurs correspondants ; si la présence de A bloque la réponse chimiotactique à B, les deux substances A et B sont détectées par le même récepteur (2,148,9,147,11,92).

(c) La plupart des systèmes chimiosensoriels sont inductibles et chaque système l'est par l'effecteur qu'il est à même de détecter.

Le TABLEAU N ° I présente un recensement des divers systèmes chimiosensoriels présents avec certitude chez E. coli et Salmonella typhimurium.

Récepteurs Autres		Existence chez		Attractif
Effecteurs		<u>E.coli</u>	<u>S.typhi-</u>	(A)
		<u>murium</u>		(R)
N-Acetylglucosamine		X		A
D-Fructose		X		A
D-Galactose	D-Glucose, D-Fucose	X	X	A
D-Glucose		X		A
D-Mannose	D-Glucose	X		A
Maltose		X		A
Mannitol		X		A
Ribose		X	X	A
D-Sorbitol		X		A
Trihalose				A
Aspartate	Glutamate	X	X	A
Serine	Cystine, Alanine, Glycine	X	X	A
Acetate	Propionate, butyrate, valerate	X	X	R
Isopropanol	Ethanol, isobutanol	X		R
Leucine	Isoleucine, Valine	X	X	R
Indole	Skatole	X	X	R
Phenol		X		R
Benzoate	Salicylate	X		R
H ⁺ , OH ⁻		X	X	A, R
Mg ²⁺	Ca ²⁺ , Sr ²⁺ , Ni ²⁺	X	X	A
Citrate			X	A
O ₂		X	X	A
S ²⁻		X		R

TABEAU I : RECEPTEURS CHIMIOTACTIQUES CHEZ E. COLI ET S. TYPHIMURIUM D'APRES KOSHLAND (78)



- Nature :

Les composants protéiques de certains systèmes chimiosensoriels ont pu être identifiés. On pense généralement que chaque système possède une protéine qui reconnaît l'effecteur : il s'agit du chimiorécepteur ou composant de reconnaissance ou protéine de liaison ("Binding Protein" en anglais). Chaque fois que cette protéine a été identifiée on a constaté qu'elle participait également au transport de ce substrat-effecteur. Aussi a-t-on pu établir les types de relation existant entre la fonction transport et la fonction chimiotactique : FIGURE N° 9

Transport et chimiotactisme sont donc étroitement liés mais toutes les substances transportés, ou pour lesquelles existent des protéines de liaison, ne sont pas obligatoirement attractives ou répulsives (2,67,8,148).

La protéine de liaison du galactose, située dans l'espace périplasmique et libérable par choc osmotique, fut la première à être mise en cause dans le processus de chimioréception. De nombreuses preuves peuvent être avancées :

- Des mutants (Type I, FIGURE N° 9) ne présentant pas l'activité de liaison sont incapables à développer une réponse chimiotactique et à transporter le substrat correspondant (67, 30) ;

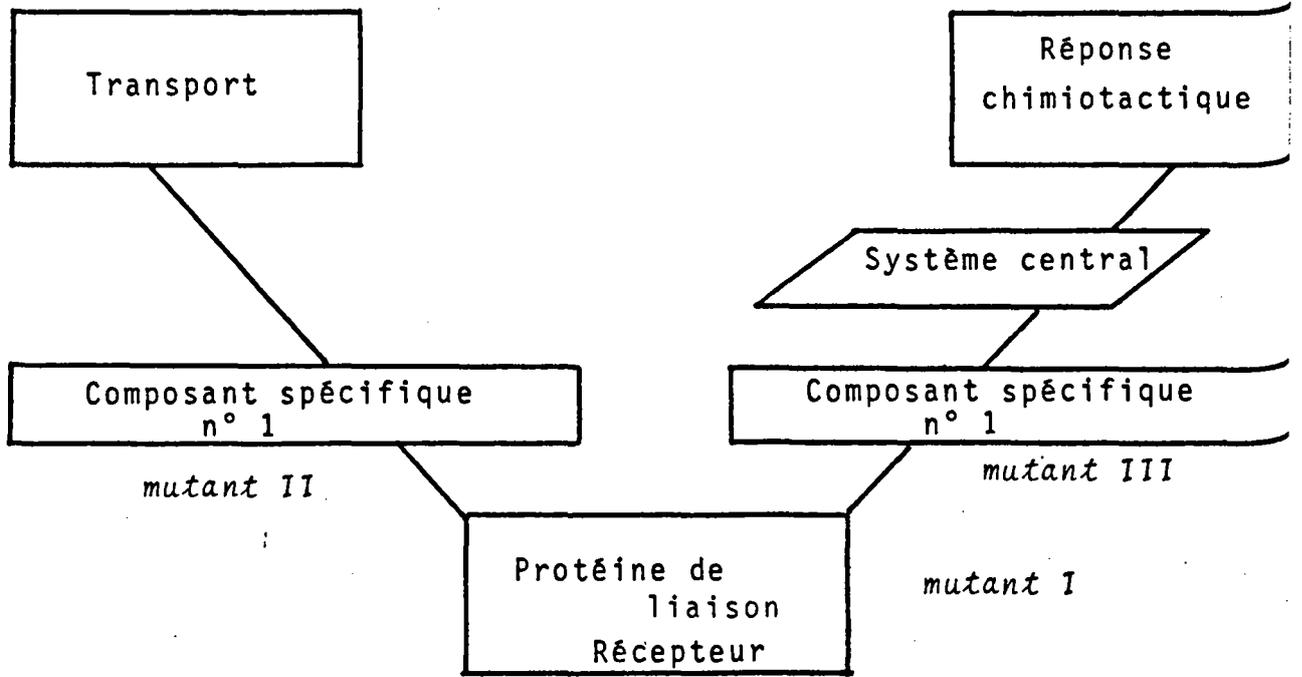


FIGURE N° 9 : TRANSPORT ET FONCTION CHIMIO-TACTIQUE SELON ADLER (4)

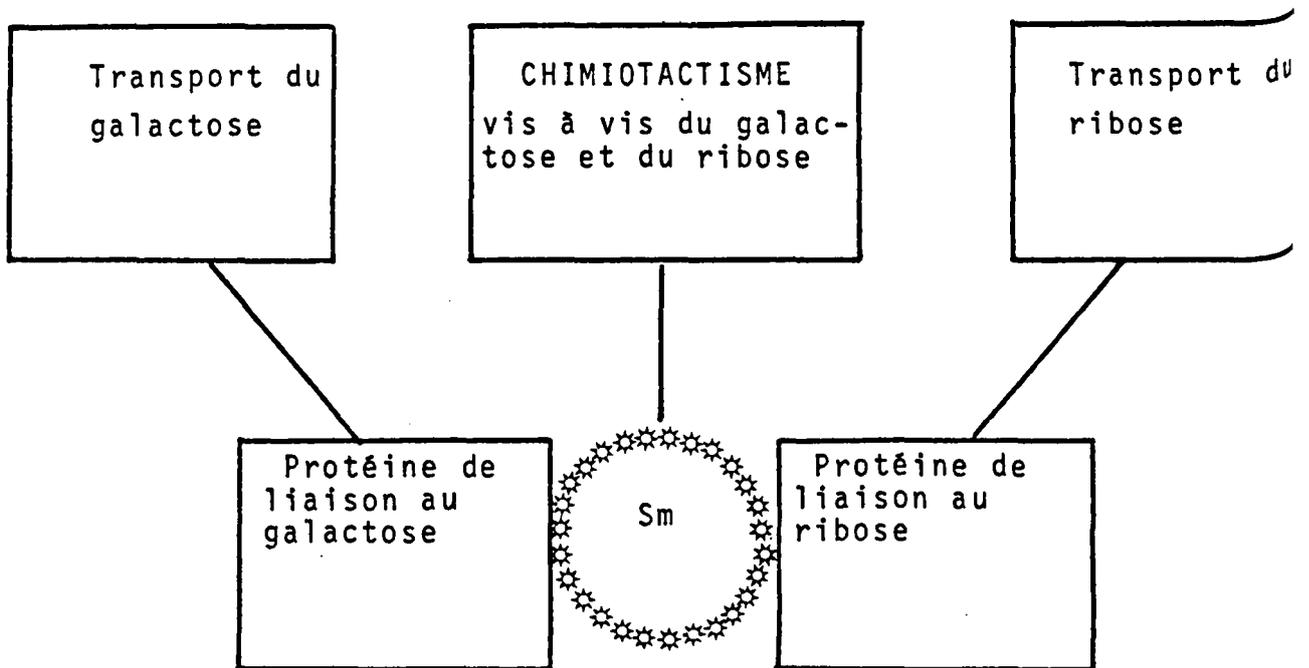


FIGURE N° 10 : TRANSPORT ET FONCTION CHIMIO-TACTIQUE SELON FRERE (58)



Sm : Système commun de transmission

- La réversion de la mutation affectant le gène de structure codant pour une protéine de liaison s'accompagne d'une récupération de la fonction chimiotactique. Parallèlement la liaison du galactose et son transport ont de nouveau lieu (31). ;

- L'aptitude de certains analogues de structure (le fucose) à bloquer la réponse chimiotactique envers le galactose est directement liée à leur affinité pour la protéine réceptrice (67) ;

- Les concentrations seuil et saturante (optimale) coïncident bien avec la valeur de la constante de dissociation du complexe protéine de liaison-ligand (93) ;

- Des chocs osmotiques réduisent l'intensité de la réponse au galactose alors que celle développée pour d'autres composés est peu affectée (93) ;

- Après addition de protéine de liaison à une suspension bactérienne ayant subi un choc osmotique la fonction chimiotactique est restaurée (67).

Le rôle dans le chimiotactisme de la protéine de liaison au maltose a été précisé par KELLERMAN, SZMELCMAN (74) et HAZELBAUER (66) et celui de la protéine de liaison au ribose par ADLER (2) chez Escherichia coli et par AKSAMIT et KOSHLAND (10,11) chez Samonella typhimurium.

Les protéines de liaison possèdent donc trois sites distincts : l'un pour la liaison au substrat, le second pour l'interaction avec le système de transport et le troisième pour l'interaction avec le système de transmission du chimiotactisme. La FIGURE N° 10 d'après FRERE (58) reprend le schéma proposé par ADLER (4) modifié en fonction des résultats des travaux de STRANGE et KOSHLAND (141). Ces auteurs ont montré récemment que les chimiorécepteurs pour le galactose et le ribose utilisent vraisemblablement un même système de transmission alors que les systèmes de transport sont spécifiques.

Les enzymes II du système phosphotransferase (79 ; 80) plus solidement liées à la membrane cytoplasmique peuvent également servir de récepteurs chimiotactiques (cas du glucose et du mannose chez E. coli (6)

On pourrait donc s'attendre à ce que tous les chimiorécepteurs soient impliqués dans des phénomènes de transport. Mais les ions Ca^{++} et Mg^{++} utilisent comme récepteurs le complexe ATPase membranaire (160).

I.4 - FONCTIONNEMENT DES FLAGELLES

La logique voudrait que l'on traite maintenant de la transmission de l'information vers les flagelles et du contrôle du fonctionnement flagellaire. Mais cette séquence du chimiotactisme étant mal connue il nous semble préférable de décrire le mouvement du flagelle pour mieux comprendre ensuite les différentes théories émises à propos de la transmission et du contrôle.

Structure des flagelles

Une information détaillée est donnée par SOKATCH (133). Les flagelles bactériens sont des filaments hélicoïdaux de 5 à 10 μm de long et de 25 nm de diamètre. Ils sont composés d'une protéine, la flagelline, dépourvue d'activité enzymatique connue. Ils ne semblent pas contenir de système enzymatique permettant la transformation de l'énergie chimique en énergie mécanique.

Pendant de nombreuses années, deux mécanismes étaient susceptibles d'engendrer le mouvement : soit une onde se propage le long du flagelle à l'image de ce qui se passe chez les Eucaryotes, soit les flagelles propulsent la bactérie en tournant sur eux-mêmes dans un mouvement de rotation semblable à celui d'une hélice rigide ou semi-rigide (25). SILVERMAN et SIMON (131) en piégeant des bactéries par leur flagelle ont

montré que seule la seconde hypothèse est correcte.

On ignore le mécanisme qui entraîne ce mouvement de rotation, mais les travaux de DE PAMPHILIS et ADLER (52 ; 53 ; 54) ont montré que les flagelles présentent au niveau de leur point d'insertion dans l'enveloppe cellulaire, une série d'anneaux : deux chez les bactéries à Gram positif et quatre chez les bactéries à Gram négatif (FIGURE N° 11). Chez E. coli, il est établi que l'anneau le plus externe est attaché à la membrane paroi externe et le plus interne à la membrane cytoplasmique (53). Le corpuscule basal assure l'encrage du flagelle dans les enveloppes cellulaires et le contact avec la couche externe de la paroi et le plus interne à l'intérieure. Seuls les deux anneaux les plus internes participeraient au mouvement, les deux autres, seulement présents chez les bactéries à Gram négatif, permettraient l'insertion du corps basal dans la couche externe de la paroi.

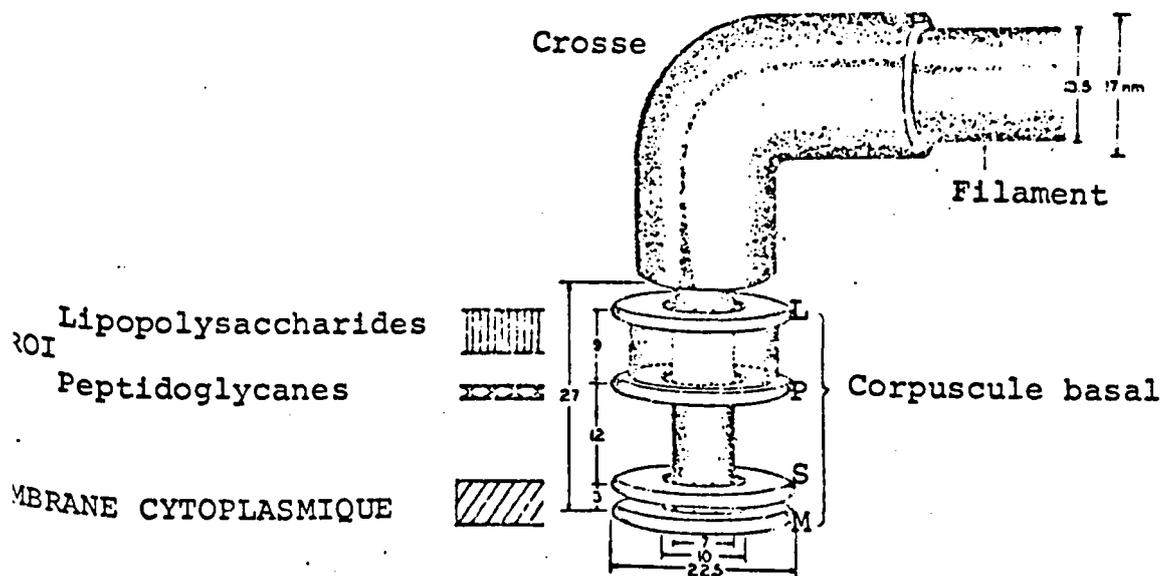


FIGURE N°11 : SCHEMA D'INSERTION DU FLAGELLE CHEZ LES BACTERIES GRAM(-)

d'après DE PAMPHILIS ET ADLER (53)

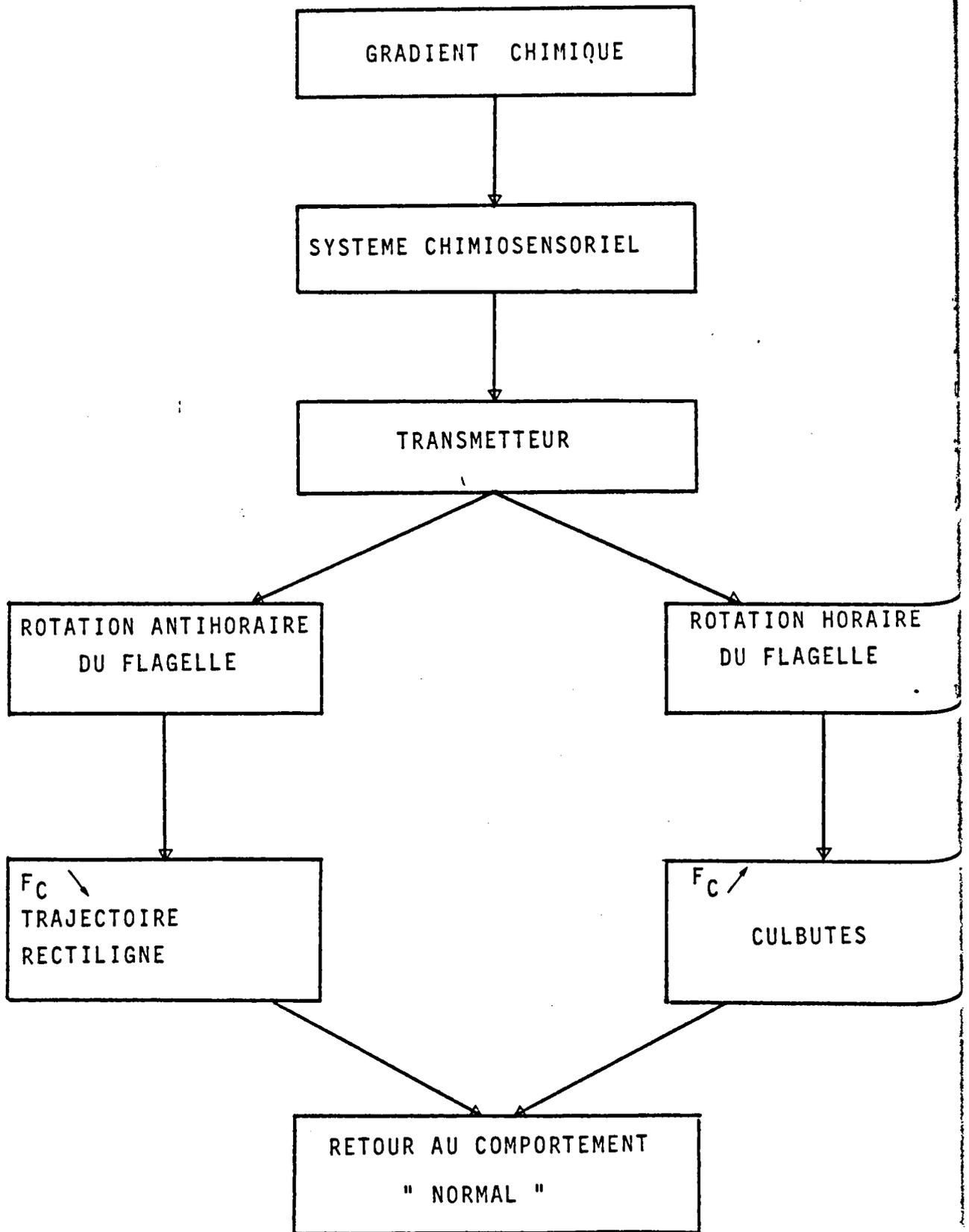


FIGURE N° 12 : SCHEMA DU FONCTIONNEMENT CHIMIOTACTIQUE
 F_c : fréquence des culbutes.

Culbutes et chimiotactisme

L'observation directe des bactéries montre que leur mouvement est constitué d'une course linéaire interrompue de culbutes.

Des bactéries monotriches (après croissance sur glucose) piégées par leur flagelle (131) tournoient dans le sens antihoraire, ce qui correspond au sens de rotation antihoraire du flagelle d'une bactérie libre s'éloignant d'un observateur (convention physique internationale). De temps en temps, une inversion du sens de rotation se produit, suivie d'un retour au sens antihoraire. A l'addition de substances attractives correspond un sens de rotation antihoraire pratiquement constant tandis que le sens horaire prédomine en présence d'un répulsif (83).

Par ailleurs, des mutants qui ne culbutent jamais présentent une rotation antihoraire alors que celle de mutants qui culbutent constamment est horaire (83).

Ces observations associées à celles démontrant que l'augmentation de la concentration en attractif favorise les trajectoires rectilignes en supprimant les culbutes, et que, à l'opposé, l'addition de répulsifs les provoque permet d'affirmer qu'au sens antihoraire de rotation du flagelle correspond une trajectoire en ligne droite et au sens horaire une culbute (26 ; 35 ; 86).

Chez les bactéries péritriches telles E. coli ou S. typhimurium, les flagelles tournoyant en sens antihoraire s'organisent en un faisceau qui propulse la bactérie : celle-ci se déplace alors en ligne droite. Une pirouette s'accompagne d'une désorganisation totale du faisceau, chaque flagelle "tirant de son côté" par rotation horaire (88).

Chez les bactéries monotriches ou à flagellation polaire (144), la rotation horaire du (ou des) flagelle(s) conduit plutôt à un mouvement de léger recul.

Dès que la pirouette ou le mouvement de recul a été réalisé, la bactérie nage à nouveau en ligne droite. Ceci suppose donc l'existence d'un système de contrôle de la fréquence des culbutes par conséquent du sens de rotation flagellaire (FIGURE N° 12).

I.5 - CONTROLE ET TRANSMISSION

Le contrôle

ASWAD et KOSHLAND (17) postulent l'existence d'une substance régulatrice dont la concentration contrôlerait le sens de rotation des flagelles : au-dessus d'un certain seuil

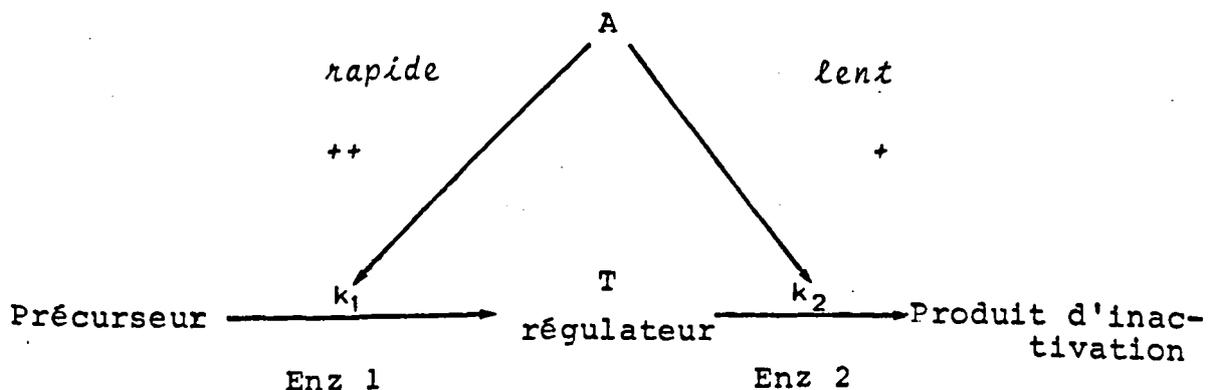
la rotation serait antihoraire. La chute de la concentration sous le seuil provoquerait la rotation horaire et la culbute. En temps normal la concentration en régulateur oscillerait autour du seuil expliquant par là l'alternance : trajectoire rectiligne / culbute / trajectoire rectiligne...

Chez les mutants à culbutes constantes, la concentration en régulateur serait toujours inférieure au seuil.

L'addition d'une substance attractive entraînerait une augmentation rapide de la concentration en régulateur, provoquant un blocage des culbutes pendant un certain temps, suivie d'un retour plus lent à l'état normal. Ce mécanisme - augmentation rapide suivie de relaxation - peut expliquer cette "mémoire" à court terme dont disposent les bactéries.

MACNAB, KOSHLAND (86) et SPRINGER et Coll.

(136) proposent le schéma explicatif suivant :



La valeur du rapport des constantes de vitesse $\frac{k_1}{k_2}$ détermine la concentration du régulateur T à l'état normal.

L'addition d'une substance attractive (A) active les enzymes des réactions 1 et 2 mais l'effet sur l'enzyme 1 est plus rapide tandis que l'effet sur l'enzyme 2 est plus lent. La concentration de T va donc s'accroître rapidement puis revenir plus lentement à l'état initial par l'intermédiaire de la réaction 2. (Ce phénomène d'hystérésis enzymatique a été décrit par ailleurs par FRIEDEN (59)).

En 1967, ADLER et DAHL (5) travaillant sur une souche d'E. coli auxotrophe vis-à-vis de la méthionine constatent que la privation en méthionine bloque la réponse chimiotactique vis-à-vis de toute substance attractive. Il ne peut s'agir d'une absence de synthèse protéique puisque la privation en un autre quelconque des amino-acides indispensables n'a aucun impact sur le chimiotactisme. De plus, la privation en méthionine provoque une baisse de la fréquence des culbutes chez les bactéries auxotrophes non stimulées.

ASWAD et KOSHLAND (16) démontrent chez S. typhimurium que le rôle de la méthionine est de maintenir à un certain taux le régulateur.

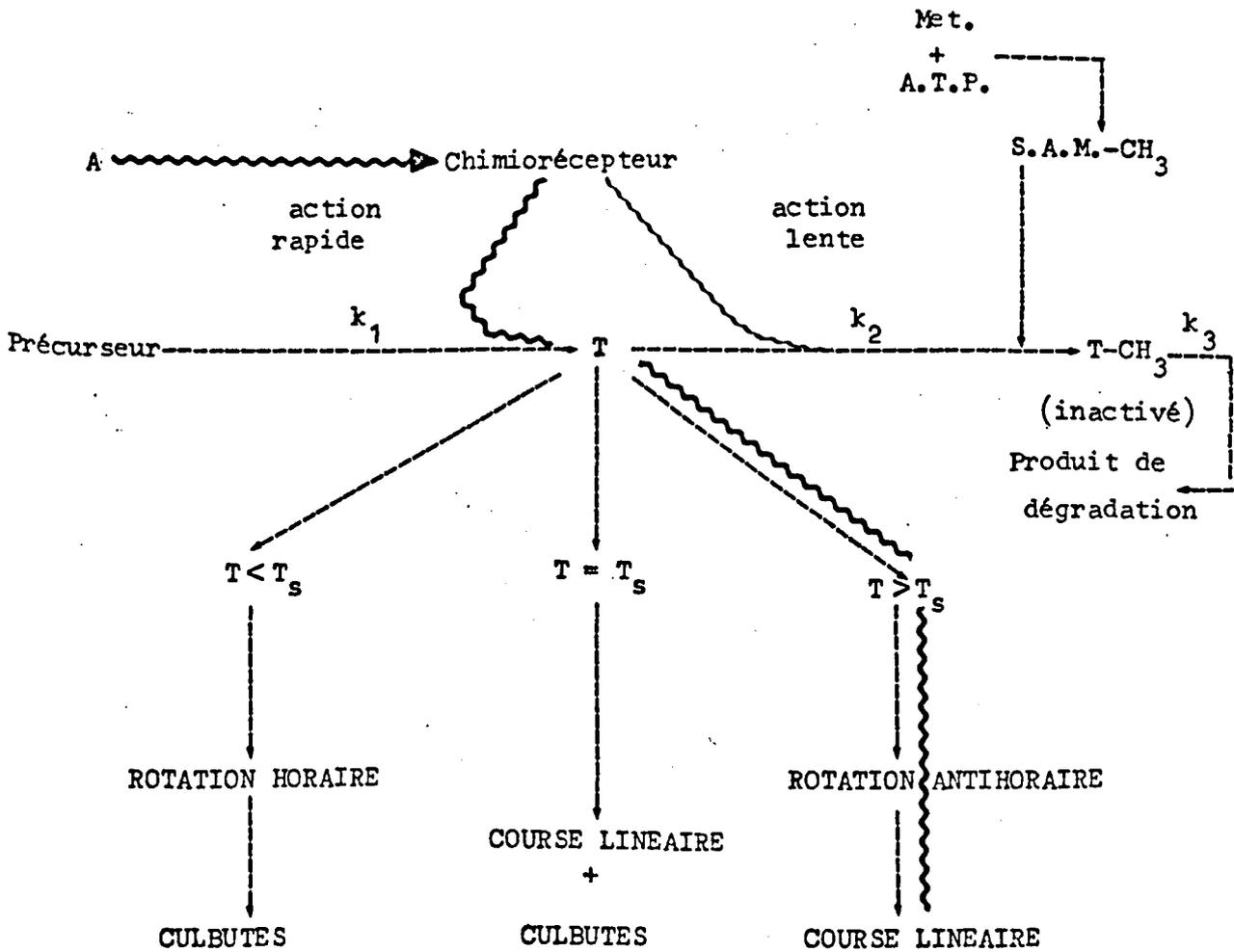


FIGURE N° : 13 SCHEMA DU MECANISME DE CONTROLE DU CHIMIOTACTISME (d'après FRERE (57)).

ARMSTRONG (13) sur E. coli et ASWAD et KOSHLAND (17) sur S. typhimurium établissent que la méthionine agit par l'intermédiaire de la S-Adenosyl-Méthionine (S.A.M.) qui serait indispensable à la dégradation du régulateur. Par ailleurs, KORT et ses collaborateurs (75) isolent une protéine membranaire dont la méthylation est fonction de l'état de stimulation de la bactérie, voire nulle chez des mutants non chimiotactiques. Cette protéine est-elle le régulateur ? FRERE (57) reprenant l'idée d'ASWAD et KOSHLAND suivant laquelle la méthylation intervient dans l'inactivation du régulateur propose que la protéine méthylée de KORT soit le produit d'inactivation de ce régulateur (FIGURE N° 13)

Des travaux récents de SPRINGER et Coll. (135) et de STOCK et KOSHLAND (138) suggèrent que méthylation-déméthylation ont un rôle clé dans le chimiotactisme, et à l'heure actuelle, il semble difficile d'aller plus avant dans l'élaboration d'un modèle définitif (FIGURE N° 13)

Transmission de l'information aux flagelles

Les diverses classes de mutants (outre les mutants dont le flagelle est absent ou non fonctionnel) incapables de répondre à une substance donnée, inaptes à élaborer toute réponse chimiotactique ont permis de dresser la carte

généétique de la région chromosomique responsable du chimio-tactisme (14,15,117,118,17,18,156,132)

Si, grâce à l'existence de ces mutants, on a pu déterminer qu'après la liaison effecteur-chimiorécepteur intervenait un premier composant, on ignore le mécanisme de transmission entre le complexe effecteur-chimiorécepteur, la concentration en régulateur, et le fonctionnement flagellaire. ADLER envisage trois possibilités :

1 - Des interactions de type protéine-protéine pourraient influencer sur la structure des enzymes contrôlant le taux de régulateur, mais alors seuls les chimiorécepteurs situés à la base des flagelles seraient efficaces ;

2 - La diffusion d'un messenger chimique de faible poids moléculaire assurerait la transmission à l'image de ce qui se passe entre neurones ou entre neurones et fibres musculaires. Cependant, ce type de diffusion semble trop lent pour expliquer la rapidité de certaines réponses.

3 - Une variation de polarisation membranaire comme dans les phénomènes de transmission de l'influx nerveux le long des axones des cellules nerveuses.

SZMELCMAN et ADLER (143) ont montré l'existence d'une phase d'hyperpolarisation membranaire de 15 secondes.

des environ contemporaine d'un flux ionique calcique et pour laquelle la méthionine est indispensable (7,110, 111,114,142)

De nombreux auteurs travaillent sur ces variations de polarisation et flux ionique, mais actuellement on ne peut toujours pas expliquer avec certitude ce qui se passe entre "les chimiorécepteurs, les gènes du système central et les flagelles qui constituent pour la bactérie les yeux et les oreilles, le cerveau, ses bras et ses jambes", selon une métaphore empruntée à KOSHLAND (78).

II - COMPORTEMENT CHIMIOTACTIQUE DE RHIZOBIUM

L'intervention du chimiotactisme dans la symbiose Rhizobium-légumineuse semble être une hypothèse raisonnable. Nous nous proposons de traiter de la symbiose et de la spécificité de l'association afin de mieux situer l'étape chimiotactique.

II.1 - GENERALITES SUR LA SYMBIOSE ET LA SPECIFICITE DE

L'ASSOCIATION RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE

La plupart des organismes vivants voient leur croissance limitée par manque d'azote. En effet, qui n'a pas observé que le rendement des récoltes est nettement amélioré par l'emploi d'engrais azotés ? Qui n'est au courant du déficit mondial en protéines ? Cela semble paradoxal quand on songe à la répartition et à l'importance quantitative de l'azote atmosphérique (80 % de l'air que l'on respire). Ceci vient de ce que plantes et animaux sont incapables de l'utiliser comme source d'azote. Seules quelques espèces bactériennes sont à même de rompre cette triple liaison, par ailleurs très stable, qui unit les deux atomes d'azote.

Parmi ces bactéries, Rhizobium, en association symbiotique avec les légumineuses matérialisée par la formation de nodules racinaires, fixe directement l'azote atmosphérique.

Le groupe des Légumineuses ne compte pas moins de 13 000 espèces très diverses (154) et les symbioses entre Rhizobium et Légumineuses sont responsables de près de la moitié de l'azote fixé annuellement par voie biologique (64). La complexité de ces associations rend nécessaire une étude du rôle de chacun des partenaires au cours des différentes étapes de la symbiose, l'infection spécifique, la formation de nodosités puis leur fonctionnement. Pour une information sur l'ensemble des problèmes soulevés par la symbiose, on pourra consulter les articles de synthèse dans les éditions de QUISPÉL (120), HARDY et SILVER (65), ainsi que ceux de BROUGHTON (34) de BRILL (33) et de DENARIE et TRUCHET (51).

Depuis très longtemps une spécificité d'hôte pour la formation de nodosités (infectivité) et la fixation de l'azote (efficacité) a été mise en évidence (19). Il existe de nombreuses preuves de la contribution de la bactérie (145, 50, 128) et de celle de la plante (100; 73; 68; 69) à la spécificité de la symbiose (99, 100, 102, 104, 105, 109, 98, 154). On a même découvert des Légumineuses résistantes à toute souche bactérienne (100; 103; 48) et des bactéries non infectieuses

Cette spécificité a conduit à la constitution de groupes d'inoculation croisée pour les Légumineuses et à la définition des espèces de Rhizobium correspondantes R. meliloti, R. trifolii, R. phaseoli, R. leguminosarum, R. japonicum, R. lupini et Rhizobium du groupe Vigna infectieux pour de nombreuses Légumineuses tropicale (154).

Des études systématiques fondées sur la taxonomie numérique (146) et l'hybridation de DNA (60) ont montré que les Rhizobium à croissance lente (R. japonicum, R. lupini et Rhizobium du groupe Vigna) constituent un groupe homogène. Chez les Rhizobium à croissance rapide les souches de R. leguminosarum et R. trifolii sont difficiles à distinguer par ces techniques, mais R. meliloti constitue un groupe à part. Il est à signaler qu'aucun critère biochimique ne permet la caractérisation avec certitude des espèces de Rhizobium. C'est là un fait remarquable en lui-même et un inconvénient expérimental de taille. Cette classification des Rhizobium sur un critère de spécificité (154) est généralement admise. Elle pourrait être remise en cause par la découverte récente d'un contrôle extrachromosomique de ce caractère par JOHNSTON et ses collaborateurs (72) qui ont réussi à rendre infectieuses des souches, qui ne le sont pas, par transfert de plasmides. (21).

Il est habituel de distinguer huit étapes conduisant à la formation de nodosités fonctionnelles :

- 1 - Prolifération des Rhizobium dans la rhizosphère ;
- 2 - Courbure des poils absorbants de la racine ;
- 3 - Formation et progression des cordons infectieux ;
- 4 - Différenciation des cellules corticales et situation du méristème nodulaire ;
- 5 - Libération de bactéries hors des cordons d'infection ;
- 6 - Multiplication des bactéries dans le cytoplasme des cellules hôtes ;
- 7 - Différenciation des bactéries en bactéroïdes ;
- 8 - Etablissement d'une nodosité capable de fixer et d'assimiler l'azote.

Le pourcentage de cordons infectieux conduisant à la formation de nodules est relativement faible : de 1,5 % à 32 % selon les associations symbiotiques (42, 43, 34, 104, 106, 108).

D'autre part, des mutants de R. meliloti sont incapables de se libérer des cordons d'infection pour être libérés dans le cytoplasme

du tissu nodulaire pourtant existant (50). Ces mécanismes doivent sans doute participer au contrôle de la spécificité.

Cependant, l'essentiel des travaux sur la spécificité porte sur les étapes antérieures à la formation du cordon infectieux et surtout sur la phase d'adhésion de la bactérie ou poil racinaire, par l'intermédiaire des lactines.

Des études microscopiques quantitatives ont montré qu'il existe une spécificité dans l'attachement du Rhizobium à la surface des poils absorbants (46). Plusieurs travaux suggèrent qu'une glycoprotéine de l'hôte, une lectine, jouerait un rôle dans cette liaison spécifique (29, 20, 45, 44, 47). L'essentiel de ces travaux consiste en un "marquage" à l'isothiocyanate de fluorescéine soit des lectines, soit des polysaccharides bactériens et porte sur l'inhibition par un haptène (le 2-desoxyglucose, le D-galactose, la N-acétyl-galactosamine) de l'agglutination bactérie-lectine.

L'existence de mutants de R. leguminarum dépourvus de matériel capsulaire et non virulents (127) semble indiquer que les exopolysaccharides jouent un rôle dans l'infection. Cependant, les lectines réagissent également avec les lipopolysaccharides des parois (157) et des mutants non virulents de R. japonicum, présentant une altération de leur paroi au niveau des lipopolysaccharides, ont été isolés (89).

Que les lectines puissent jouer un rôle dans la spécificité de l'association cela semble raisonnable, mais le débat n'est pas clos ; la lecture des comptes rendus, concernant les lectines, publiés dans "Cell Wall Biochemistry" édité par SOLHEIM et RAA (134), et surtout la lecture des "empoignades verbales" faisant suite à chaque communication sont riches d'enseignements.

En ce qui concerne le facteur déterminant la courbure des poils racinaires, la publication de YAO et VINCENT (159) fait le point sur ce sujet. Tout d'abord, pour ces auteurs, il est nécessaire de bien préciser ce que l'on entend par "courbure" des poils absorbants : trois degrés semblent exister, allant jusqu'à la réalisation d'un angle de 360° provoqué par la présence des cellules viables de Rhizobium virulents. Dans ce dernier cas, le facteur peut être retenu par dialyse. Les filtrats stériles de culture bactérien ne n'induisent qu'une légère courbure. Ces phénomènes semblent spécifiques car ils sont nettement moins marqués lorsque les facteurs inducteurs sont issus de souches ne correspondant pas au groupe de Légumineuses considéré.

Il semble bien, en fait, que la spécificité des interactions entre les Rhizobium et leurs plantes-hôtes intervient, à des degrés divers, au cours des différentes étapes de la formation de nodosités fonctionnelles. Ainsi, la toute première étape, celle de la colonisation de la rhizos-

phère par les Rhizobium, englobant la prolifération et les phénomènes de compétition entre les Rhizobium eux-mêmes et les autres microorganismes, est le support elle-aussi d'une certaine spécificité.

On entend par rhizosphère, le volume enveloppant les racines et pouvant s'étendre de 10 à 20 mm au-delà du système racinaire (123, 41). Dans cette zone, de nombreuses bactéries prolifèrent, parmi elles les Rhizobium (107, 124, 125) qui se multiplient mieux dans la rhizosphère de légumineuses (123). Cette accumulation est vraisemblablement due à la présence, dans les exsudats, de substrats et de vitamines (thiamine et biotine) souvent indispensables à la croissance de Rhizobium (62 ; 126 ; 125 ; 153 ; 154 ; 155). La nature même des substances stimulatrices n'est pas connue, la composition des exsudats varient en fonction des plantes, de leur âge et de leur état infecté ou non (121, 124, 125, 126, 152). Les exigences bactériennes variant également, on peut donc raisonnablement envisager que l'ensemble de ces phénomènes constitue pour la Légumineuse une façon de sélectionner ou présélectionner la souche de Rhizobium. C'est dans ce cadre que le chimiotactisme (attraction ou répulsion) peut être évoqué.

II.2 - COMPORTEMENT CHIMIOTACTIQUE DE RHIZOBIUM ET SYMBIOSE

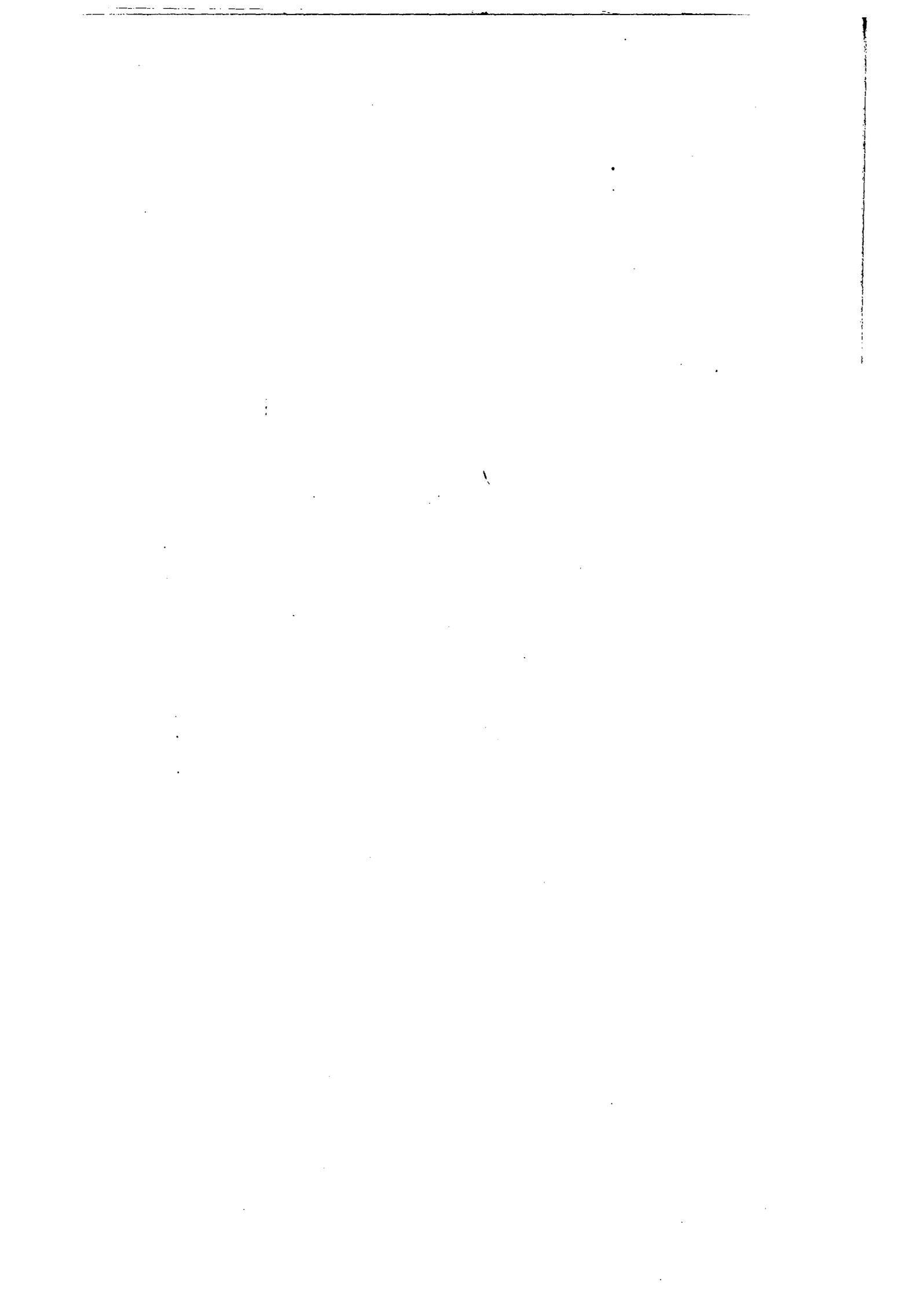
Le chimiotactisme n'a été envisagé comme phénomène susceptible de concourir à la spécificité de l'association Rhizobium-Légumineuse que récemment par CURRIER et STROBEL en 1976 (37). Il n'est d'ailleurs cité que dans un seul des derniers ouvrages généraux sur la symbiose (34).

Les travaux sur le chimiotactisme chez Rhizobium révèlent deux aspects : CURRIER et STROBEL (37 ; 38 39) et GITTE et ses collaborateurs (61) concentrent leurs activités sur la relation pouvant exister entre le comportement chimiotactique de Rhizobium vis-à-vis d'exsudats racinaires et la spécificité symbiotique. AMES et ses collaborateurs (12) et NAPOLI et ALBERSHEIM (96) étudient l'impact que peuvent avoir des mutations rendant les Rhizobium immobiles et non chimiotactiques sur l'infectivité du micro-symbiote. Pour ces auteurs, fonction chimiotactique et mobilité ne seraient pas liées à l'infectivité du Rhizobium et ne constituent qu'une des étapes peu spécifiques de la phase d'invasion et d'infection.

.....

MATERIEL ET METHODES

.....



I MATERIEL BACTERIEN ET VEGETAL

I.I. LA SOUCHE BACTERIENNE ETUDIEE

Toutes les expériences ont été faites sur Rhizobium meliloti souche Ve 26 reçue de OBATON, Station de Recherche de Microbiologie du sol (DIJON).

Cette souche a été choisie pour sa mobilité.

Son efficacité sur plantules aseptiques de luzerne, Medicago sativa, a été vérifiée.

Elle est conservée sur milieu solide de WRIGHT (158) en tubes inclinés, à 4°C. Par précaution, un repiquage est réalisé tous les six mois environ.

I.2. LA LEGUMINEUSE

Les graines de luzerne, Medicago sativa variété "Magali", proviennent des Etablissements de HODEBOURG de VERBOIS producteur grainier à Angers.

II MILIEUX ET TAMPON

II.I. MILIEU W. de WRIGHT (158)

Ce milieu gélosé coulé en tubes de 16 mm et solidifié en position inclinée est utilisé pour la conservation de la souche de Rhizobium meliloti Ve 26.

Sa composition est la suivante :

K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4, 7 H_2O$	0,2 g
NaCl.....	0,2 g
$CaSO_4, 2 H_2O$	0,1 g
$CaCO_3$	0,1 g
Mannitol	10 g
Extrait de levure fraîche	100 ml
Eau distillée QSP	1000 ml

Le pH est ajusté à 7 avant l'addition d'Agar Difco à raison de 15 g par litre.

L'extrait de levure fraîche se prépare ainsi :

100 g de levure de boulangerie sont mis en suspension dans 1 litre d'eau distillée. Cette préparation est autoclavée pendant 20 mn à 120°C, puis filtrée à chaud sur papier filtre jusqu'à colmatage de ce dernier. Le filtrat, autoclavé à nouveau pendant 20 mn à 120°C, constitue l'extrait de levure fraîche.

II.2. MILIEU TY (Tryptone Yeast (27)

La composition de ce milieu est ainsi définie :

Bacto-tryptone Difco	5 g
Extrait de levure Difco ..	3 g
$CaCl_2, 6 H_2O$	1,3 g
Eau distillée QSP	1000 ml

Le pH est ajusté à 7,2 avant autoclavage (120°C, 20 mn)

- Le milieu TY liquide permet de "relancer" et de cultiver la souche de Rhizobium meliloti. Une conservation de la souche dans un tel milieu est possible pendant trois semaines à 4°C.

Les dilutions nécessaires aux dénombrements des bactéries ayant pénétré dans un capillaire sont réalisées également dans ce milieu TY liquide.

- Ce milieu TY gélifié à 3%/o avec de l'agar Difco est utilisé pour la mise en évidence de la mobilité de la souche bactérienne.

- Gélosé à 12°/‰ avec de l'agar Difco, ce milieu sert au dénombrement des colonies bactériennes qui permettra le calcul du nombre de bactéries ayant pénétré dans un capillaire.

II.3. MILIEU RC (Rhizobium complet de LAIRD (81),
modifié par DELATTRE (49)

Composition :

K ₂ H PO ₄	1 g
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O.....	0,2 g
Extrait de levure Difco	1 g
Eau distillée QSP	1000 ml

Le pH est ajusté à 7,2 avant stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Ce milieu riche de culture de Rhizobium est utilisé ici gélosé à 3°/‰ pour la mise en évidence de la mobilité de la souche étudiée.

II.4. MILIEU R H B₁ (49)

Composition :

K ₂ H PO ₄	0,5 g
NH ₄ NO ₃	0,2 g
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O.....	0,2 g
Eau distillée QSP	1000 ml

Après stérilisation par autoclavage à 120°C durant 20 mn on ajoute stérilement les vitamines (Thiamine et Biotine) et une source de carbone (glucose ou fructose) de façon à ce que les concentrations soient respectivement de $5 \cdot 10^{-4}$ g/l, 10^{-5} g/l, et 10 g/l.

Ce milieu synthétique liquide permet la culture de Rhizobium ; des expériences de mise en évidence de la mobilité bactérienne ont été réalisées sur ce milieu gélosé à 3°/‰.

II.5. MILIEU M₉A (149)

KH ₂ PO ₄	3 g
Na H PO ₄ , 12 H ₂ O	5,8 g
NH ₄ Cl.....	1 g
Mg SO ₄	0,12 g
Eau distillée QSP	1000 ml

Le pH est ajusté à 7,2.

La stérilisation est réalisée par autoclavage à 120°C pendant 20 mn.

Avant l'utilisation de ce milieu, il est nécessaire d'auter stérilement de la biotine et une source de carbone (ici le fructose) à raison de $3 \cdot 10^{-3}$ g/l et 2 g/l.

Ce milieu nous sert spécifiquement à la culture de Rhizomeliloti Ve 26 en vue de la mise en évidence et de l'étude du chimiotactisme en milieu liquide.

II.6. MILIEU N.T.DE NICOL et THORNTON (97)

La culture des plantules de luzerne se déroule sur le milieu de NICOL et THORNTON (97) de composition suivante :

K ₂ H PO ₄	0,5 g
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O....	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 QSP	1000 ml

Le pH est ajusté à 7 avant stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 mn.

II.7. TAMPON C.W. (Chem'Wash (3))

Il s'agit d'un tampon phosphate 10^{-2} M de pH 7, additionné d'EDTA (acide éthylène-diamine tétraacétique) à la concentration de 10^{-4} M.

Le rôle de l'EDTA est d'éliminer toute trace de métaux lourds pouvant persister dans l'eau bidistillée.

Le tampon C.W. est utilisé d'une part à la réalisation de la suspension bactérienne et d'autre part à celle des solutions de substances à étudier dans les expériences de chimiotactisme en capillaire.

Gélosé à 3‰ et fructosé à 2‰, ce tampon sert de milieu de mise en évidence d'une réponse chimiotactique de Rhizobium meliloti vis à vis de disques de C.W. gélosés à 6‰ contenant une substance attractive.

III COLORANTS ET AUTRES SOLUTIONS

III.1. COLORANT DES FLAGELLES POUR PREPARATIONS OBSERVABLES EN MICROSCOPIE OPTIQUE (90)

Le colorant doit être préparé extemporainement de la façon suivante :

5 ml d'une solution saturée de $KAl(SO_4)_2$
 2 ml d'une solution saturée d'acide tannique
 2 ml d'une solution saturée de chlorure mercurique.
 0,8 ml d'une solution saturée de fuschine basique
 alcoolique filtrée sur filtre Millipore 0,22 um.

III.2. SOLUTIONS UTILISEES POUR LES OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (70)

Nous avons utilisé pour les préparations à observer en microscopie électronique les solutions suivantes :

KCl 0,1 M

Acétate d'uranyle à 3‰, de pH 7

Phosphotungstate de potassium à 0,5‰ et 0,2‰ de pH 7

III.3. DESINFECTANT POUR GRAINES DE LUZERNE

Nous avons retenu, pour son efficacité, le chlorure mercurique à 2,5 ‰. comme solution de désinfection des graines

IV TECHNIQUES D'OBSERVATION DE LA CILIATURE

IV.1. EN MICROSCOPIE OPTIQUE

Nous avons adopté la technique de MAYFIELD et coll. (90) sans autre précaution que celle de réaliser de nombreux exem-

plaires de la préparation.

Une goutte de culture bactérienne est déposée sur une lame et recouverte d'une lamelle. Deux gouttes de colorant déposées le long de la lamelle diffusent et se mélangent à la suspension. La préparation est observée au microscope à contraste de phase.

IV.2. EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

La technique de "coloration négative" suivie est celle de HUXLEY et ZUBAY (70). Sur une grille porte-objet membrannée au parlodion à 1°/ dans l'acétate d'isoamyle on dépose successivement une goutte de KCl 0,1 M et une goutte de suspension bactérienne. L'excès de liquide est éliminé à l'aide d'un papier filtre. La "coloration négative" est obtenue par addition d'une goutte d'acétate d'uranyle ou de phosphotungstate. Après un temps de contact s'étageant de quelques secondes à cinq minutes, on essore la grille sur un papier filtre et l'on examine la préparation après dessiccation complète.

V TECHNIQUES D'OBSERVATION DU DEPLACEMENT BACTERIEN

Pour une simple vérification de la mobilité de la souche, la préparation classique d'une goutte de suspension bactérienne entre lame et lamelle suffit.

L'observation des séquences du mouvement d'une bactérie dans ces conditions est mal aisée : de nombreuses bactéries adhèrent par leurs flagelles soit à la lame soit à la lamelle ; l'espace entre lame et lamelle étant restreint, les bactéries

ne peuvent évoluer librement. Par contre, dans une goutte de suspension bactérienne déposée sur une lame non dégraissée, les bactéries se déplacent sans contrainte et leur mouvement est plus facilement observable. Il est préférable de faire cette observation avec l'objectif moyen (40) d'un microscope muni d'une bague multiplicatrice (x 2,5) plutôt que d'utiliser l'objectif 100. En effet, la profondeur de champ reste suffisante pour que l'objectif ne touche pas la goutte (communication personnelle (SZMELCMAN)).

VI TECHNIQUES D'ETUDE DU CHIMIOTACTISME

Les deux techniques utilisées dérivent de celles décrites par ADLER (148, 1, 3). Que ce soit en boîtes de Pétri ou en capillaire, la préparation de la souche de Rhizobium meliloti Ve 26 est analogue.

VI.I. PREPARATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE

La souche de Rhizobium meliloti Ve 26 conservée à 4°C sur gélose inclinée de WRIGHT (158) est mise en culture dans le milieu riche TY liquide. Après une incubation de six heures à 30°C sur table d'agitation, la suspension présente une densité optique de 0,4 à 0,5 à la longueur d'onde de 600 nm (à une densité optique de 1 correspond environ 10^9 Rhizobium par millilitre).

Cette culture peut être conservée trois semaines à 4°C sans problème de souillure ni de perte de mobilité. Elle constitue une réserve que nous utilisons au fur et à mesure des besoins.

Pour chaque expérience, à partir de ce stock, nous réalisons une culture sur milieu minimum M₉A fructosé à 0,2 %. Un inoculum de départ assez important permet de passer de la densité optique 0,05 - 0,06 à 0,2 - 0,3 en 5 à 6 heures de culture à 30°C sous agitation.

Cette suspension est ensuite centrifugée à 3000 g pendant 15 minutes à température ordinaire. Le surnageant est éliminé stérilement. Nous laissons le culot se remettre seul en suspension avant de procéder à la dilution nécessaire dans le tampon C.W.

VI.2. TECHNIQUE EN BOITE DE PETRI (148)

Un inoculum de 0,02 ml de la suspension bactérienne obtenue précédemment (densité optique théorique à 600 nm évaluée à 6) est déposé au centre d'une boîte de Pétri remplie de 20 ml de C.W. gélosé à 3‰ et fructosé à 2‰. L'incubation à 30°C doit durer 10 à 12 heures afin de bien visualiser le halo de migration témoin de la mobilité de la souche

L'étude du chimiotactisme peut être réalisée de deux façons :

- soit un disque de même composition (C.W. fructosé) mais gélosé à 6‰ et contenant la substance à tester est déposé à quelques millimètres du halo de migration. Après une incubation d'une dizaine d'heures à 30°C nous apprécions la déformation du halo vers le disque contenant l'attractif

- soit, avant de procéder à l'inoculation, on inclut de façon homogène dans le milieu gélosé la substance à étudier à une concentration donnée. Après incubation à 30°C, pendant une vingtaine d'heures, autour d'un premier halot de migration apparaît un anneau témoignant d'une réponse chimiotactique.

Dans le premier cas, le gradient est créé par diffusion de la substance à partir du disque-source, tandis que le deuxième cas se produit lorsque la substance est à la fois attractive et métabolisable : en effet, la population bactérienne en métabolisant la substance, uniformément répartie au départ, crée un gradient : la concentration au large du point d'inoculation est de ce fait supérieure et les bactéries se dirigent vers elle.

Cette technique en milieu semi-solide permet une première appréciation du domaine de concentration optimal.

VI.3. TECHNIQUE EN CAPILLAIRE (3) FIGURE N° : 14

Nous rappelons brièvement le principe de cette méthode décrite en première partie : des bactéries en suspension dans un réservoir migrent, sous l'effet du chimiotactisme, dans un capillaire contenant une substance attractive (cas du chimiotactisme positif). Le gradient s'instaure ici par diffusion de la substance hors du capillaire.

Les réservoirs sont en fait constitués de pipettes de 10 µl courbées en U dont les branches font environ 2,5 cm et l'écartement 1 cm. Posés à plat et recouverts d'une lamelle

ces dispositifs ont une capacité de 0,2 à 0,3 ml.

Disposés sur une platine chauffante dont la température est réglée à 30°C (\pm 1°C) ces réservoirs sont remplis de la suspension bactérienne dont la densité optique à 600 nm doit être comprise entre 0,05 et 0,1 (se référer à l'étude des conditions pour une réponse chimiotactique optimale).

Des micropipettes de 1 μ l, scellées à une extrémité et passées plusieurs fois à la flamme, sont plongées dans une solution de la substance à tester: en se refroidissant, ces capillaires se remplissent ; ils sont ensuite glissés un à un dans chacun des réservoirs. Des capillaires témoins ne contenant que le tampon C.W. ⁽¹⁾ sont préparés pour chaque expérience.

Ces dispositifs sont recouverts d'un couvercle de boîte de Pétri pour éviter tout choc thermique et laissés ainsi une heure. Cette durée a été déterminée expérimentalement (se référer à l'étude des conditions pour une réponse chimiotactique optimale).

Les capillaires sont alors prélevés et rincés extérieurement par plusieurs jets d'eau distillée stérile. Leur contenu est dilué dans un TY maintenu à 4°C et le dénombrement bactérien se fait en plaque de TY gélosé à 12%₀₀. La lecture est effectuée après 48 heures d'incubation à 30°C.

Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries ayant migré dans un capillaire en une heure. Chacune des valeurs présentées dans ce travail est la moyenne de 4 mesures.

(1) pour l'étude d'exsudats racinaires, le tampon C.W. a été remplacé par le milieu de NICOL et THORNTON filtré.

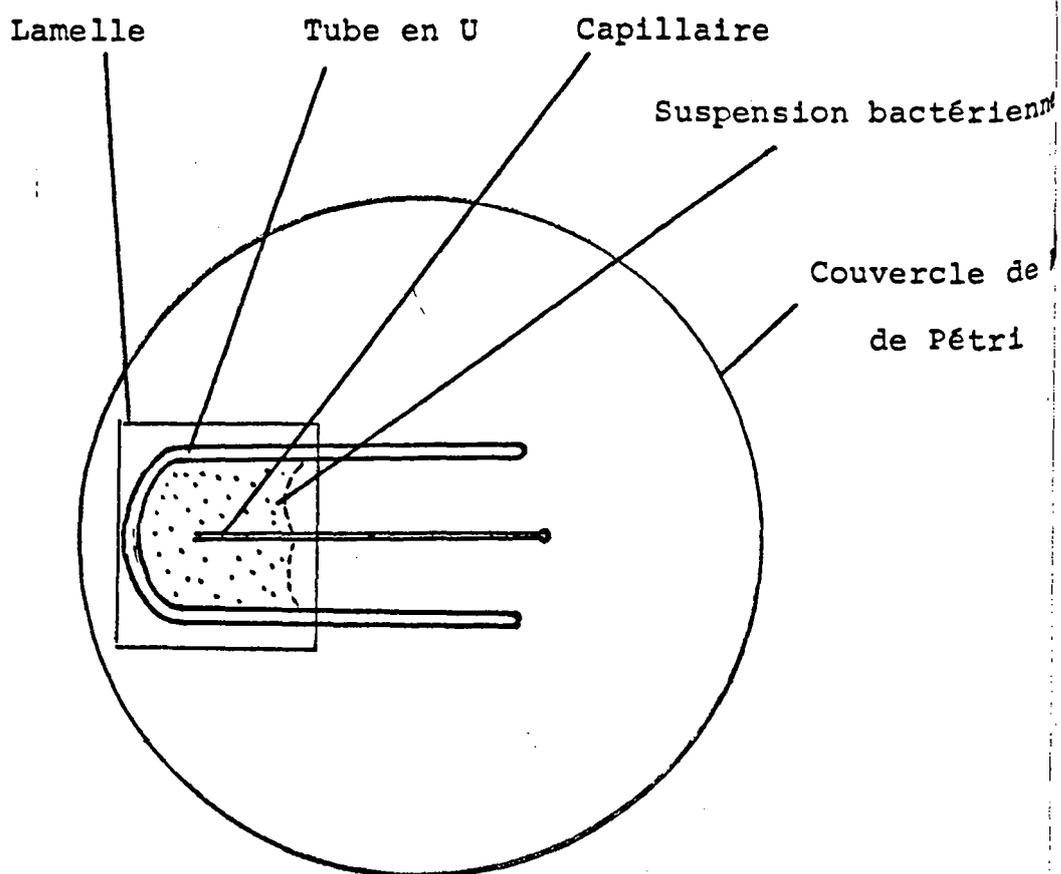


FIGURE N° : 14 Schéma du dispositif utilisé pour la mise en évidence du chimiotactisme par le technique en capillaire (3).

N_0 est le nombre moyen de bactéries ayant pénétré dans un capillaire témoin (du fait de leur seule mobilité),

N est le nombre moyen de bactéries présentes dans le capillaire contenant la substance à tester,

La différence $N - N_0$ représente le nombre de bactéries ayant été attirées en une heure par une concentration donnée d'effecteur.

Le rapport $R = \frac{N}{N_0}$ est une estimation de l'activité chimiotactique d'un effecteur à une concentration donnée.

VII PREPARATION D'EXSUDATS RACINAIRES

Nous appelons exsudats, le milieu de culture dans lequel se sont développées des plantules de luzerne pendant un temps déterminé.

Dix millilitres de milieu de culture de NICOL et THORNTON (97) dans lesquels ont séjourné aseptiquement 10 plantules de luzerne sont qualifiés arbitrairement d'exsudats "pauvres" E_{10} par opposition aux exsudats dits "riches" E_{250} constitués de 5 ml de milieu de culture dans lesquels ont séjourné aseptiquement 200 à 300 plantules de luzerne.

VII.1. DESINFECTION DES GRAINES

Les graines de luzerne (*Medicago sativa*) sont immergées cinq minutes dans une solution de chlorure mercurique (2,5‰).

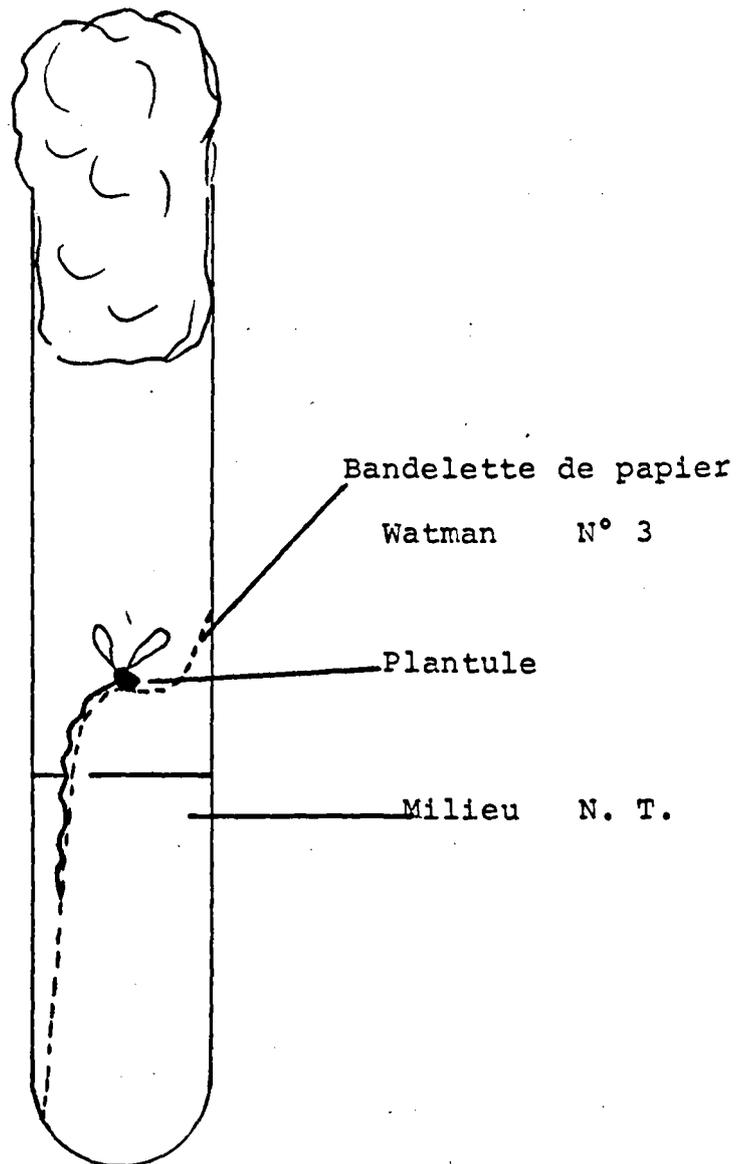


FIGURE N° : 15 DISPOSITIF UTILISE POUR LA CULTURE
DES LUZERNES IN VITRO ET POUR
L'OBTENTION DES EXSUDATS E₁₀.

Il est nécessaire de rincer une dizaine de fois les graines à l'eau stérile. Cette opération doit être scrupuleusement respectée, car toute trace de mercure nuit aux expériences de chimiotactisme menées ultérieurement avec les exsudats des plantules.

VII.2. PREPARATION DES EXSUDATS "PAUVRES" E_{10}

Après désinfection et rinçage, les graines sont transférées aseptiquement sur un milieu TY gélosé à 12‰ coulé en boîte de Pétri (vingt graines par boîte). La germination se déroule à l'obscurité et à température ambiante.

Les graines germées, choisies pour leur asepsie et leur état physiologique, sont transplantées sur le repli d'une bandelette de papier Whatman n° 3 trempant dans 10 ml de milieu de culture NT. (FIGURE N° 15). Les plantules sont mises à cultiver en serre (photopériode de 16 heures, températures réglées à 25°C le jour, 18°C la nuit).

Les exsudats E_{10} élaborés pendant une période déterminée, sont obtenus ainsi : un rinçage des plantules en tube par dix fois 10 ml d'eau distillée stérile est suivi d'une addition de 10 ml de milieu NT ; les plantules sont à nouveau placées en serre. La période choisie écoulée, le milieu de culture est récupéré et passé sur filtre "Millipore" de porosité 0,22 μ m. Ce filtrat constitue les exsudats E_{10} qui sont conservés à -20°C.

VII.3. PREPARATION DES EXSUDATS RICHES E₂₅₀

Deux cents à trois cents graines dans une boîte de Pétri sont d'abord désinfectées puis correctement rincées. Un rinçage supplémentaire par 10 ml de milieu NT est ensuite effectué. Après un contact de 15 mn, le milieu est aspiré à l'aide d'une pipette Pasteur stérile branchée sur une pompe à vide. L'humidité résiduelle permet la germination des graines. La croissance des plantules se déroule normalement jusqu'au 10^{ème} jour ; au-delà, les plantules se gênent, soulèvent le couvercle de boîte et la stérilité n'est plus effective.

La méthode d'obtention des exsudats riches E₂₅₀ élaborés pendant une période donnée est analogue à celle décrite pour les exsudats E₂₅₀ : des lavages à l'eau distillée stérile sont suivis d'un dernier rinçage avec le milieu N T. L'excès de milieu est aspiré afin de ne conserver qu'un film de liquide. Les plantules sont placées en serre et au moment choisi, 5 ml de N T sont ajoutés. Après un contact d'une heure environ le milieu est récupéré et passé sur filtre "Millipore" 0,22 µm le filtrat représente les exsudats E₂₅₀ d'une période déterminée.

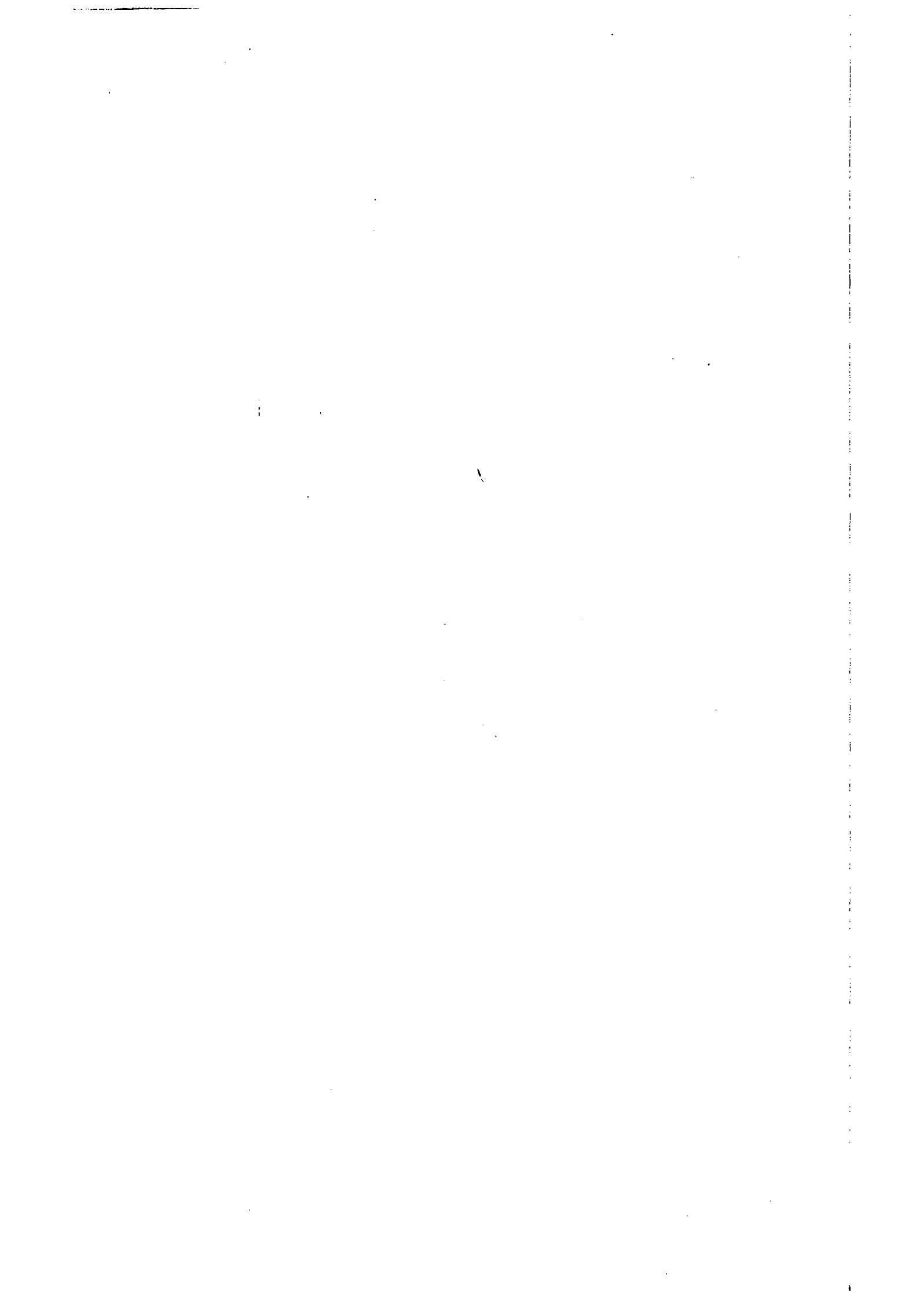
VIII DOSAGE DES ACIDES AMINES

Le dosage des acides aminés a été effectué sur un analyseur Beckmann Multichrom 4255.

.....

RESULTATS

.....



I - ETUDE DE LA MOBILITE DE RHIZOBIUM MELILOTI VE 26

La réponse chimiotactique de toute bactérie étant fonction de sa mobilité, une étude préalable de celle-ci s'impose. En effet, nous avons prévu de travailler sur la souche Rhizobium meliloti 2011Str₃ mutant streptomycine-résistant isolé par J. DENARIE à partir de la souche SU 47 de P.S. NUTMAN, mais il s'est avéré que le nombre de cellules mobiles par plage observée au microscope à contraste de phase était pratiquement nul; à l'opposé, les autres souches sauvages de la collection ne présentent pas cette déficience. Notre choix s'est donc fixé sur la souche Ve 26 qui, dans les conditions habituelles de culture et de conservation, présente un très grand pourcentage de cellules mobiles.

Avant l'étude des conditions de mobilité, nous donnons un aperçu du support morphologique de cette fonction : les cils.

I.I. CILIATURE DE RHIZOBIUM MELILOTI Ve 26*Observation en microscopie à contraste de phase*

Les diverses techniques de coloration se révèlent très drastiques pour les flagelles de Rhizobium. Dans le domaine de concentration en colorant optimal pour la visualisation des flagelles, la plupart des préparations présentent deux zones : l'une occupée par les corps bactériens, l'autre par les flagelles entraînés par le courant de la solution colorante. Entre les deux, il est possible de voir les corps bactériens flagellés.

La ciliature de Rhizobium meliloti Ve 26 est de type péritriche : le dénombrement des flagelles n'a pas été possible.

PLANCHE I : CILIATURE DE R.Meliloti Ve 26

Photographie a : X 56000

b : X 166500

c : X 177000

La flèche souligne l'emplacement du
corpuscule basal



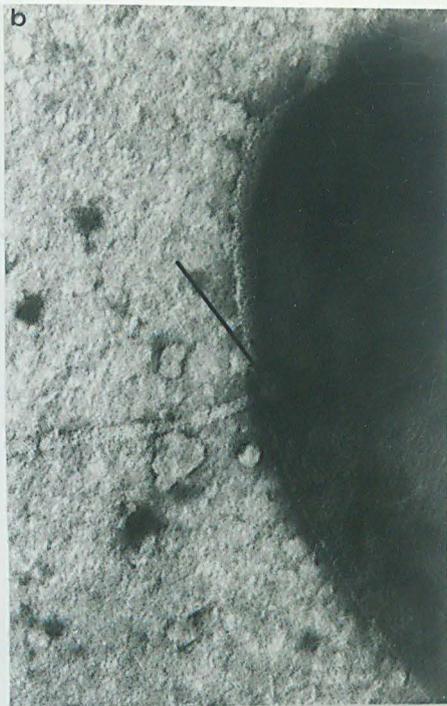
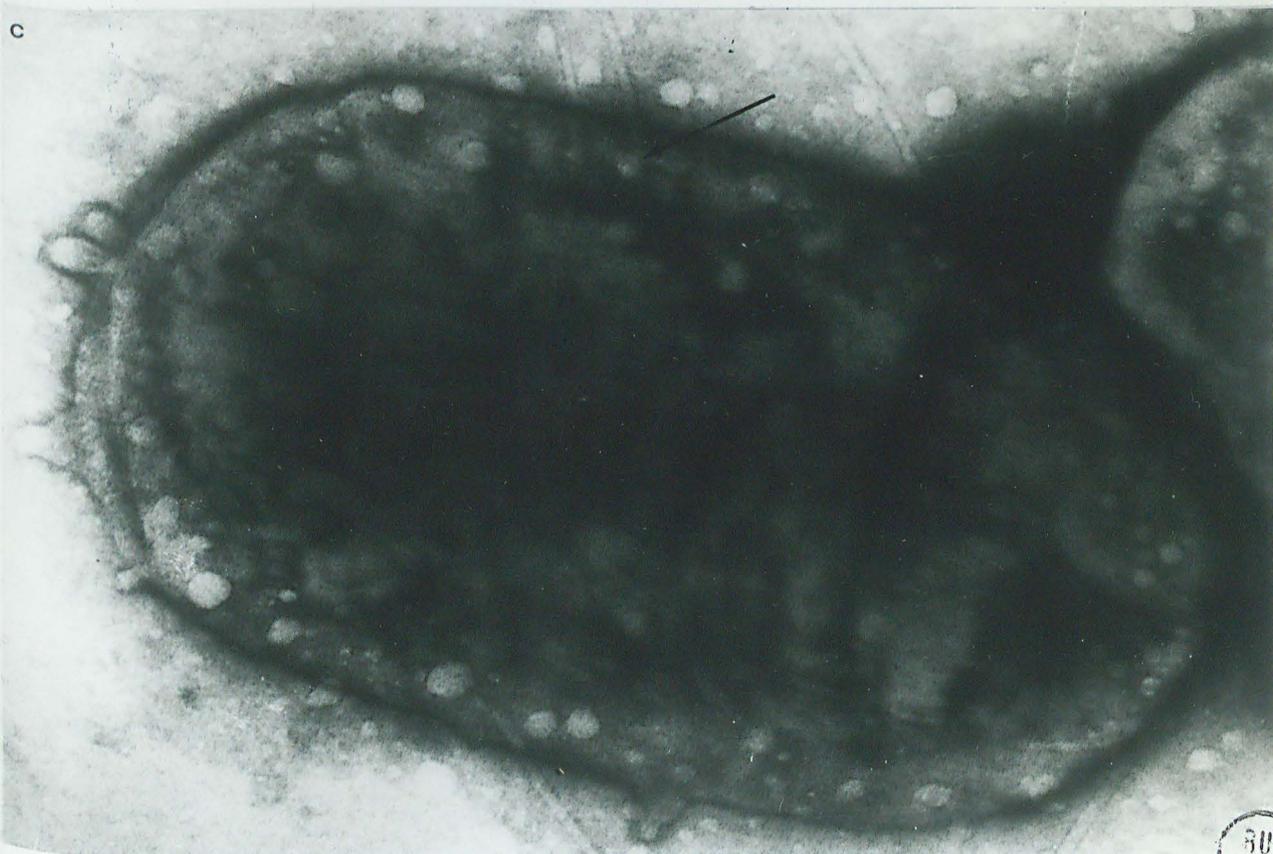


PLANCHE N° 1



BUS
LILLE

Observations en microscopie électronique

Les photographies ont été prises sur des préparations après coloration négative ⁽¹⁾ : la ciliature est péritriche ; l'insertion du flagelle apparaît sous forme d'un granule basal bien visible. (PLANCHE I)

Le mouvement chez Rhizobium meliloti

Grâce à ces flagelles, Rhizobium nage en ligne droite, pirouette sur lui-même et poursuit sa course dans une nouvelle direction.

I.2. CONDITIONS DE MOBILITE

A) En milieux faiblement gélosés (3°/∞) (PLANCHE II)

Le halo de migration est nettement visible au bout de 2 à 4 heures sur milieux riches TY et RC gélosés à 3°/∞. (Photographie a).

La mise en évidence du halo de migration sur milieu minimum est délicate et demande une certaine habitude. Cependant, au bout d'une dizaine d'heures, l'observation est aisée (Photographie b). L'importance du halo observé dans ces conditions semble montrer que la vitesse de migration de la population bactérienne est la même que celle appréciée en milieu riche. La mobilité de la souche est effective quelle que soit la nature du milieu minimum de migration (RHB₁, MgA, C.W.) gélosé à 3°/∞. L'addition d'une source de carbone (Fructose) à la concentration de 0,02 % permet une meilleure visualisation du phénomène : en effet, la multiplication bactérienne renforce l'opacité du halo de migration.

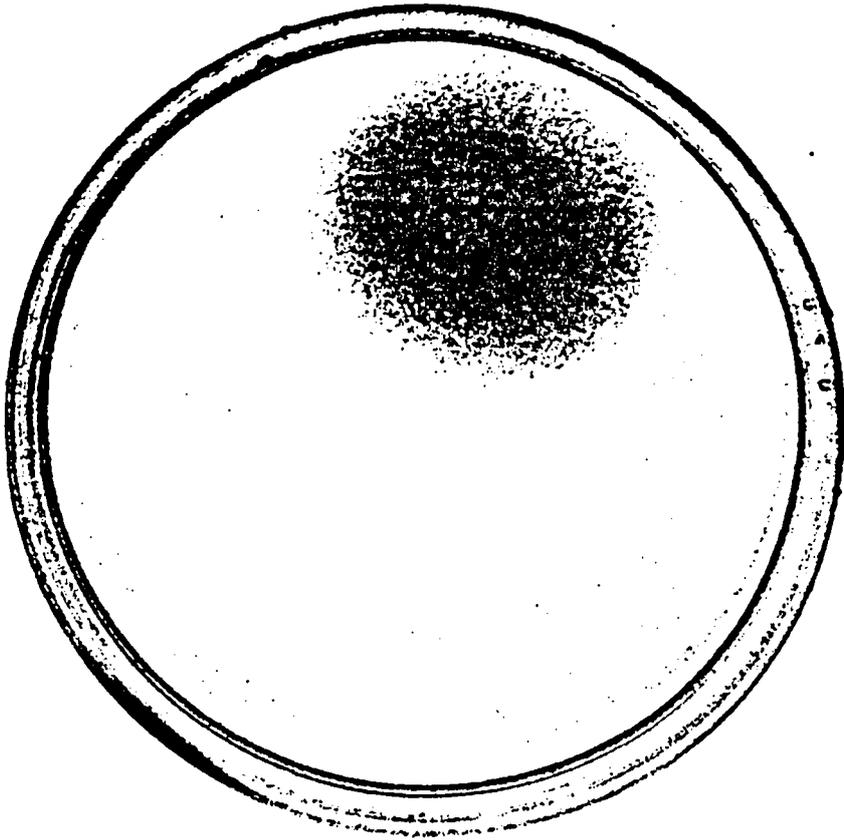
(1) Nous remercions vivement M. BERTOUX de l'UER de Biologie de l'USTL pour son aide efficace et son aimable collaboration.

PLANCHE II :

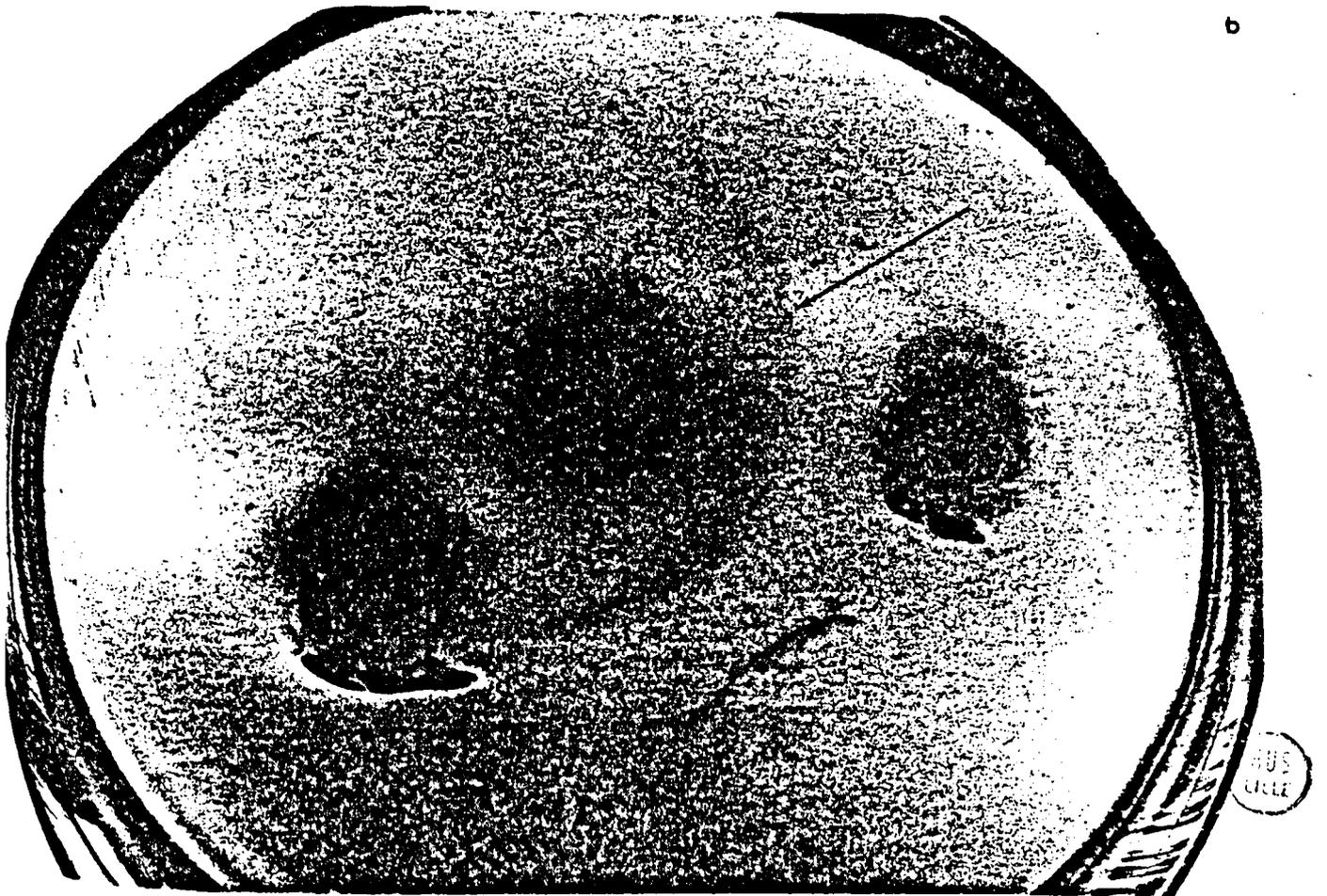
Photographie a : Halo de mobilité

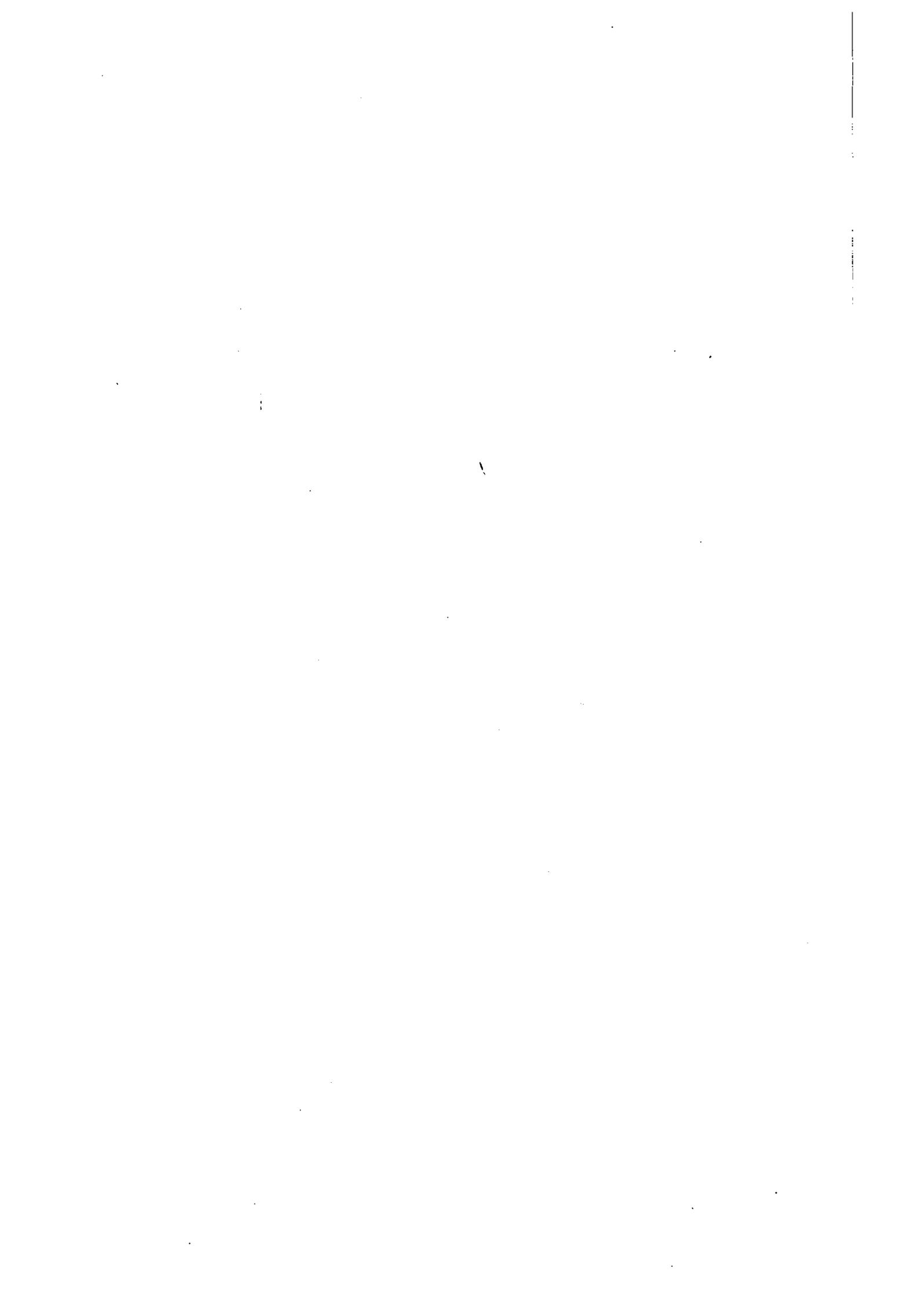
b : Densification de la population
bactérienne (————→) au voisinage
du disque attractif.

a



b





La composition des milieux (TY, RC, RHB₁ fructosé à 0,20 %, MgA Fructose à 0,2 %) utilisés pour la culture préalable de la souche n'a aucune influence ni sur la taille ni sur la vitesse de formation du halo de migration.

B) En milieux liquides

a) incidence de la nature du milieu de culture de la souche

L'observation directe en microscopie confirme les résultats précédents : quel que soit le milieu de culture (TY, RC, RHB₁, MgA) la Ve 26 garde sa mobilité.

Cependant, il semble que deux cultures successives sur milieu minimum ont un impact (sur la solidité de l'insertion des flagelles et (ou) sur leur nombre de flagelles (Cf infra).

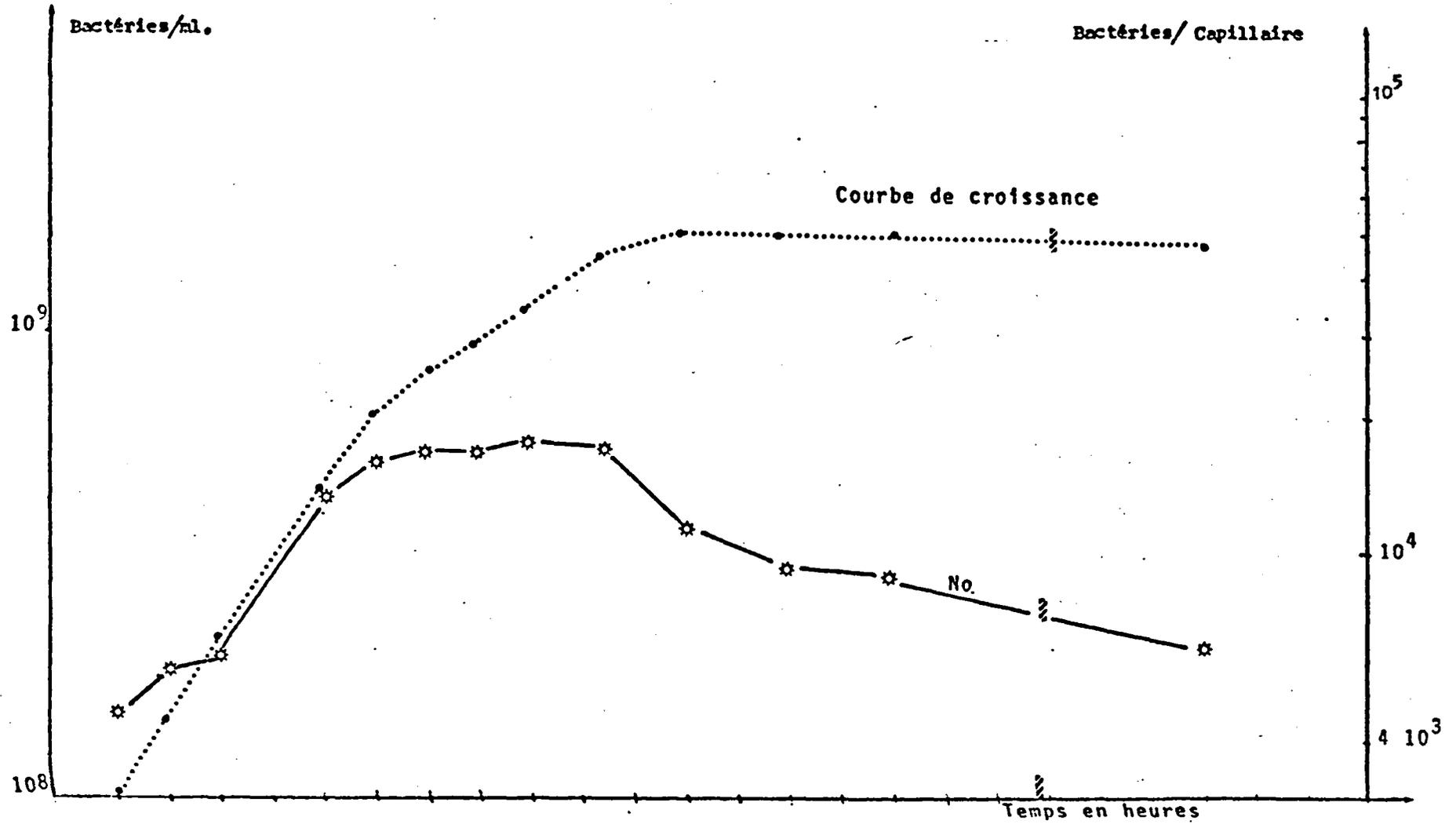
b) Effets des centrifugations

Les expériences de migration en milieu faiblement gélosé ou en capillaire se font après centrifugation de la culture bactérienne. ADLER (3) préconisant deux lavages par centrifugation avant toute manipulation, nous avons procédé de même et vérifié à chaque étape, au microscope, la mobilité de notre souche. Il s'avère que deux centrifugations successives affectent très fortement la mobilité. De même, deux cultures consécutives en milieu minimum, suivies d'une seule centrifugation diminuent sensiblement le nombre de bactéries mobiles.



MOBILITE ET ETAT PHYSIOLOGIQUE
DES BACTERIES

FIGURE N° : 16



Une mise en culture sur milieu riche de ces bactéries permet l'obtention d'une population mobile.

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail a été obtenu avec des bactéries n'ayant subi qu'une culture en milieu minimum et qu'une seule centrifugation à 3000 g pendant 20 minutes.

c) Incidence du milieu utilisé pour la migration en capillaire

Des expériences de migration, en capillaires remplis de tampon C.W. sont réalisées avec la souche cultivée sur M₉A fructosé à 0,2 %, centrifugée et remise en suspension dans du tampon C.W. (densité optique de 0,08). Le nombre moyen de bactéries par capillaire est de $N_0 = (2,23 \pm 0,62) 10^4$.

Des expériences semblables menées en milieu NT filtré font apparaître un nombre moyen N_0 voisin : $(2,64 \pm 0,56) 10^4$ bactéries par capillaire.

d) Influence de l'état physiologique

Les courbes présentées en FIGURE n° 16 démontrent que le nombre de bactéries pénétrant dans un capillaire mobile est fonction de l'état physiologique des cellules, l'optimum se situant en phase exponentielle de croissance.

III - COMMENTAIRES

Les déplacements en ligne droite de Rhizobium interrompus par des culbutes, caractéristiques des bactéries à ciliature péritriche, sont conformes à ce qui est décrit dans la littéra-

ture (4, 131, 78, 12).

Les difficultés rencontrées dans la mise en évidence de la migration de la population bactérienne en milieux pauvres et faiblement gélosés sont dues en grande partie au temps de génération (2 H 30 en moyenne) de Rhizobium comparé à celui nettement inférieur de Escherichia coli (20 mn).

Etudiée en milieu liquide, la mobilité de Rhizobium peut être estimée et comparée à celle d'autres genres bactériens. Le nombre de bactéries (No), pénétrant dans un capillaire, dont le contenu est dépourvu de toute substance effectrice, est sensiblement du même ordre que celui d'autres bactéries ainsi :

- Rhizobium meliloti (Ve 26) = No = $2,23 (\pm 0,62) 10^4$ bactéries par capillaire)
- Rhizobium spp = No est de l'ordre de 10^4 bactéries par capillaire selon CURRIER et STROBEL (37)
- E. Coli = No = 10^3 bactéries par capillaire (3)
- Salmonella No = $1,4 10^4$ à $2,5 10^4$ bactéries par capillaire (1)
- Bacillus No = 10^3 bactéries par capillaire (115)
- Pseudomonas No = 10^3 à 10^4 bactéries par capillaire (94,95)
- Streptococcus No = $1,8 10^3$ bactéries par capillaire (151)

Comme la plupart des fonctions bactériennes, la mobilité dépend étroitement de l'état physiologique de la population bactérienne. Au début de la phase de croissance de même qu'en phase de déclin, la mobilité bactérienne est sensiblement plus

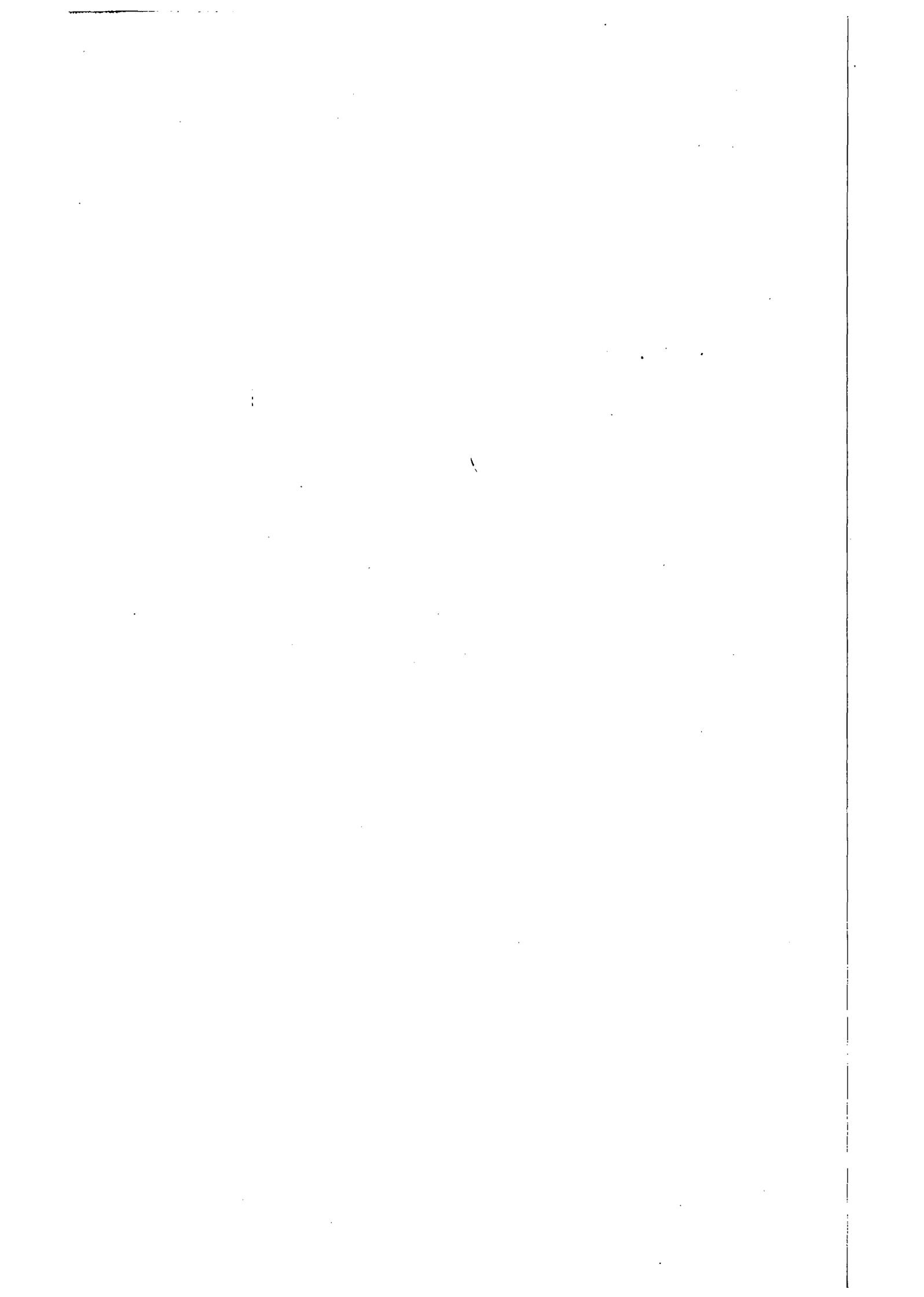
faible que celle observée en phase exponentielle, comme en témoignent les valeurs de No.

Le comportement de la souche Ve 26 se distingue essentiellement par la sensibilité de la mobilité aux centrifugations successives. AMES et ses collaborateurs (12) soulignent implicitement ce phénomène dans une publication récente : "la mobilité de Rhizobium meliloti 2011 Str₃ persiste après un seul lavage par centrifugation".

Ces auteurs signalent de plus que cette souche perd sa mobilité en présence de tryptones (sans fournir d'explications à ce phénomène).

C'est pour des raisons du même ordre que nous n'avons pas utilisé cette souche (sa faible mobilité nous a été confirmée par SZMELCMAN).

La souche Ve 26, dont la mobilité n'est que peu affectée par les conditions de culture, présente en outre l'avantage d'être une souche sauvage au potentiel génétique intact.



II ETUDE DE LA REPONSE CHIMIOTACTIQUE EN

CAPILLAIRE

I.1. INFLUENCE DE DIVERS PARAMETRES SUR LA REPONSE CHIMIOTACTIQUE

La lysine est une substance attractive pour la souche Rhizobium meliloti Ve 26. La réponse chimiotactique est optimale à la concentration de $2,5 \cdot 10^{-3} M$ en lysine (FIGURE N° 38 p 93). Cet acide aminé nous a servi d'effecteur-témoin dans l'étude des facteurs susceptibles de modifier la réponse chimiotactique.

A) Influence de l'état physiologique

La FIGURE N° 17 rend compte de l'intensité de la réponse chimiotactique en fonction de l'évolution de la densité optimale (à 600 nm) d'une culture de Rhizobium meliloti.

Pour des densités optiques comprises entre 0,3 et 1,6, le rapport $R = \frac{N}{N_0}$ est maximal et constant : la réponse chimiotactique est optimale en phase exponentielle de croissance. En dehors de cette phase exponentielle, le rapport

$R = \frac{N}{N_0}$ est nettement plus faible.

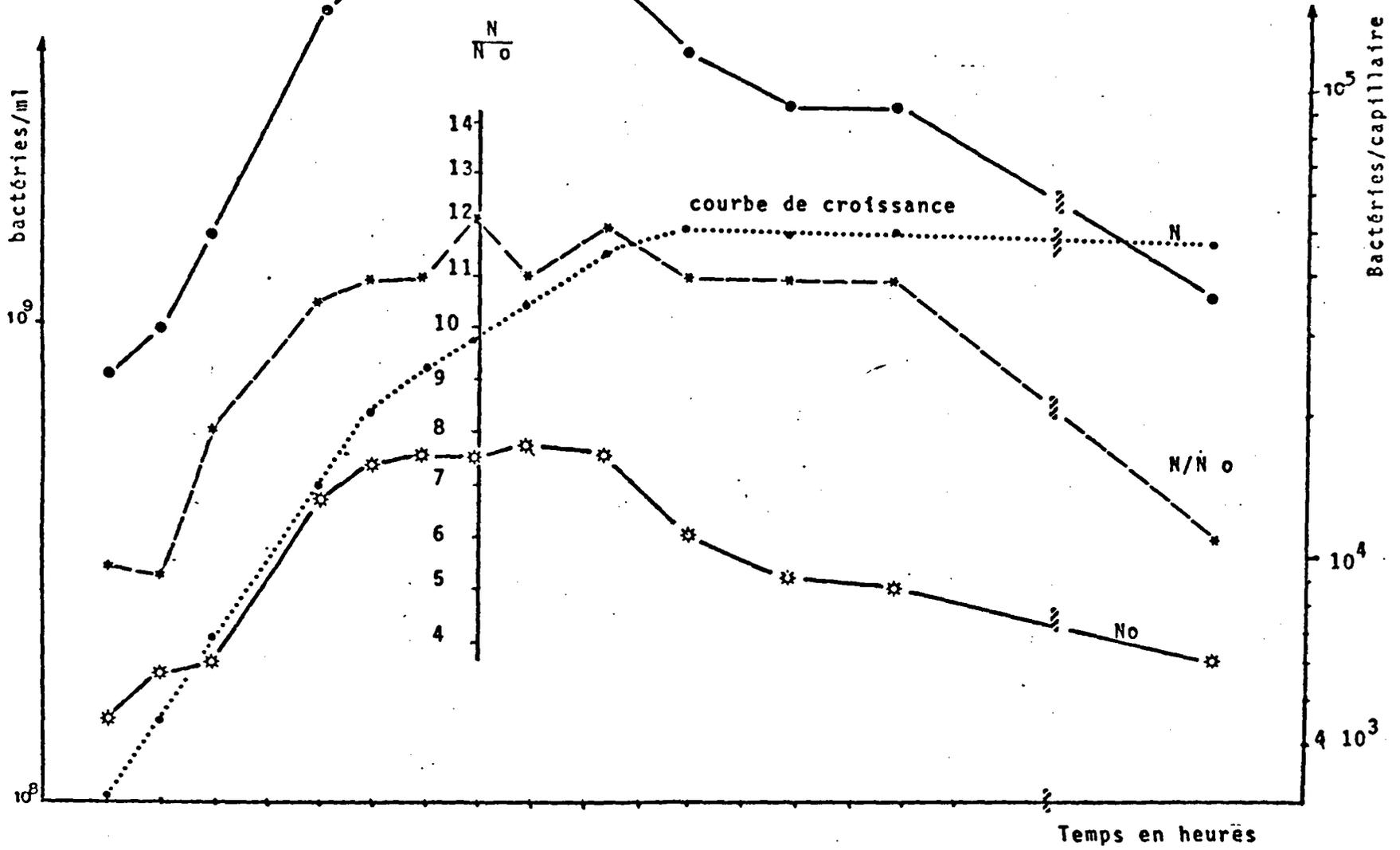
B) Influence de la température

Les résultats de l'effet des variations de températures sur la mobilité et la fonction chimiotactique sont représentés sur les courbes de la FIGURE N° 18.

3115
3116
3117

CHIMIOTACTISME ET ETAT PHYSIOLOGIQUE DES BACTERIES

FIGURE N° 17



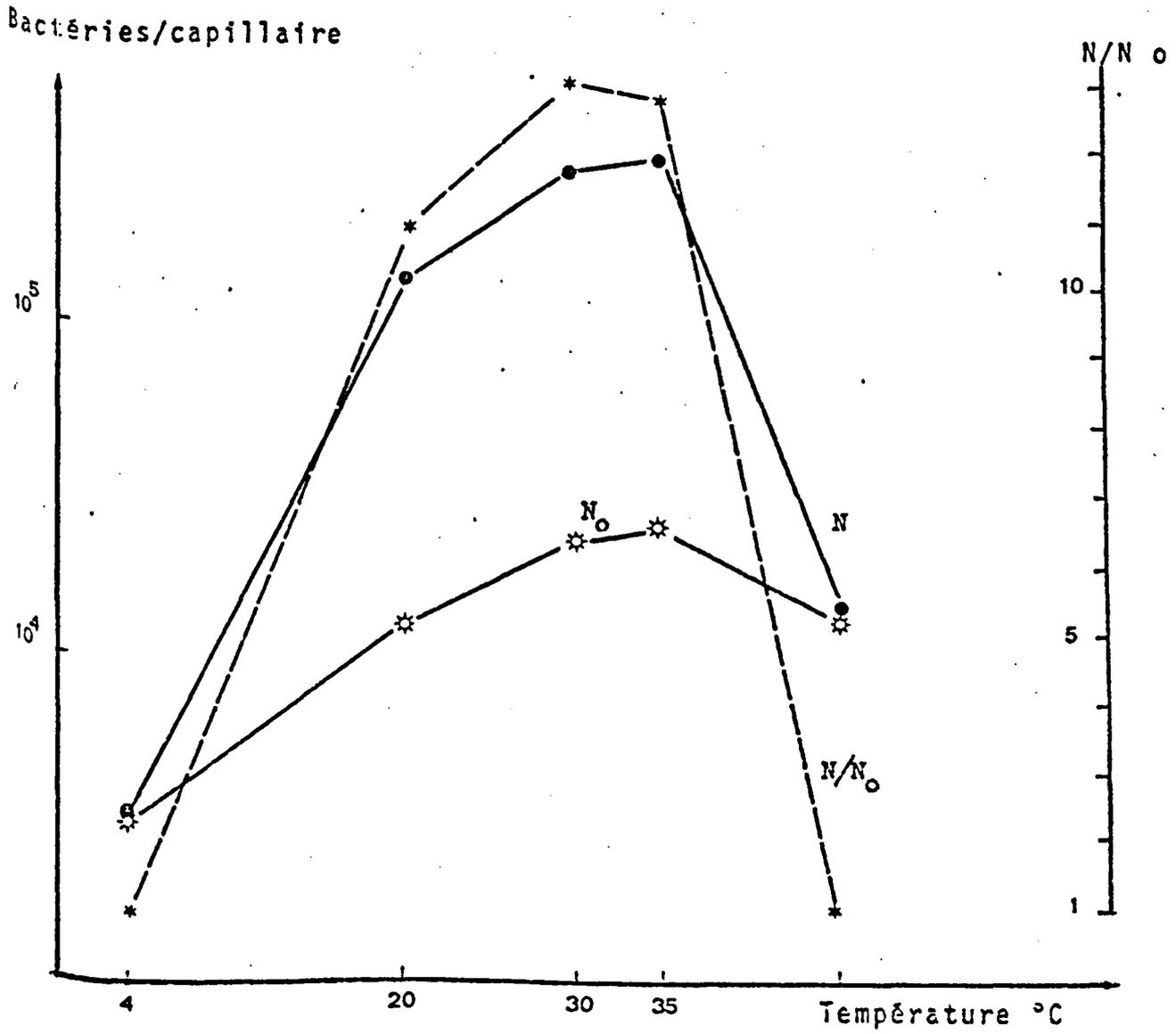


FIGURE N° 18 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA
 REPONSE CHIMIOTACTIQUE A LA LYSINE ($2,5 \cdot 10^{-3} M$)



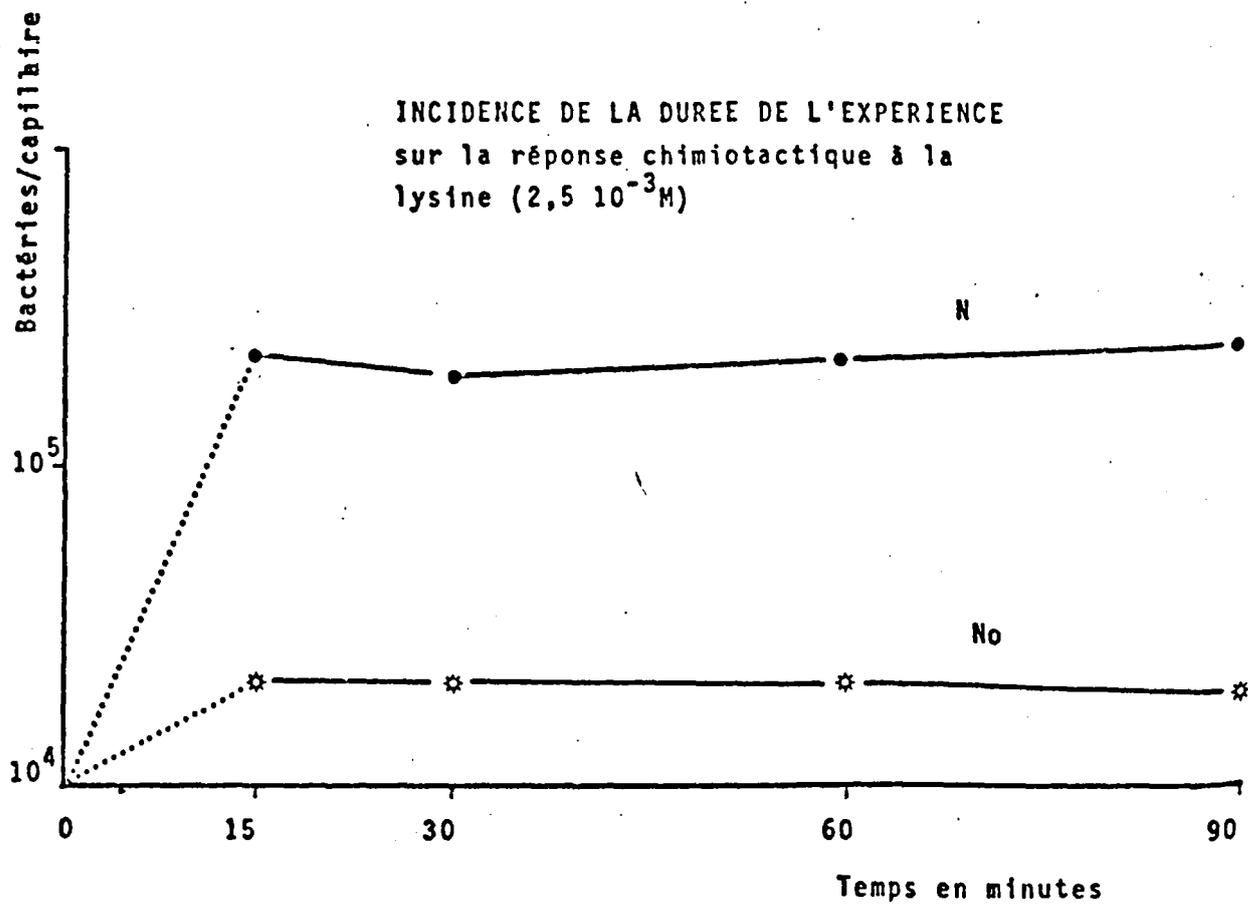


FIGURE N° : 19



La réponse chimiotactique à la lysine à la concentration de $2,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ est constante et optimale pour une gamme assez large de températures (20°C à 35°C environ). De part et d'autre de cet intervalle, l'attraction induite par la lysine s'estompe sensiblement jusqu'à s'annuler $\frac{(N)}{N_0} = 1$ pour 4°C et 45°C.

C) Influence du pH

Nous avons simplement vérifié ici que de faibles variations de pH sont sans action sur le comportement chimiotactique de Rhizobium. Des pH allant de 6 à 8 réalisés en tampon phosphate 0,01 M, ne modifient pas l'action attractive de la lysine.

D) Influence de la durée de l'expérience de migration

Des capillaires témoins et expérimentaux sont laissés au contact de la suspension bactérienne pendant 15, 30, 60 et 90 minutes.

Les courbes de la FIGURE N° 19 démontrent qu'un maximum de bactéries pénètrent dans les capillaires en une quinzaine de minutes.

Cette rapidité de la migration a été confirmée par des observations au microscope inverse, d'un capillaire plongé dans le réservoir contenant la suspension bactérienne : en moins de dix minutes les bactéries occupent la totalité du contenu du capillaire (PHOTOGRAPHIES N° a et b PLANCHE III).

E) Influence de la concentration en bactéries

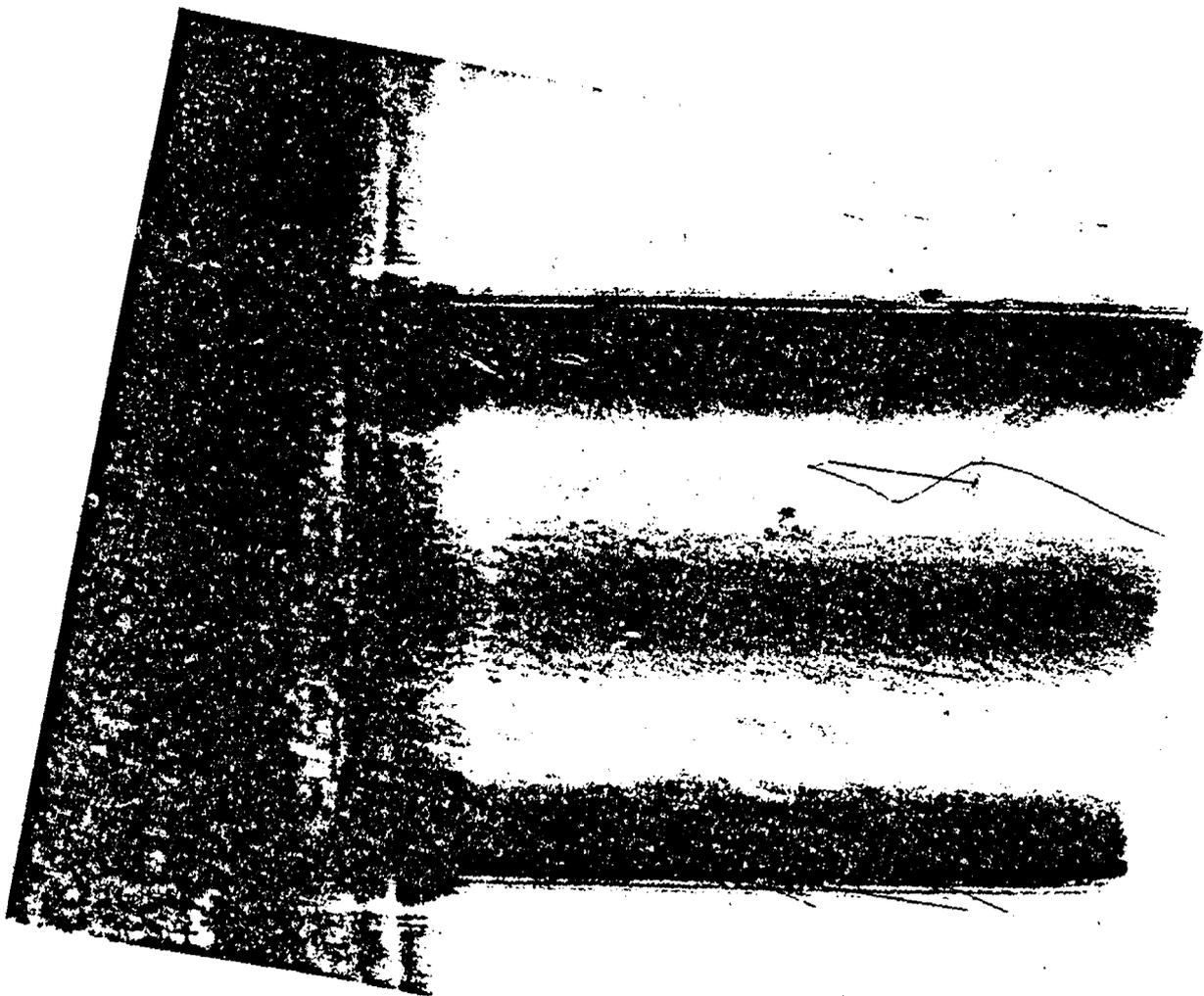
L'accumulation des bactéries dans un capillaire est fonction du nombre de cellules présentes à l'extérieur du



PLANCHE III :

a : Capillaire au temps t_0 (X 1800)

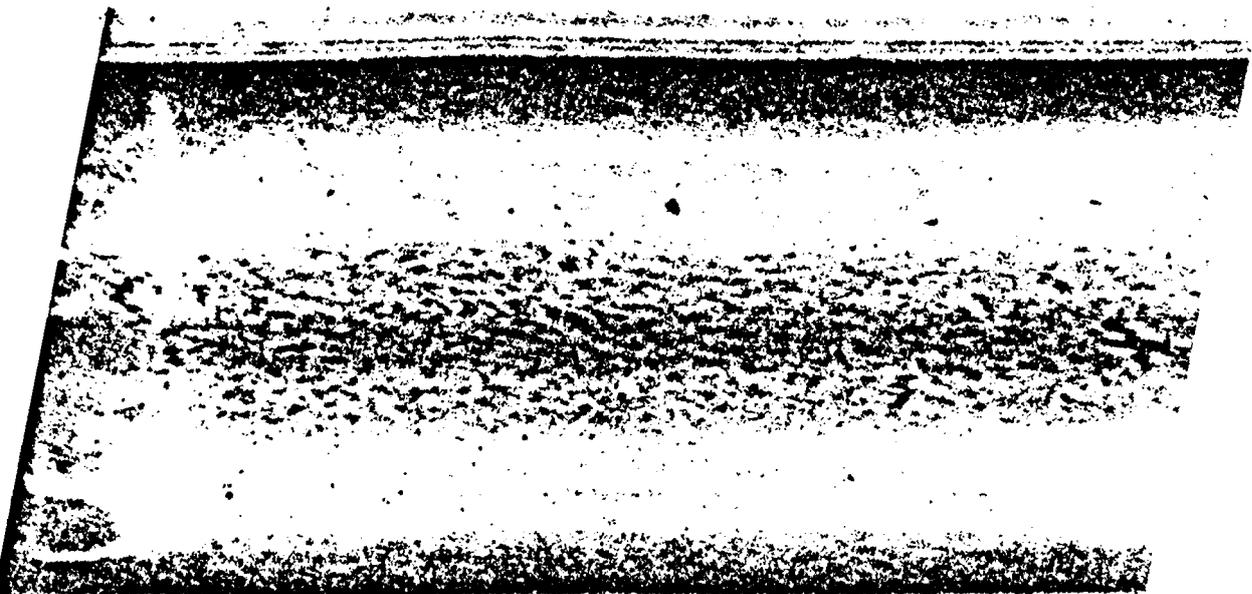
b : Capillaire au temps $t = 3$ mn. (X 1800)



a



b

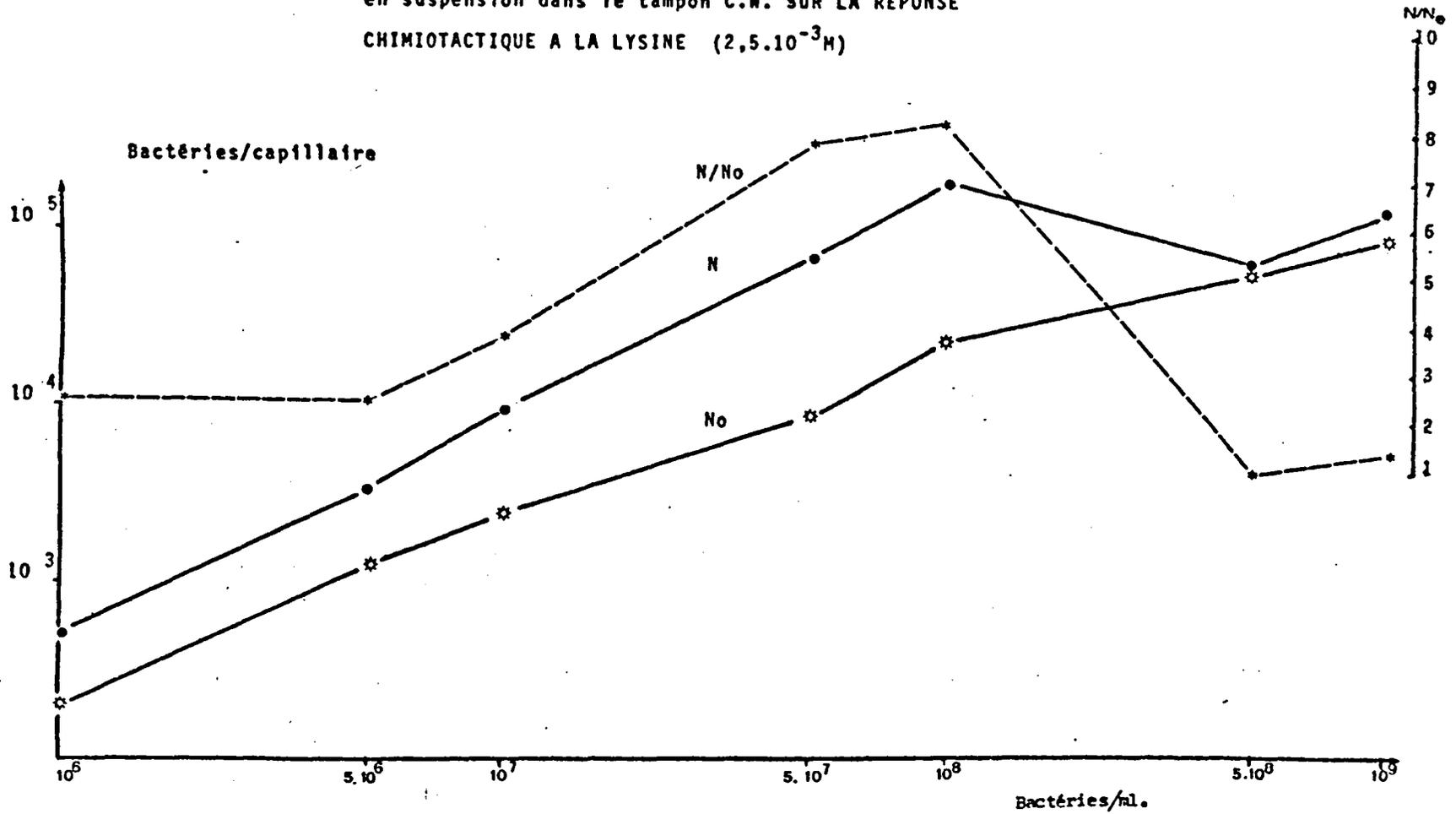


BUS
LILIE

10

FIGURE N° : 20

INFLUENCE DU NOMBRE DE BACTERIES (de 10^6 à 10^9 bactéries/ml)
en suspension dans le tampon C.W. SUR LA REPONSE
CHIMIO-TACTIQUE A LA LYSINE ($2,5 \cdot 10^{-3} M$)



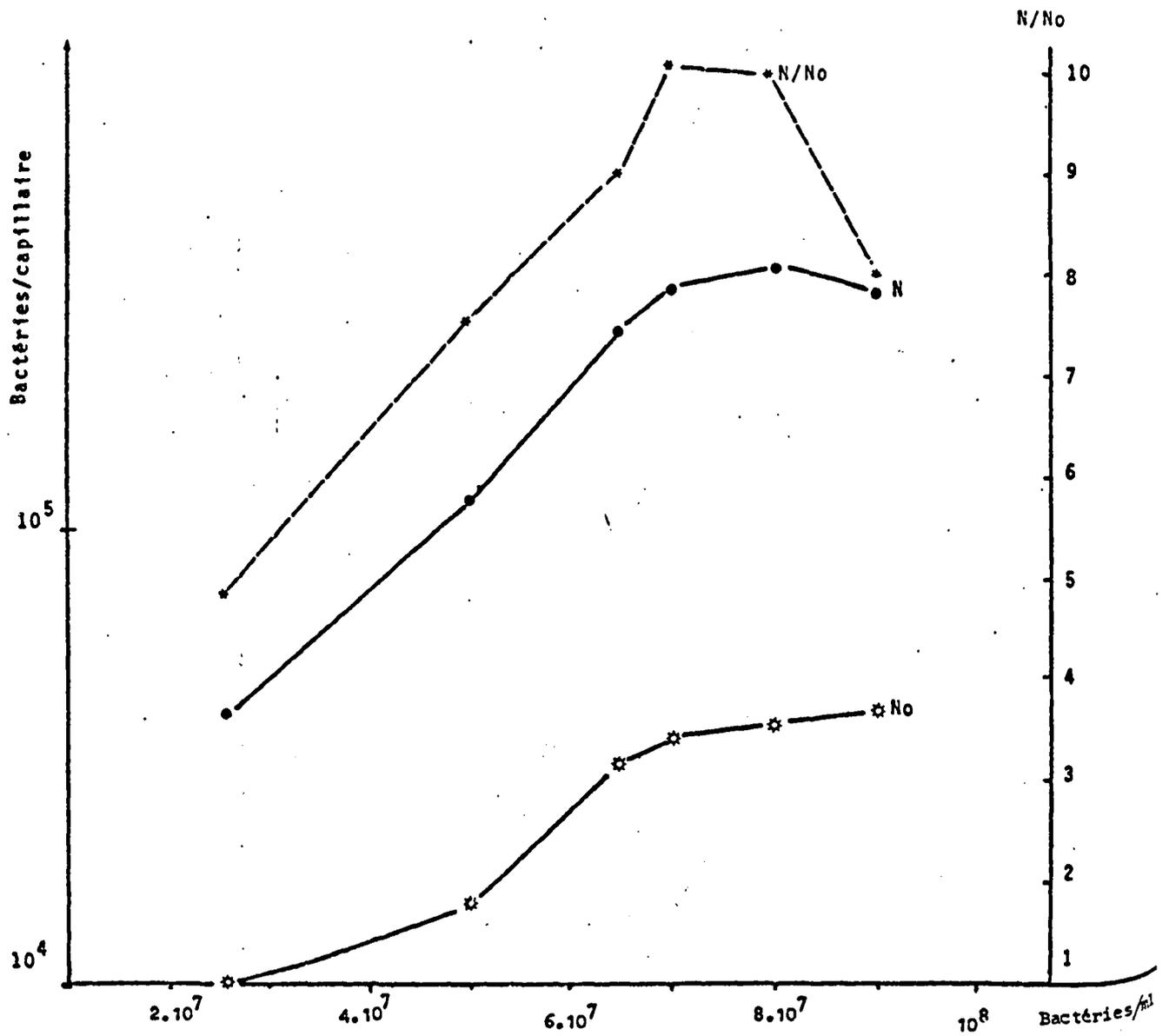


FIGURE N° : 21 INFLUENCE DU NOMBRE DE BACTERIES (de 10^7 à 10^8 bactéries/ml) en suspension dans le tampon C.W. SUR LA REponse CHIMIOtACTIQUE A LA LYSINE ($2, 5 \cdot 10^{-3} M$).

capillaire.

Dans une première expérience, la gamme de concentration en bactéries couvre un domaine allant de 10^6 à 10^9 bactéries par ml (FIGURE N°20). Le rapport $R = N/N_0$ est constant et maximal lorsque la concentration est comprise entre $5 \cdot 10^7$ et 10^8 bactéries/ml. (Densité optique à 600 nm de 0,05 à 0,1,

Une deuxième expérience (FIGURE N°21) précise cette étude et fait apparaître un optimum pour une concentration de 8 à $9 \cdot 10^7$ bactéries par millilitre de suspension bactérienne contenue dans le réservoir (correspondant à une densité optique de 0,08 à 600 nm).

II.2. COMMENTAIRES

L'influence des divers paramètres expérimentaux sur la réponse chimiotactique suscite un certain nombre de commentaires.

Les profils d'action de la température et du pH sont très semblables à ceux rapportés dans la littérature pour d'autres genres bactériens (3, 94, 91, 151, 115, 82).

Comme toute fonction biologique, le chimiotactisme dépend de l'âge de l'individu concerné. Il n'est donc pas étonnant que l'intensité de la réponse de Rhizobium à un stimulus attractif soit optimale en pleine phase exponentielle de croissance bactérienne et que l'effet attractif de la



lysine se fasse moins sentir en dehors de cette zone.

Cette technique de mise en évidence de la migration des bactéries met en jeu l'action d'un gradient de diffusion de la substance au voisinage de la lumière du capillaire. La morphologie du gradient varie très peu au cours du temps (ADLER (3)). Ceci explique l'existence d'un plateau apparaissant au bout de 15 minutes de contact entre la suspension bactérienne et le contenu des capillaires (FIGURE N° 19).

Les tracés de réponse chimiotactique d'autres genres bactériens en fonction de la durée de l'expérience de migration publiés par divers auteurs sont tous analogues (3, 91, 94, 151, 115, 82).

Les conditions de mise en évidence du Rhizobium meliloti Ve 26 ne semblent pas jusqu'ici très différentes de celles utilisées pour d'autres genres de bactéries. Cependant, l'action de la concentration en bactéries présentes dans le réservoir fait apparaître un phénomène non évoqué dans la littérature. Il n'est plus possible de mettre en évidence l'activité attractive de la substance testée (ici la lysine) à partir de concentrations de l'ordre de $5 \cdot 10^8$ bactéries par ml, alors que la mobilité, que l'on peut suivre par l'intermédiaire des valeurs de N_0 , n'est pas du tout affectée dans ces conditions.

"Tout se passe comme si" la fonction chimiotactique était bloquée, comme s'il n'y avait plus de gradient. En fait, on constate qu'en extrapolant la courbe d'accumu-

lation des bactéries sous l'influence d'un stimulus attractif pour une concentration bactérienne de 5.10^8 bactéries par ml on obtiendrait environ 2.10^6 bactéries par capillaire correspondant à une concentration de 4.10^9 bactéries par ml soit 10 fois plus que celle du réservoir. Un déséquilibre entre le nombre de molécules de substance attractive et le nombre de bactéries sollicitées semble être une explication avec comme corrolaires l'encombrement à la lumière du capillaire et la création d'un gradient opposé en oxygène qui bloqueraient la réponse chimiotactique.

En conclusion à ce chapitre concernant l'influence des paramètres expérimentaux sur la mise en évidence du chimiotactisme chez Rhizobium meliloti, nous résumons les conditions optimales d'une expérience de chimiotactisme :

- le pH du tampon CW servant à la mise en solution des substances à tester et à la réalisation de la suspension bactérienne est égal à 7.

- la densité optique de la suspension bactérienne réalisée après une seule centrifugation doit se situer aux environs de 0,08 à 600 nm.

- la température de l'expérience est fixée à 30°C, température utilisée par ailleurs pour la culture de la souche.

- la durée de chaque essai a été fixée pour des raisons de sécurité à 60 nm, ce qui permet de plus, une comparaison de nos résultats avec ceux obtenus dans d'autres travaux.

III COMPORTEMENT CHIMIOTACTIQUE DE RHIZOBIUM EN PRESENCE D'EFFECTEURS SIMPLES

III.1 - REMARQUES PRELIMINAIRES

Le principe de détermination de la concentration seuil "Cs" à partir de laquelle la mise en évidence d'une réponse chimiotactique par la technique en capillaire est possible, est empruntée à MESIBOV et ADLER (92).

Des dilutions au $\frac{1}{10}$ de la substance à étudier sont testées pour leur activité chimiotactique. Le nombre de bactéries ayant pénétré dans un capillaire, obtenu sur au moins deux déterminations, et la valeur des diverses dilutions testées (c) sont portées respectivement en ordonnées et en abscisses en échelle logarithmique.

Lorsque la substance est effectrice, log N est un fonction linéaire de log C, dans un certain domaine de concentrations : l'équation de la droite de régression est de la forme :

$$\log N = a \log (c) + b$$

a = pente de la droite

b = ordonnée à l'origine

L'intersection de cette droite de régression avec la "ligne de base" représentée par No, nombre moyen de bactéries ayant pénétré dans un capillaire témoin, conduit à la détermination d'une concentration seuil Cs à partir de laquelle la méthode d'étude de la migration en capillaire permet la détection d'une réponse chimiotactique.

La concentration optimale CM est celle pour laquelle le nombre N est le plus élevé.

Nous rappelons ici que les notions de concentrations (seuil et optimale) sont relatives : les bactéries ne répondent pas à des concentrations mais à des gradients, s'établissant ici par diffusion à partir de ces concentrations. La méthode de mesure de la migration de bactéries dans des capillaires est un artifice expérimental de mise en évidence du chimiotactisme bactérien.

Chimiotactisme et mobilité étant deux fonctions distinctes, l'expression de l'activité d'un effecteur sur les bactéries ne peut se faire sous la forme d'un rapport $R = \frac{N}{N_0}$. Par contre, l'expression $\frac{N}{N_S}$ appelée facteur multiplicateur dans laquelle N_S représente le nombre de bactéries pénétrant dans un capillaire contenant la substance effectrice à la concentration seuil permet d'apprécier et de comparer l'activité de divers composés sur les bactéries et les comportements bactériens entre-eux.

L'activité chimiotactique d'un certain nombre de molécules "simples" telles certains sucres et dérivés de sucres, des vitamines (biotine et thiamine) et des acides aminés, a été testée par la technique de migration en capillaire (et vérifiée par la méthode en milieu faiblement gélosé).

Les résultats de l'évolution de N en fonction des concentrations sont présentés successivement et sous forme de graphes tracés sur papier bilogarithmique. Pour chaque substance la droite de régression linéaire est représentée, les concentra-

tions seuil et optimale signalées, le facteur $F = N/N_s$ évalué.

Les commentaires concernent principalement la réponse de Rhizobium à la substance considérée et au groupe biochimique auquel elle appartient. Le comportement chimiotactique de Rhizobium est comparé à celui d'autres genres bactériens. La confrontation de nos résultats avec ceux obtenus par d'autres auteurs sur Rhizobium sera rapide, attendu que l'étude de son comportement vis à vis de molécules simples et connues n'a fait l'objet d'aucune publication à ce jour, seuls quelques résultats partiels sont signalés.

FIGURE N° : 23

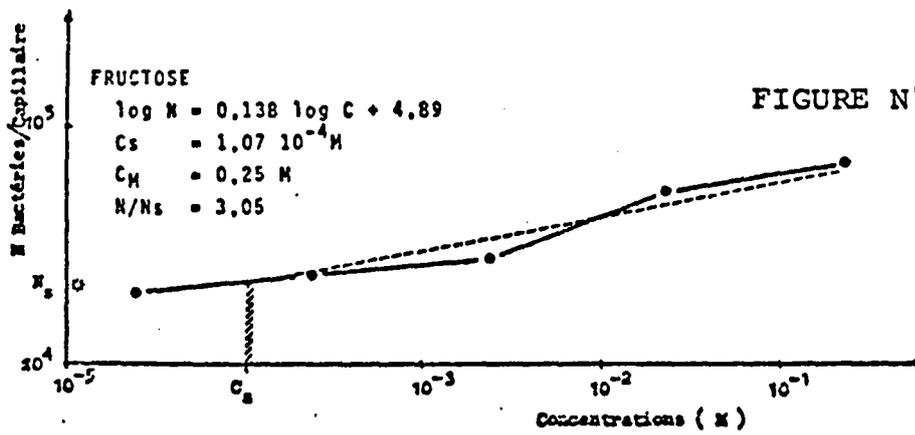
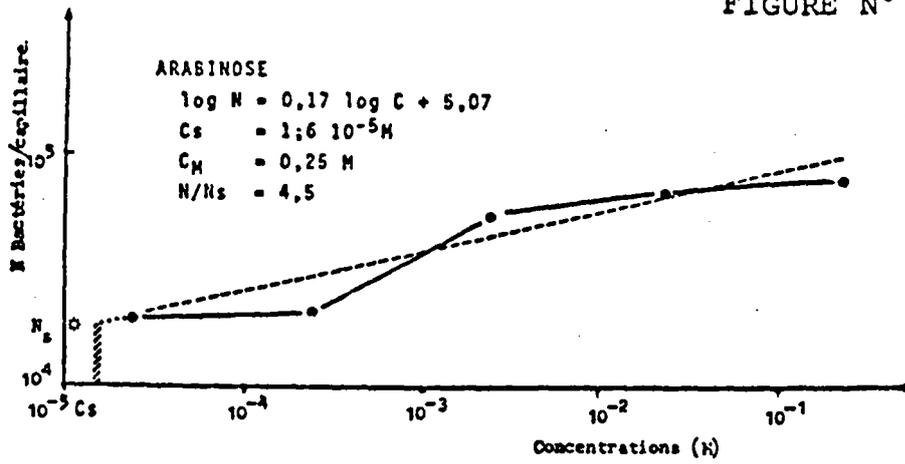
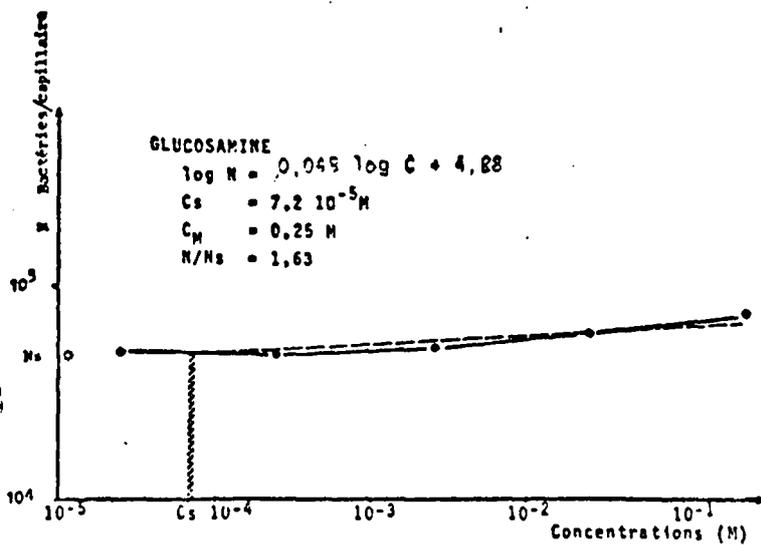


FIGURE N° : 24

FIGURE N° : 25



III.2. ACTION DE CERTAINS SUCRES ET DERIVES

Le L-arabinose, le D-fructose, la D-glucosamine, le gluconate de sodium et le 2-céto-gluconate de calcium ont été étudiés.

Les résultats de l'activité chimiotactique de chacun de ces composés sont présentés dans les FIGURES N°

Les valeurs des concentrations seuils, des pentes des droites de régression, les paramètres caractérisant la réponse optimale : concentration C_M et facteur correspondant $F = N/N_s$ (TABLEAU II) font ressortir l'action du gluconate ($F = 24,5$).

Le gluconate est utilisé comme source de carbone en association avec le mannitol dans certains milieux de culture de Rhizobium (71). Une conclusion laissant supposer que Rhizobium est attiré par les substances qu'il est à même de métaboliser est trop hâtive ; en effet, le fructose, principale source de carbone des milieux de croissance de Rhizobium, n'est que peu attractif ($F = 3$). La même observation peut être faite pour le L-arabinose et la glucosamine qui présentent une faible activité chimiotactique ($F = 4,5$ et $F = 1,63$) et sont métabolisés par Rhizobium meliloti Ve 26(63)

Le 2 céto-gluconate, produit du métabolisme du glucose par Rhizobium est préjudiciable à sa croissance (69_b). Il n'est pas pour autant un répulsif ($N/N_s = 3$).

FIGURE N° : 26

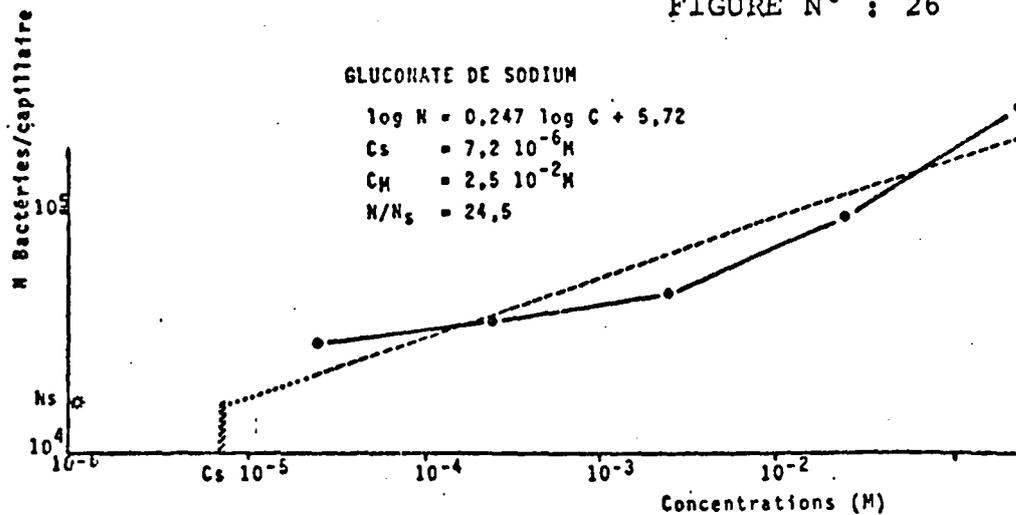


FIGURE N°; 27

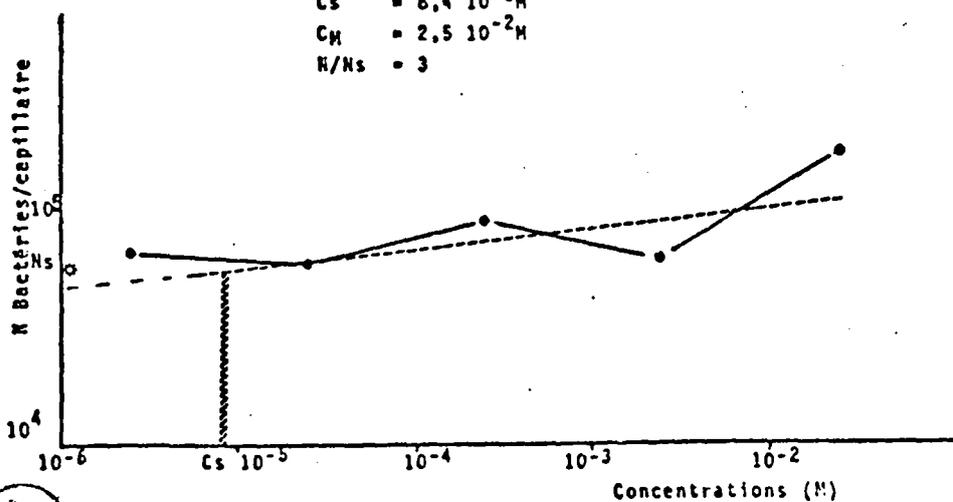
2 - CETO-GLUCONATE DE CALCIUM

$$\log N = 0,089 \log C + 5,2$$

$$C_s = 8,4 \cdot 10^{-6} M$$

$$C_M = 2,5 \cdot 10^{-2} M$$

$$N/N_s = 3$$



PARAMETRES EFFECTEURS	PENTE DE LA DROITE DE REGRESSION	Cs (M)	REPONSE C _M (M)	OPTIMALE F = N/Ns
D-ARABINOSE	0,17	1,6 10 ⁻⁵	0,25	4,5
		<i>10⁻⁴</i>	<i>0,1</i>	<i>11</i>
D-FRUCTOSE	0,138	1,07 10 ⁻⁴	0,25	3
		<i>10⁻⁵</i>	<i>0,01</i>	<i>52</i>
D-GLUCOSAMINE	0,048	7,2 10 ⁻⁵	0,25	1,63
		<i>10⁻⁵</i>	<i>0,01</i>	<i>63</i>
D-GLUCONATE	0,24	7,2 10 ⁻⁶	0,25	24
		<i>10⁻¹</i>		<i>1</i>
D-CETOGLUCONATE	0,089	8,4 10 ⁻⁶	0,25	3

TABLEAU II ACTIVITE CHIMIOTACTIQUE DE CERTAINS SUCRES ET DERIVES

*Les valeurs en italiques sont extraites des travaux
d'ADLER sur E. Coli (8)*



FIGURE N° : 28

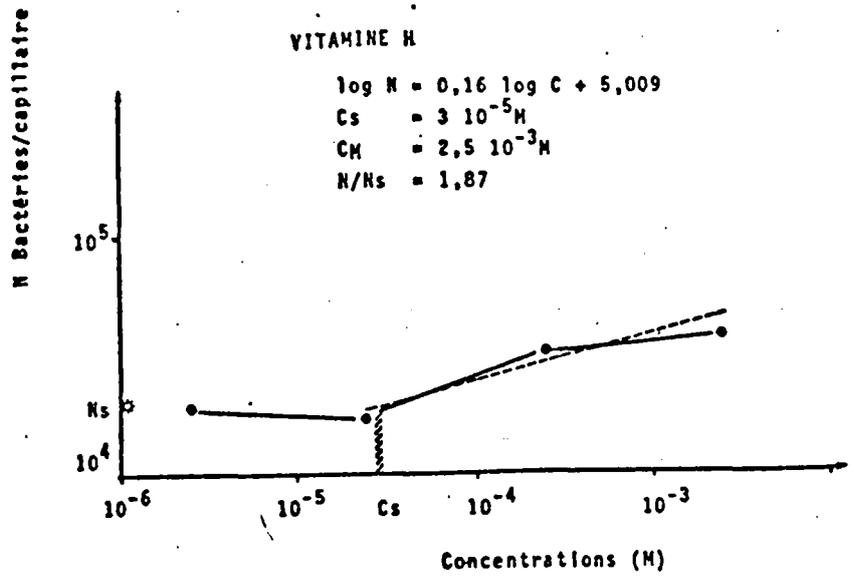
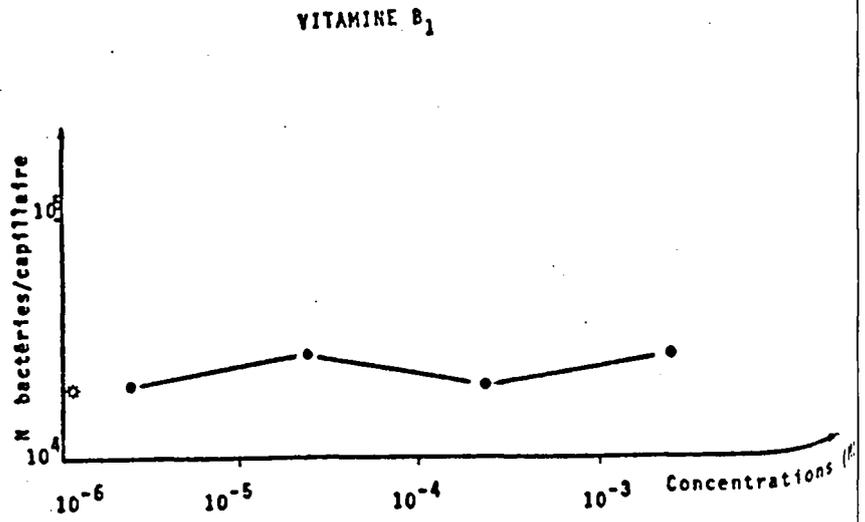


FIGURE N° : 29



Les principes du comportement de Rhizobium meliloti correspondent à ceux énoncés dans notre chapitre introductif : l'attraction ou la répulsion d'une bactérie n'est pas liée à la valeur nutritive ou la nocivité de la substance effectrice.

Une comparaison de la réponse de Rhizobium à celle de E. coli (8) fait apparaître l'extrême sensibilité de ce dernier et la quasi indifférence du premier aux sucres et dérivés (TABLEAU N° II). La divergence comportementale est maximale en ce qui concerne le gluconate : indifférence pour E. coli, chimiotactisme positif pour Rhizobium meliloti Ve 26.

D'une manière générale, les bactéries dans le comportement chimiotactique vis à vis de ces sucres a été testé, montrent une nette "affinité" pour ces molécules(129,151,91) alors que Rhizobium est peu ou pas attiré même par des concentrations relativement importantes (M/4).

III.3. ACTION DE LA BIOTINE ET DE LA THIAMINE

Les courbes de réponse à ces deux vitamines sont représentées FIGURES N° 28. et 29.

Les Rhizobium présentent une certaine exigence de croissance en ces vitamines (62), par ailleurs présentes dans les excréments racinaires de végétaux (28, 12, 6) : nous avons testé l'activité de la biotine et de la thiamine. Rhizobium meliloti Ve 26, dans nos conditions expérimentales, est indifférent d'un point de vue chimiotactique à la présence de la vitamine B₁ ; il n'est que peu attiré par la vitamine H.



FIGURE N° : 30

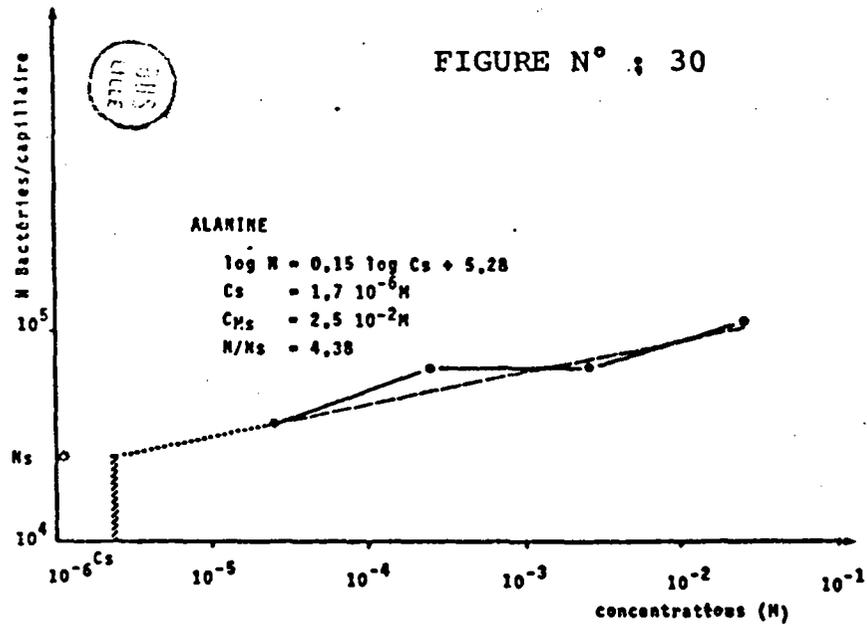


FIGURE N° : 31

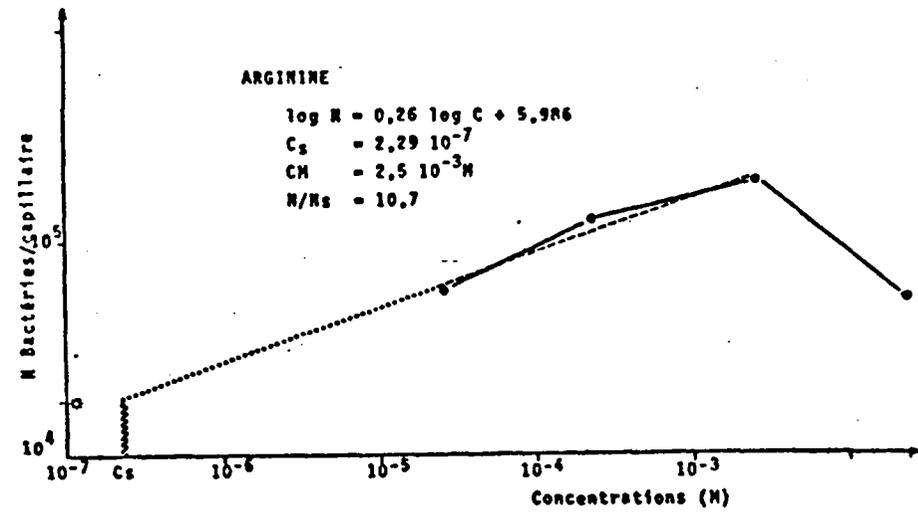


FIGURE N° : 32

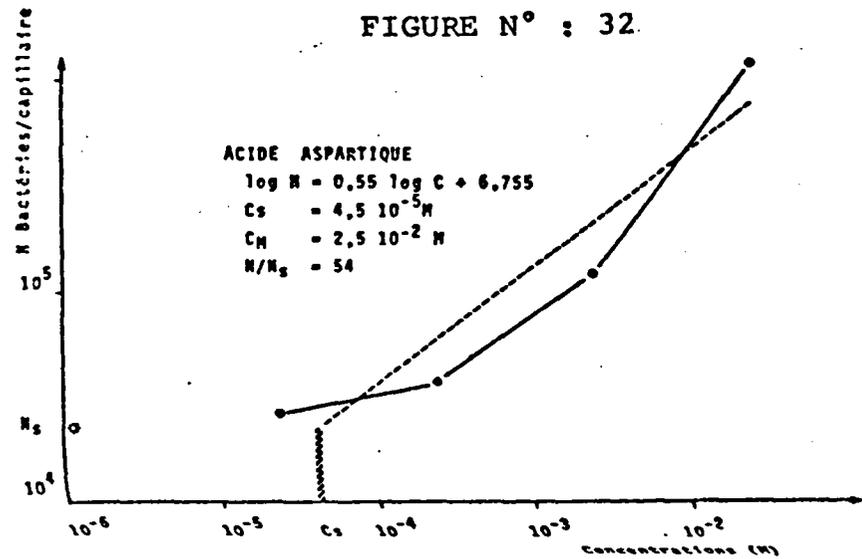
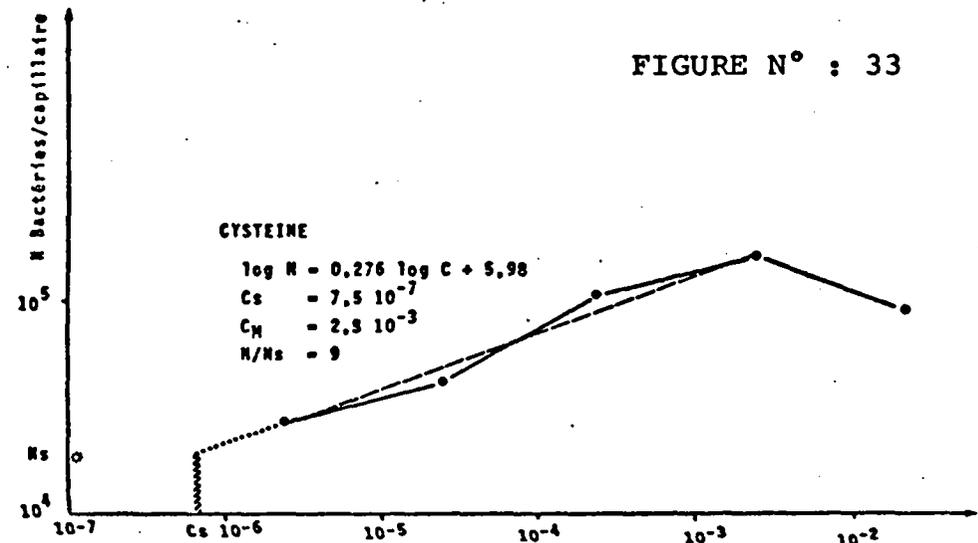


FIGURE N° : 33



III.4. ACTION DES ACIDES AMINES

Les courbes de réponse chimiotactique de Rhizobium meliloti Ve 26 aux acides aminés de la série "L" sont présentées par ordre alphabétique de la Figure 30 à la Figure 46.

Les paramètres permettant d'apprécier l'activité chimiotactique de ces composés sont regroupés dans le TABLEAU III p 96.

La méthionine se distingue de l'ensemble par une concentration plus faible à l'optimum de la réponse : $C_M 10^{-4} M$. Le rôle prépondérant de la méthionine dans le mécanisme du chimiotactisme, notamment au niveau de processus de méthylation, explique peut-être ce phénomène (135)

Nous observons (TABLEAU III) que Rhizobium meliloti n'est pas indifférent aux acides aminés ($N/N_s = 3$, en général) qu'ils permettent ou non une croissance. Des essais, en milieu faiblement gélosé, avec des sels d'ammonium, réalisés dans notre laboratoire (63), montrent que la fonction amine libre n'est pas la cause principale de l'attraction exercée par les acides aminés.

Le TABLEAU III fait apparaître en outre que les acides aminés à chaîne polaire sont plus attractifs que ceux à chaîne non polaire pour lesquels le facteur F ne dépasse pas 6.

Nous avons également testé l'activité chimiotactique d'un mélange équi-moléculaire des principaux acides aminés rencontrés dans les exsudats racinaires (FIGURE N° 47).

Il semble qu'il y ait des phénomènes de synergie entre certains acides aminés puisque la comparaison des paramètres (pente = 0,33 ; $C_s = 6,7 10^{-7}$, $N/N_s = 66$) avec ceux d'une courbe moyenne (pente = 0,28, $C_s = 4,2 10^{-6}$ $N/N_s = 11$) fait apparaître une plus grande activité chimiotactique.



FIGURE N° : 34

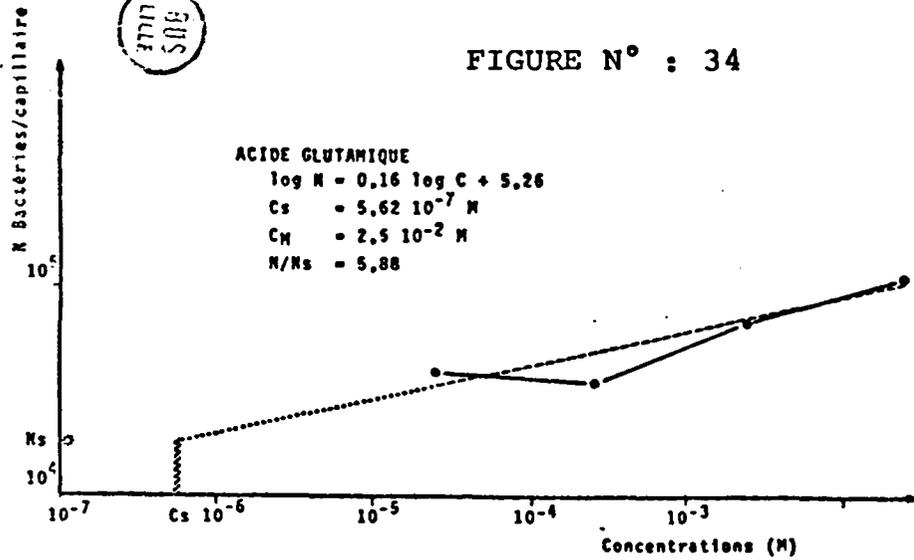


FIGURE N° : 35

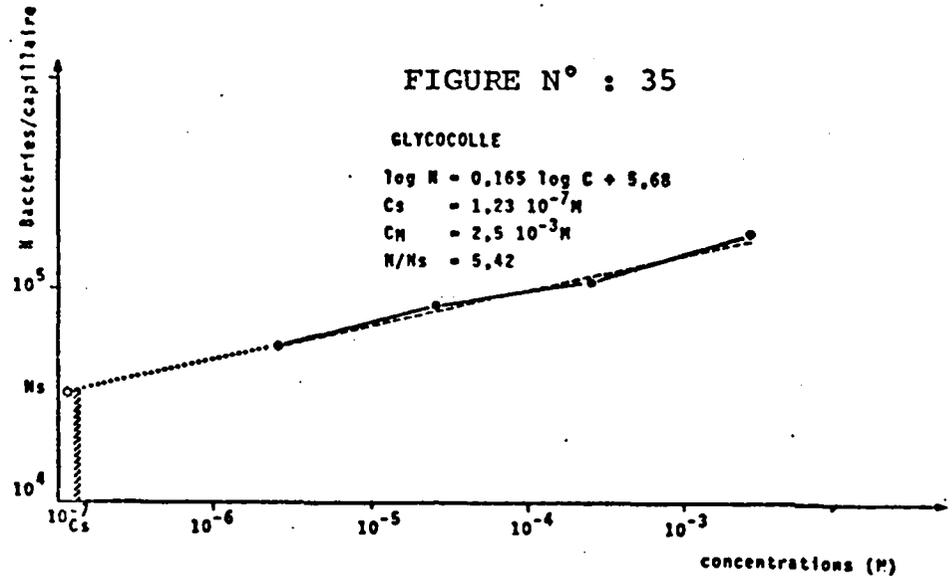


FIGURE N° : 36

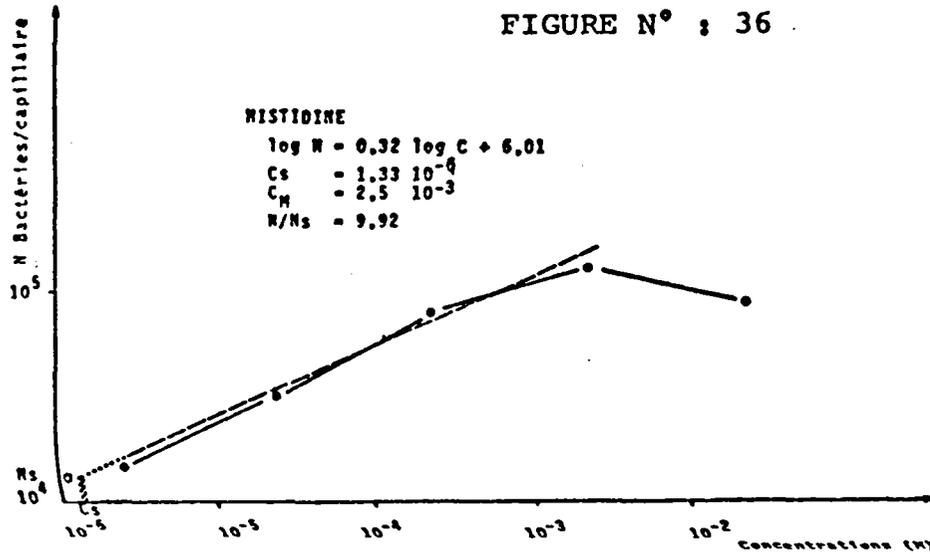


FIGURE N° : 37

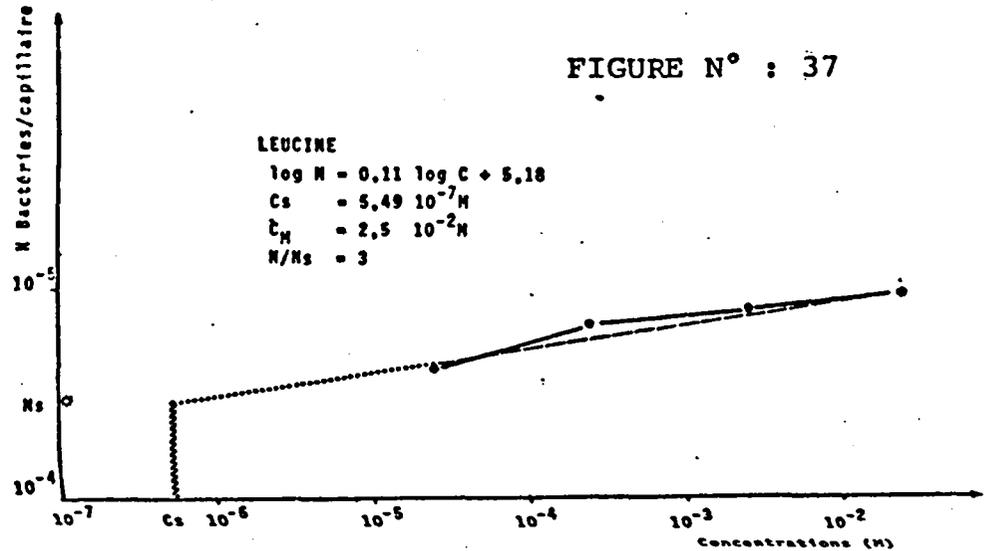


FIGURE N° : 38

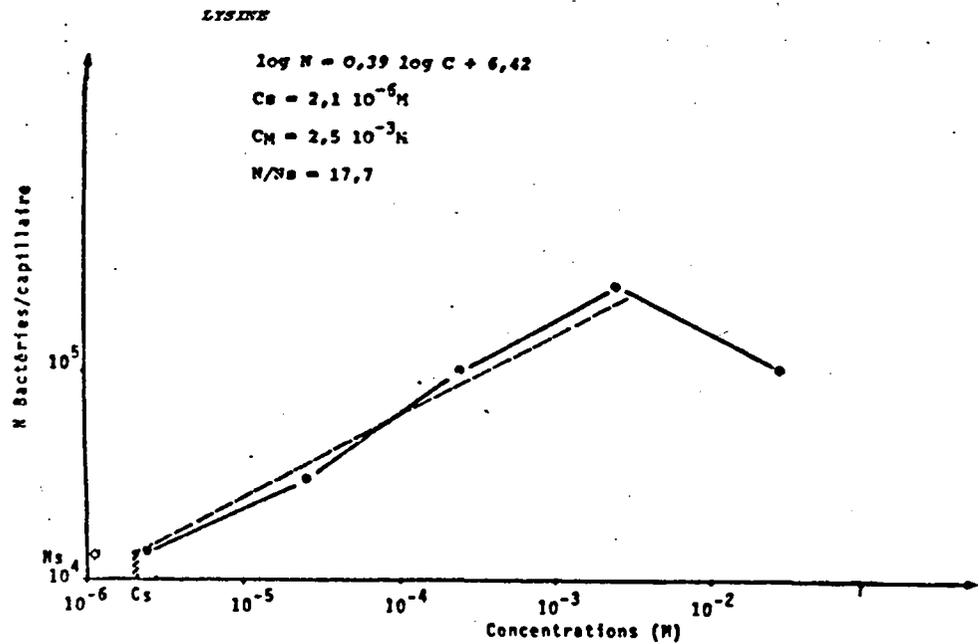


FIGURE N° : 39

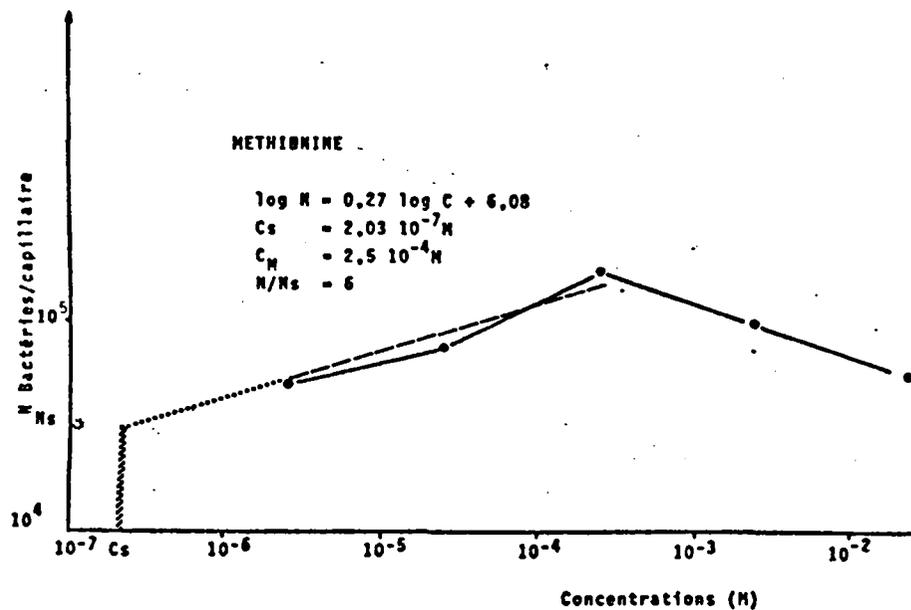


FIGURE N° : 40

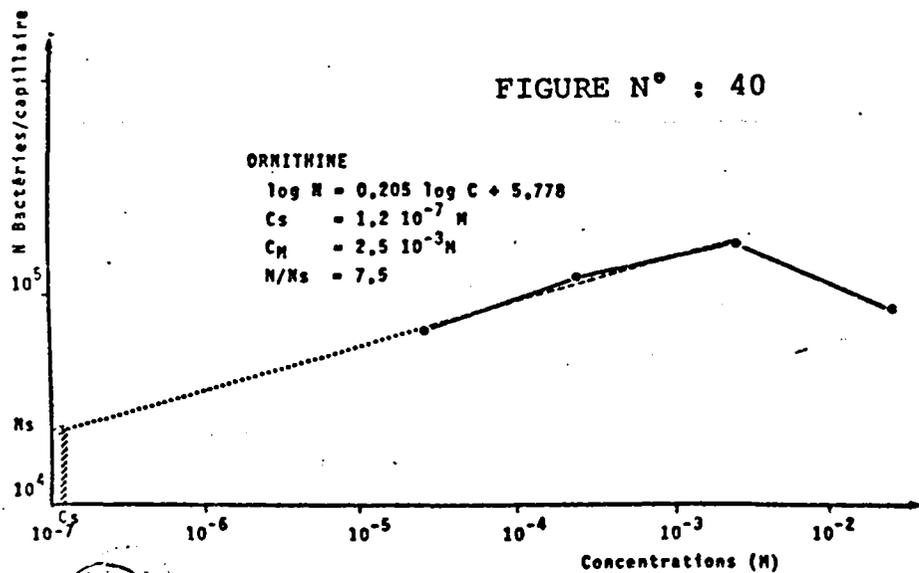
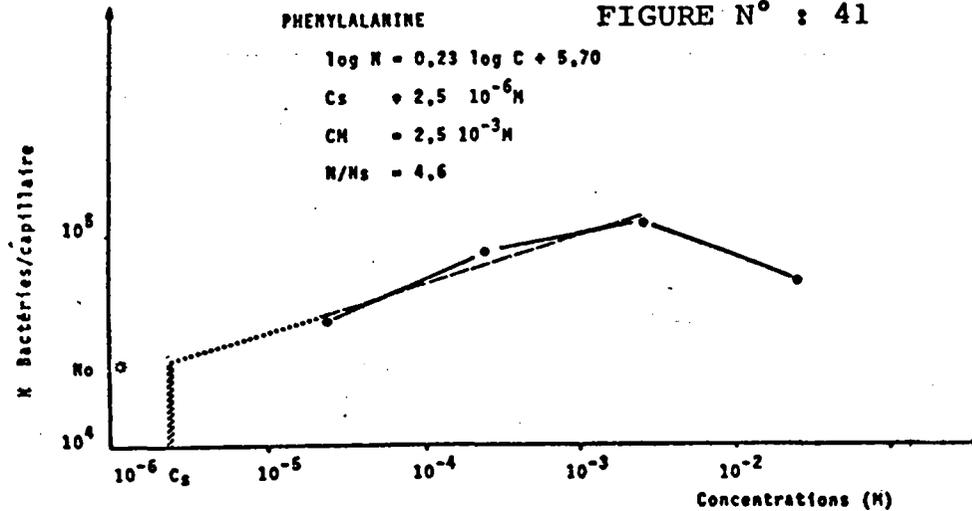


FIGURE N° : 41



3770
5116

FIGURE N° : 42

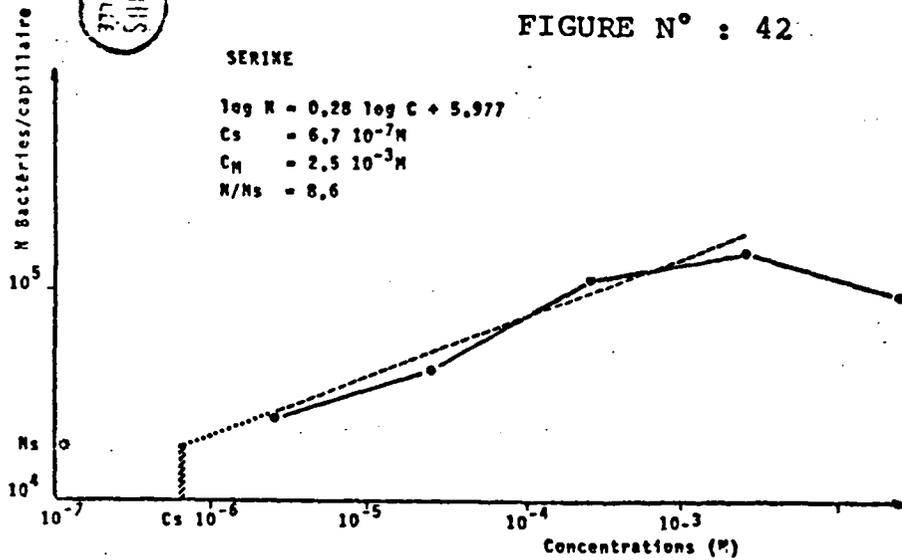


FIGURE N° : 43

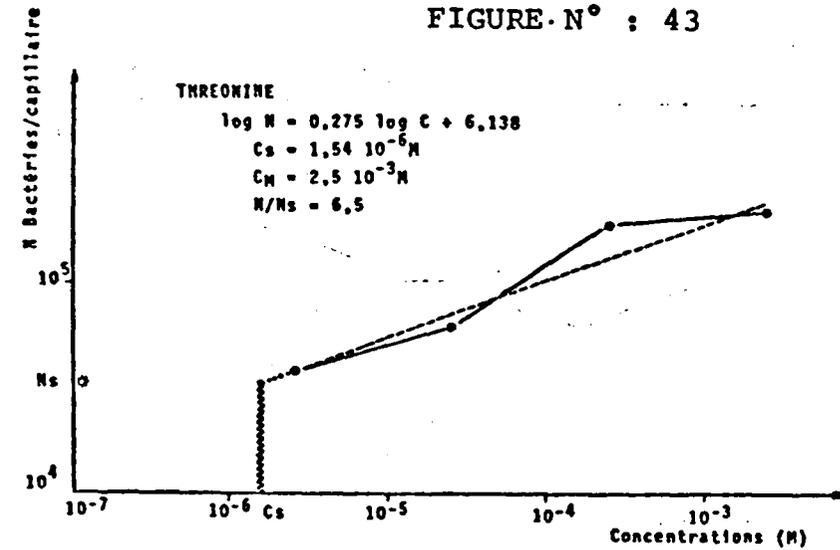


FIGURE N° : 44

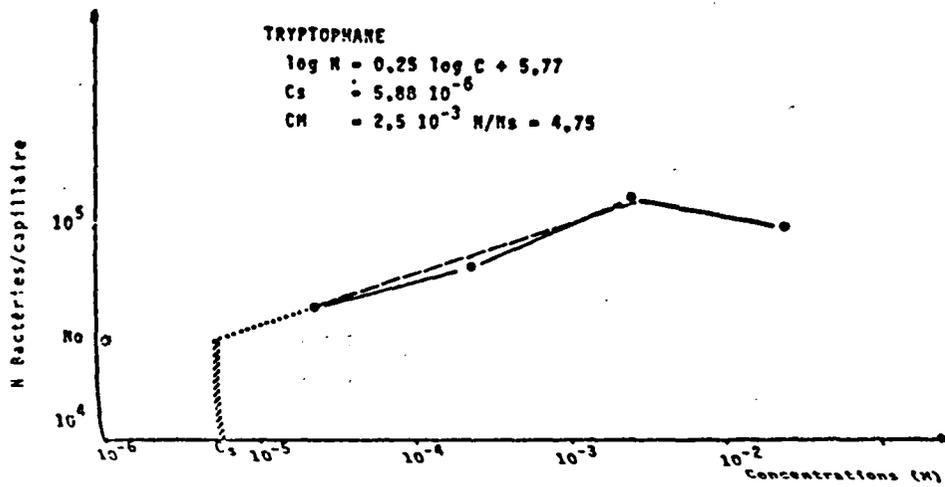


FIGURE N° : 45

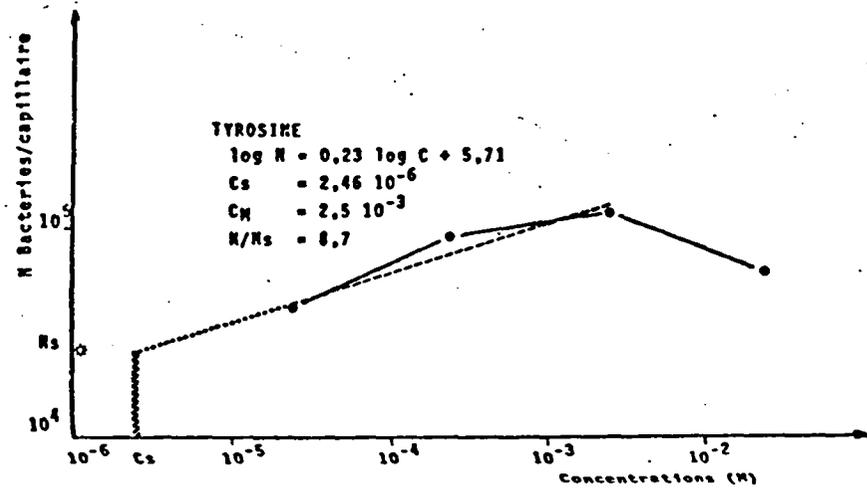


FIGURE N° : 46

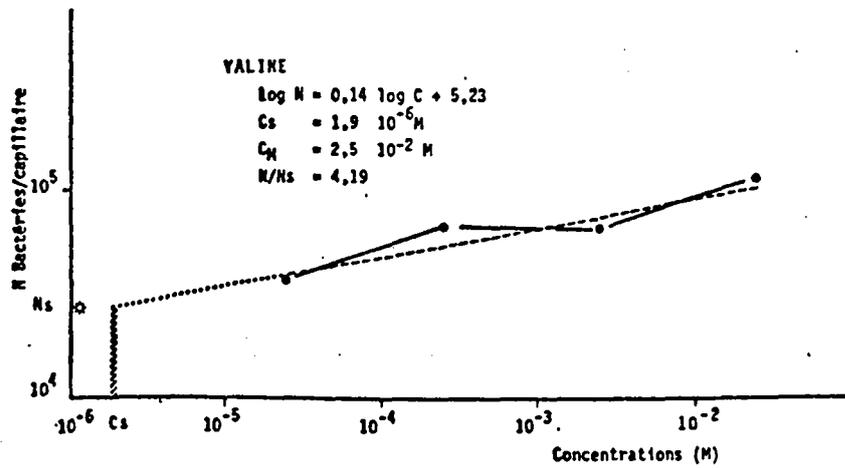
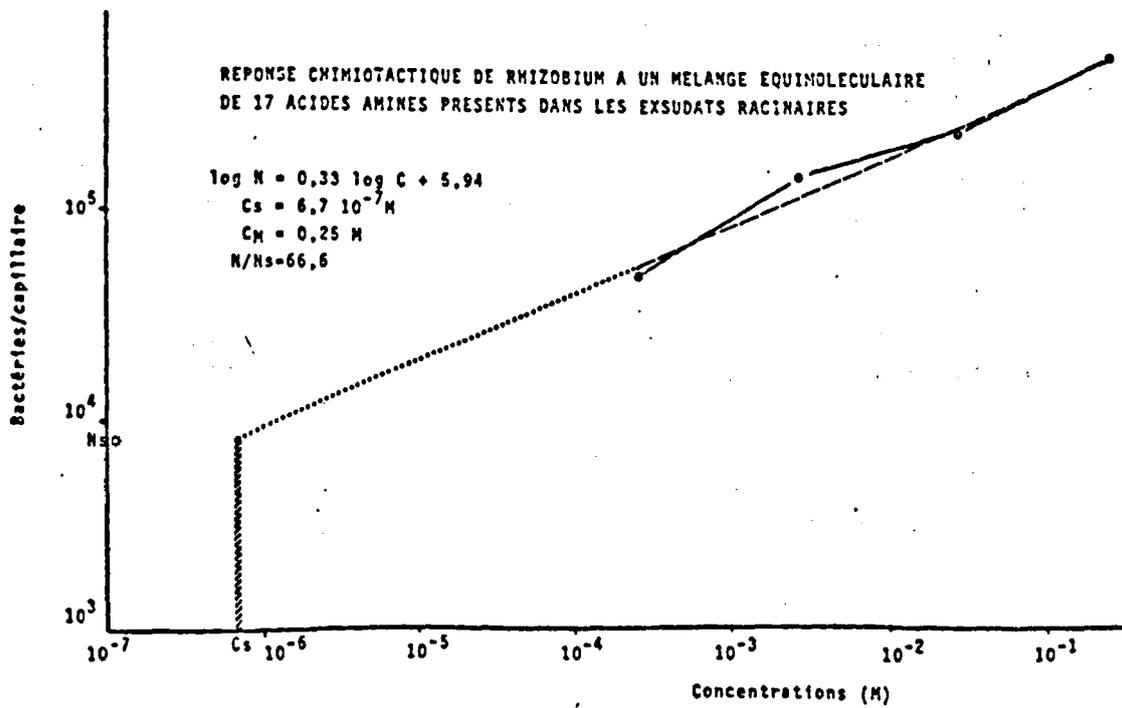


FIGURE N° : 47



NATURE	ACIDES AMINES	PENTE DE LA DROITE DE REGRESSION	C_s		OPTIMUM DE LA REPOSE			
			C_M	M	C_M	M	$F = N/N_s$	
NON POLAIRE	Alanine	0,15	1,7	10^{-6}	2,5	10^{-2}	4,38	
	Valine	0,14	1,9	10^{-6}	2,5	10^{-2}	4,19	
	Leucine	0,11	5,49	10^{-7}	2,5	10^{-2}	3	
	Méthionine	0,27	2,03	10^{-7}	2,5	10^{-4}	5,9	
	Phényl-alanine	0,23	2,5	10^{-7}	2,5	10^{-3}	4,6	
	Tryptophane	0,25	5,88	10^{-6}	2,5	10^{-3}	4,75	
	Proline	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
CHAINE LATÉRALE POLAIRE	non chargée	Glycocolle	0,165	1,23	10^{-7}	2,5	10^{-3}	8,6
		Sérine	0,28	6,7	10^{-7}	2,5	10^{-3}	8,6
		Thréonine	0,275	1,54	10^{-6}	2,5	10^{-3}	6,5
		Cystéine	0,276	7,50	10^{-7}	2,5	10^{-3}	9
		Tyrosine	0,23	2,46	10^{-6}	2,5	10^{-3}	4,7
		Asparagine	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	chargée	Glutamine	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Arginine	0,26	2,29	10^{-7}	2,5	10^{-3}	10,7
		Glutamique	0,16	5,62	10^{-7}	2,5	10^{-2}	5,88
		A. Aspartique	0,55	4,5	10^{-5}	2,5	10^{-2}	54
		Histidine	0,32	1,33	10^{-6}	2,5	10^{-3}	9,92
		Lysine	0,39	2,22	10^{-6}	2,5	10^{-3}	17,7
		Ornithine	0,205	1,2	10^{-7}	2,5	10^{-3}	7,5

TABLEAU III : PARAMETRES D'ACTIVITE CHIMIOTACTIQUE DES ACIDES AMINES



Une comparaison du comportement de Rhizobium avec celui d'autres bactéries telles que E. coli (92), Streptococcus (151), Salmonella (91), Pseudomonas (94), Bacillus (95) (115), suscite les remarques suivantes :

- la plupart des bactéries, y compris Rhizobium semblent attirées par des acides aminés à chaîne polaire non chargée ;

- cependant, Rhizobium et, curieusement, Salmonella marquent une nette "préférence" pour les acides aminés à chaîne polaire chargée alors que l'ensemble des autres bactéries sont plutôt sensibles à la présence d'acides aminés hydrophobes ;

- enfin, Rhizobium se singularise par le fait qu'aucun acide aminé testé ne présente d'activité répulsive (exercée en général par au moins un acide aminé).

III.5. COMMENTAIRES

A l'issue de ce tour d'horizon du comportement chimiotactique de Rhizobium en présence d'effecteurs simples, nous sommes amenée à faire un certain nombre de remarques d'ordre général.

La différence dans l'importance des réponses de Rhizobium (facteur F maximum pour l'aspartate = 54) par rapport à celle de E. coli par exemple (F = 450 également pour l'aspartate) peut surprendre. En fait, les études chimiotactiques se font en général sur des populations bactériennes "spécialement entraînées" par sélections successives de variants dont la réponse est exacerbée. Afin de nous rapprocher du comportement "naturel" d'une souche sauvage, nous avons tenu à travailler sur un matériel aussi peu modifié que possible, et cela peut expliquer la faible intensité des réponses chimiotactiques de Rhizobium.

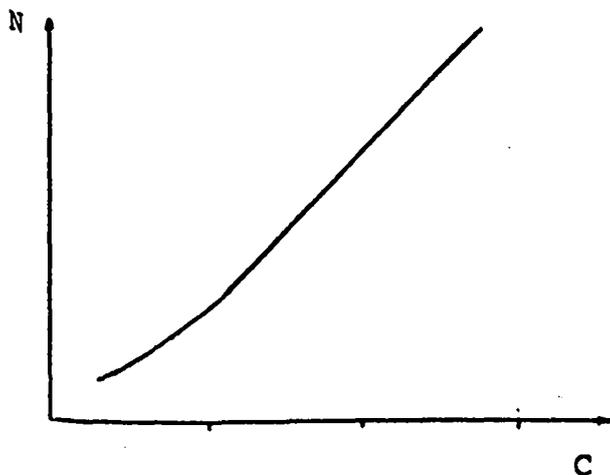
Mais il s'agit peut-être là d'une caractéristique du genre Rhizobium. En effet, nous avons constaté dans les travaux présentés par CURRIER et STROBEL (37, 38, 39), que les valeurs des réponses chimiotactiques sont également faibles (N/Ns de l'ordre de 20).

Nos résultats peuvent être comparés avec ceux rapportés de ces mêmes auteurs CURRIER et STROBEL (37, 38, 39). Ils ont testé l'action d'effecteurs simples (sucres, amino-acides) à la concentration de 10^{-3} M sur différentes souches de Rhizobium trifolii. Deux souches sur 13 présentent une réponse chimiotactique positive : l'une à quelques sucres (maltose - mannose - ribose), l'autre à l'aspartate (N/Ns = 9). Ils signalent, sans autres précisions que Rhizobium japonicum serait attiré par quelques sucres. Ces auteurs concluent que les bactéries du genre Rhizobium ne semblent pas répondre aux molécules simples, mais plutôt à des molécules de taille plus importante à l'image de la glycoprotéine qu'ils ont isolée d'exsudats racinaires. En ce qui concerne l'action des molécules complexes nous avons également constaté lors de la mise au point des techniques d'étude du chimiotactisme en milieu faiblement gélosé que la gélose (des disques témoins) exerce une attraction en relation avec la pureté de l'agar utilisé (63). Quant à l'action des effecteurs simples, les résultats que nous présentons ici ne peuvent nous amener à la conclusion que font CURRIER et STROBEL (37). Le gluconate (N/Ns = 24), l'acide aspartique (N/Ns = 54), pour ne citer que les exemples les plus marquants, présentent une activité chimiotactique irréfutable sur Rhizobium meliloti. De plus, GITTE et Coll. (61) - bien que leurs travaux concernent des effecteurs présents à faible concentration (10^{-6} M) dans des exsudats racinaires de Cicer arietinum - montrent que Rhizobium est attiré par des acides aminés et quelques oses.

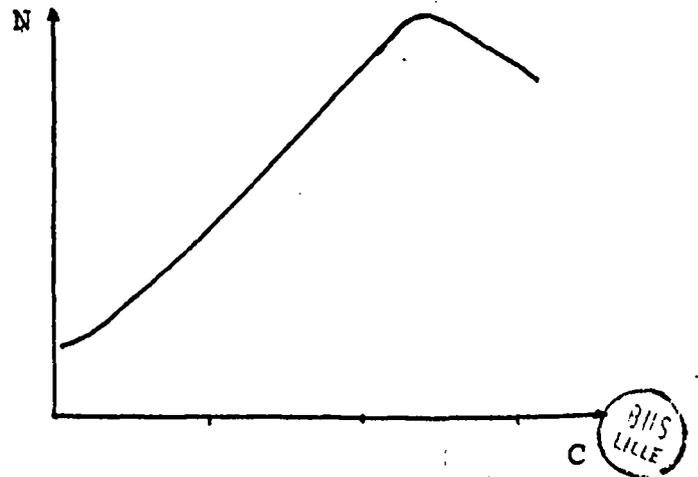
Même si l'intensité de réponse est plus faible que celle observée pour d'autres populations bactériennes, Rhizobium est sensible à l'activité chimiotactique de molécules simples.

L'évolution du nombre N en fonction des concentrations présente deux types de "morphologie".

Type 1



Type 2



Le déclin observé aux fortes concentrations sur la courbe de type n° 1 peut s'expliquer par :

- une augmentation de la concentration en impuretés qui exercent un effet répulsif qui ne se manifeste pas en $2 (3)$.

- une saturation des récepteurs bactériens concernés par les molécules effectrices : les bactéries sont alors de moins en moins sensibles au gradient de concentration. Par contre, pour les courbes de type 2, d'autres récepteurs (peut-être moins spécifiques) seraient sollicités aux fortes concentrations (93).

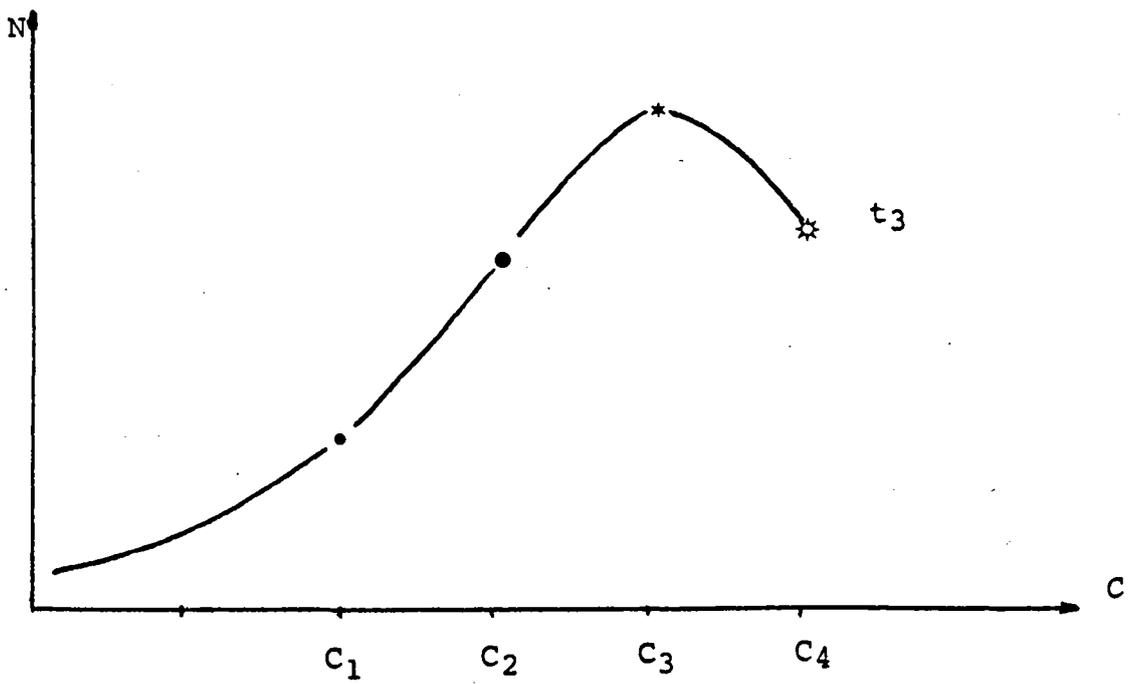
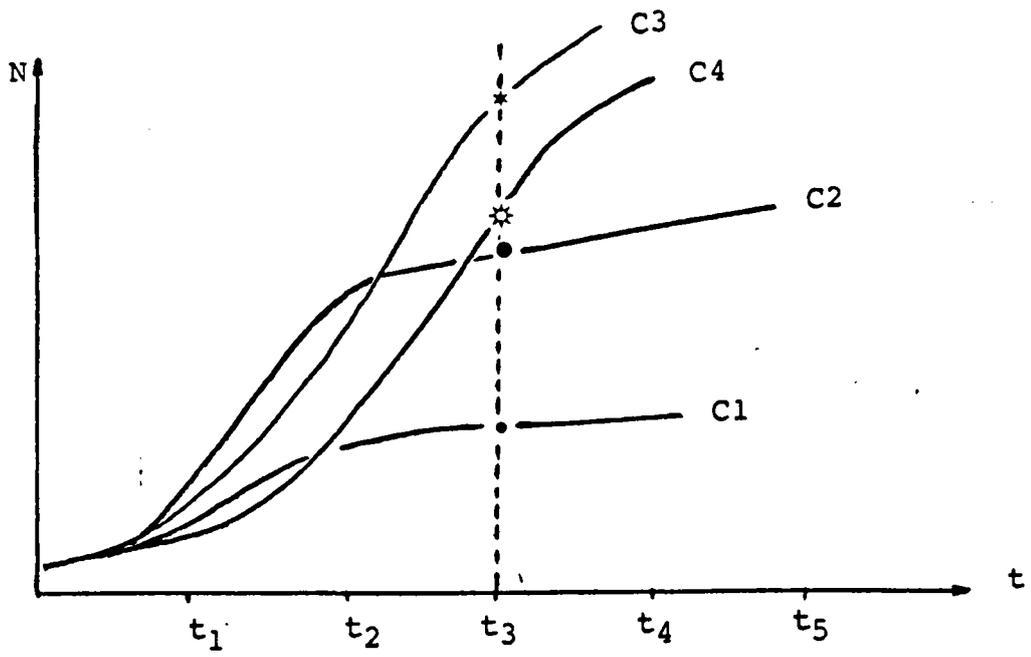


FIGURE N° : 48 SCHEMA EXPLICATIF DU DECLIN DE N AUX FORTES CONCENTRATIONS EN EFFECTEURS



- une vitesse de pénétration dans le capillaire diminuée aux fortes concentrations; diminution provoquée par l'encombrement consécutif à l'accumulation des bactéries à la lumière des capillaires (effet de foule) (FIGURE N° 48)(3) .

L'existence de ces types de réponse, outre l'importance qu'elle revêt en soi, explique que nous ayons fait figurer dans nos résultats et la pente de la droite de régression et les paramètres de la réponse à l'optimum, données qui pouvaient a priori paraître faire double emploi.

Parmi les substances étudiées, il semble que les acides aminés soient plus attractifs que les sucres. Si l'on veut aller plus avant dans la discrimination et le "classement" des effecteurs surgit le problème de la désignation du critère décisif de l'estimation de l'activité, de la puissance d'un composé attractif.

La notion de concentration seuil voit son importance diminuer lorsque l'on considère parallèlement les autres caractéristiques de la réponse chimiotactique. Ainsi, par exemple, pour le leucine, C_s est de l'ordre de 10^{-7} M-valeur relativement basse - par contre, la valeur de la pente, la valeur de C_M , celle de $F = N/N_s = 3$ ne permettent pas de qualifier la leucine de "chimiotactiquement puissante".

De même, considérer la pente ou le facteur F comme critères primordiaux amènerait à désigner l'acide aspartique, comme le meilleur effecteur puisque la pente (0,55) et le facteur F (54) ont les valeurs de loin les plus élevées.

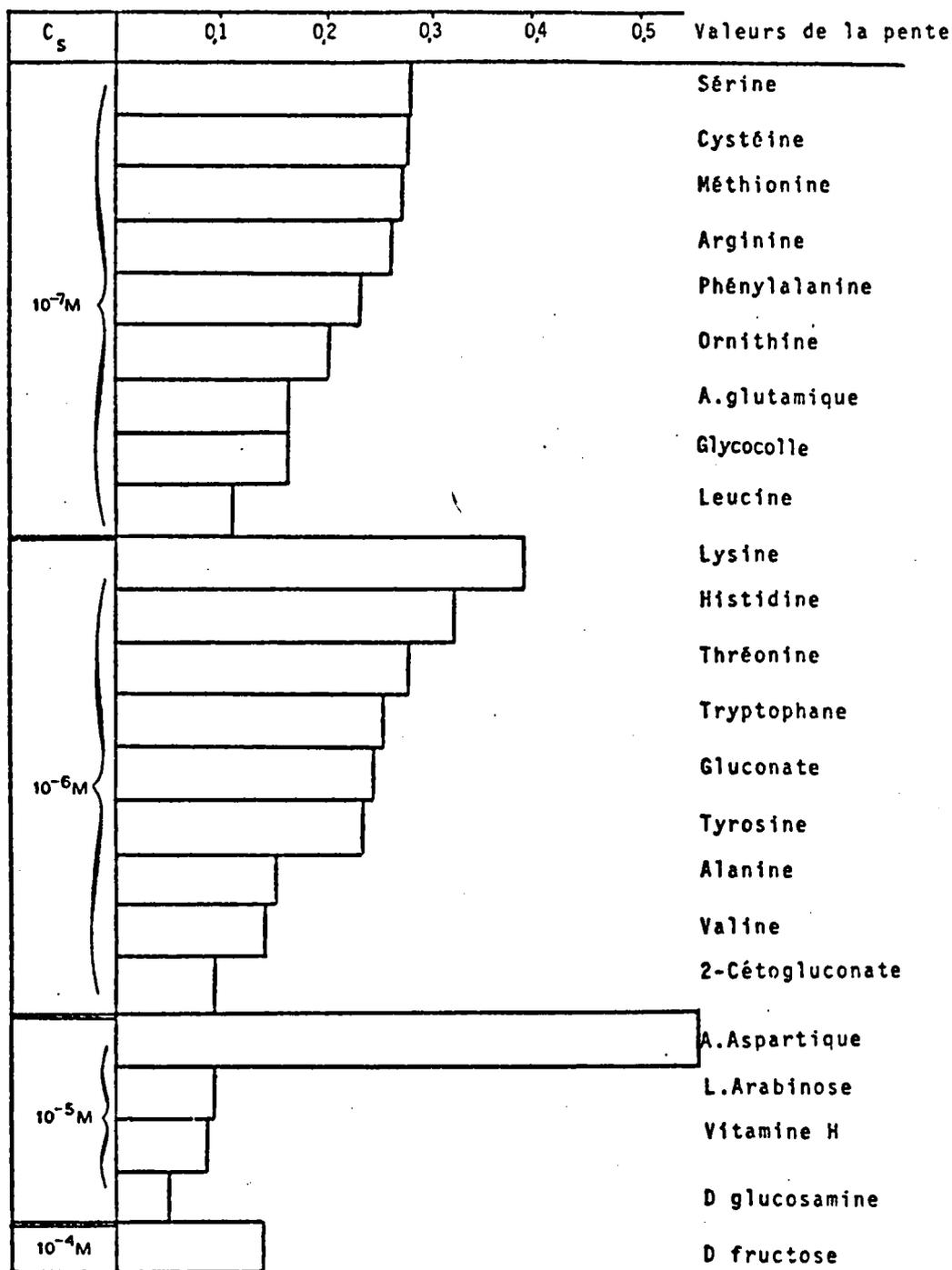


TABLEAU IV ESSAI DE CLASSIFICATION DES EFFECTEURS TESTES

Pourtant, cet acide aminé n'est détecté que lorsque sa concentration est relativement élevée (Cs : 10^{-5} M).

Il y a donc discordance entre une attitude fondamentaliste qui tendrait à accorder autant d'importance à chacune des caractéristiques de la réponse chimiotactique et une attitude à orientation plus pratique, plus appliquée, qui tend à considérer en premier lieu, la concentration seuil puis la pente. En effet, nous ne devons pas perdre de vue que l'environnement naturel de Rhizobium est le sol. Si les racines de légumineuses ont une activité chimiotactique par l'intermédiaire de substances excrétées dans le sol, les concentrations en effecteurs sont certainement très faibles et doivent pouvoir attirer un maximum de bactéries.

C'est en fonction de ces critères que nous proposons une classification des effecteurs étudiés (TABLEAU IV).

IV. COMPORTEMENT CHIMIOTACTIQUE DE RHIZOBIUM EN PRESENCE DE SUBSTANCES D'ORIGINE VEGETALE

Nous avons déjà montré que la souche Ve 26 présente une nette affinité chimiotactique pour les acides aminés.

Les exsudats racinaires de plantules de légumineuses contiennent un certain nombre de molécules parmi lesquelles des hormones, des vitamines, des sucres, des acides aminés

La complexité de composition des exsudats racinaires nous a conduit dans un premier temps, à l'étude de la réponse chimiotactique aux exsudats bruts de luzerne.

Nous avons tenté ensuite d'évaluer la part de responsabilité des acides aminés libres dans l'activité chimiotactique d'exsudats.

- - - - -

Les expériences de migration chimiotactique en capillaire sont faites ici en milieu NICOL et THORNTON (97) utilisé pour la culture des plantules de luzerne. Afin de nous assurer de l'existence de la réponse chimiotactique nous avons testé l'activité de la lysine en solution dans ce milieu N.T. (FIGURE 49). L'activité chimiotactique de la lysine est nette en milieu N.T. (elle semblerait même accen-

tuée, les valeurs de C_M et de C_S étant déplacées vers les faibles concentrations, mais le facteur F et la pente ont des valeurs moins importantes.

IV.I. REPOSE DE RHIZOBIUM AUX "EXSUDATS RACINAIRES"

Les techniques de préparation de ces exsudats ont été décrites dans le chapitre "Matériel et Méthodes", nous précisons ici les sigles employés :

période de végétation
E
nombre de plantules

ainsi E_{10}^{2-10} représente les exsudats provenant du séjour de 10 plantules, en milieu NT, couvrant une période de végétation allant du 2ème jour au 10ème jour.

A) Mise en évidence

Une première expérience de mise en évidence d'une réponse chimiotactique de Rhizobium a été réalisée avec des exsudats E_{10}^{2-10} .

Le nombre moyen de bactéries ayant pénétré dans les capillaires remplis de E_{10}^{2-10} est de $N = 5,6 (\pm 0,84) \cdot 10^4$ bactéries par capillaire alors que $N_s = 2,7 (\pm 0,75) \cdot 10^4$ bactéries par capillaire témoin.

Cette différence est très significative (risque inférieur à 10^{-3}).

EXSUDATS	E_{10}^{2-4}	E_{10}^{4-8}	E_{10}^{8-10}
F=N/Ns	2,52	1	1
TENEUR EN ACIDES AMINES*	$7,4 \cdot 10^{-6} M$	$1,57 \cdot 10^{-6} M$	$1,06 \cdot 10^{-6} M$

Va

EXSUDATS	E_{250}^{1-4}	E_{250}^{8-9}
F=N/Ns	23	5,35
TENEUR EN ACIDES AMINES*	$12,5 \cdot 10^{-4} M$	$1,18 \cdot 10^{-4} M$

Vb

EXSUDATS	E_{250}^{0-2}	E_{250}^{2-4}	E_{250}^{4-6}	E_{250}^{6-8}	E_{250}^{8-10}
F=N/Ns	8,37	17,8	17,5	18,8	8,6

Vc



TABLEAUX : V(a,b,c) ACTIVITE CHIMIOACTIQUE DE DIVERS TYPES D'EXSUDATS.

(* Teneur en acides aminés calculée à partir des données du TABLEAU VI)

B) Influence du nombre et de l'âge des plantules

Les TABLEAUX Va Vb Vc regroupent les résultats obtenus avec des exsudats différents par le nombre et l'âge des plantules qui ont servi à les préparer.

IV.II. DOSAGE DES ACIDES AMINES LIBRES DES EXSUDATS -
REPOSE DE RHIZOBIUM A DES MELANGES RECONSTITUES

A) Dosage des acides aminés libres

Les dosages ont été effectués sur E_{10}^{2-4} , E_{10}^{4-8} , E_{10}^{8-10} ainsi que sur E_{250}^{1-4} et E_{250}^{8-9} . Les résultats figurent au TABLEAU VI.

Les exsudats type E_{250} contiennent des quantités dosables de la plupart des acides aminés à l'exception de la cystéine et de la méthionine. On les retrouve en partie dans les exsudats E_{10} ; la teneur en amino-acides libre diminue en fonction de l'âge des plantules : après le 8ème jour il est difficile de les mettre en évidence.

B) Réponse de Rhizobium à des mélanges reconstitués

Nous avons reconstitué deux mélanges d'acides aminés libres présents dans les exsudats en respectant les proportions données par les résultats des dosages. Ces deux types de mélanges ont été choisis pour les valeurs élevées de F ; par analogie ils sont appelés ER_{250}^{1-4} et ER_{250}^{8-9} .

Les expériences de chimiotactisme conduisent aux résultats présentés au TABLEAU VII.

EXSUDATS ACIDES AMINES	E_{250}^{1-4}	E_{250}^{8-9}	E_{10}^{2-4}	E_{10}^{4-8}	E_{10}^{8-10}
	$10^{-4}M$	$10^{-4}M$	$10^{-6}M$	$10^{-6}M$	$10^{-6}M$
A. Asp.	1,26	0,09	0,76	0,35	0,19
Thr.	1,04	0,078	0,41	0	0
Ser.	2,94	0,15	0,96	0,50	0,38
H. Ser.	0,19	0,016	0	0	0
Glu.	1,32	0,097	0,65	0,48	traces
Pro.	0,57	0,07	0	0	0
Gly.	0,46	0,064	0,51	0,48	0,30
Ala.	1,19	0,07	0,46	traces	traces
Cys.	traces	traces	0	0	0
Val.	0,58	0,078	traces	0	0
Ile	0,38	0,048	0,25	0	0
Leu.	0,40	0,048	0,50	0	0
Tyr.	0,34	0,085	0,60	traces	traces
Phé.	0,12	0,082	0,62	traces	0
His.	0,12	0,033	traces	0	traces
Lys.	0,31	0,07	0,76	0,24	0,19
Orn.	0,96	0,09	0,60	traces	traces
Arg.	0,37	0,016	0,38	0	0
Met.	traces	traces	traces	traces	traces



TABEAU VI : COMPOSITION EN ACIDES AMINES LIBRES DES DIVERS
" EXSUDATS RACINAIRES " DE LEGUMINEUSES.

MELANGES RECONSTITUES	ER ₂₅₀ ¹⁻⁴	ER ₂₅₀ ⁸⁻⁹
F=N/Ns	14,9 (23)	4,7 (5,35)
TENEUR EN ACIDES AMINES	12,5.10 ⁻⁴ M	1,18.10 ⁻⁴ M

TABLEAU VII ACTIVITE CHIMIOTACTIQUE DES MELANGES RECONSTITUES.

(Valeurs de F correspondant aux exsudats "naturels")

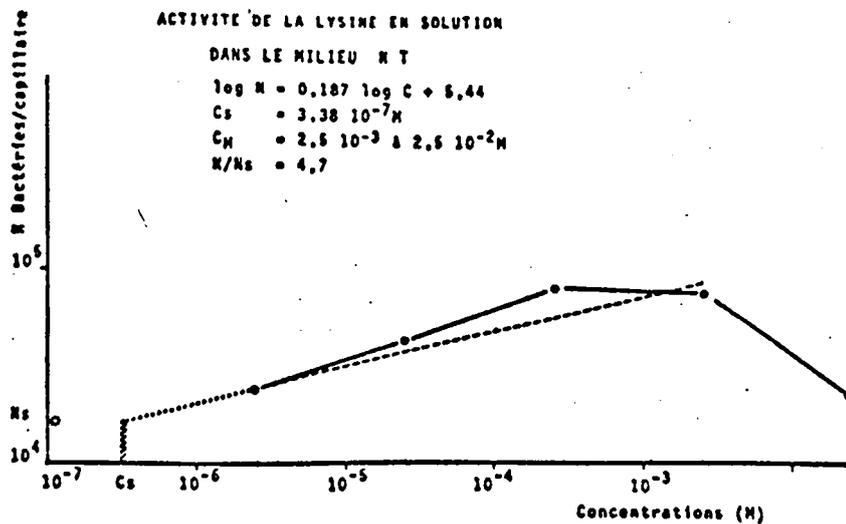


FIGURE N° : 49 ACTIVITE DE LA LYSINE EN SOLUTION
DANS LE MILIEU N T

IV.3. COMMENTAIRES

Les exsudats racinaires de luzerne exercent, dans nos conditions expérimentales, une activité chimiotactique positive sur Rhizobium meliloti Ve 26.

Les valeurs de F pour les exsudats E_{10}^{2-10} et celles obtenues par GITTE et Coll. (61) sur un autre couple symbiotique, Rhizobium sp.- Cicer arietinum, sont comparables.

L'intensité de la réponse de Rhizobium est fonction du nombre de plantules considérées certainement du fait de la concentration en substances excrétées par les racines (TABLEAU V)

L'âge des plantules, à partir desquelles sont préparés les exsudats, influe également sur l'activité chimiotactique de ces derniers sur la bactérie : la réponse est maximale du 4ème au 8ème jour, période généralement conseillée pour l'inoculation des plantules (TABLEAU Va). La comparaison des activités de E_{10}^{2-4} (F = 2,52), E_{10}^{4-8} (F = 1) avec celle de E_{10}^{2-10} (F = 2) montre une perte d'activité qui suggère que le potentiel des substances chimiotactiquement actives est modifié dans sa teneur globale et/ou dans sa composition relative, au cours du temps.

La plupart des acides aminés sont représentés dans les exsudats. Les teneurs sont fonction du nombre et de l'âge des plantules concernées : après le 8ème jour, pour des exsudats type E_{10} , seuls quatre amino-acides sont dosables. Les valeurs des concentrations globales sont voisines de celles citées par GITTE et Coll. (61). La composition relative, par contre, est sensiblement différente ; cette différen-

ce est certainement spécifique : le composant majeur dans les exsudats de Cicer arietinum est l'histidine alors que la sérine prédomine dans ceux de Medicago sativa.

Les résultats des expériences de chimiotactisme réalisées avec des reconstitutions de mélanges d'acides aminés (TABLEAU VII) comparés à ceux obtenus avec les exsudats "naturels" correspondants font apparaître le rôle prépondérant des acides aminés libres présents dans les exsudats. GITTE et ses collaborateurs font le même constat alors que le protocole expérimental est différent.(61).

Nous ne retrouvons que 65 % à 88 % de l'activité totale : il est donc très probable que d'autres constituants de l'extrait végétal soient concernés.



.....

DISCUSSION GENERALE

CONCLUSION

.....



La souche de Rhizobium meliloti Ve 26 est mobile et présente une fonction chimiotactique. Les conditions d'une expression optimale de sa mobilité et de la fonction chimiotactique ont été précisées.

Ce premier aspect de notre travail a permis l'étude du comportement chimiotactique de Rhizobium meliloti Ve 26 en présence de molécules effectrices simples. Nous avons pu montrer que l'intensité de la réponse n'est pas expressément liée à la valeur nutritive ou à la nocivité de la substance concernée. Dans nos conditions expérimentales, les acides aminés et surtout ceux à chaîne polaire, sont le groupe biochimique qui présente la meilleure activité attractrice.

Ce dernier fait est d'autant plus intéressant que les plantules de luzerne libèrent dans le milieu de culture des acides aminés qui jouent un rôle certain dans l'activité chimiotactique des exsudats. Qu'en est-il de l'amalgame symbiose-activité chimiotactique d'exsudats de légumineuse et amino-acides constitutifs ? Il semble hors de doute (12, 96) que la mobilité et le chimiotactisme ne sont pas nécessaires à la réalisation d'une symbiose Rhizobium-légumineuse efficace (bien qu'à la meilleure période d'inoculation corresponde une activité chimiotactique maximale). Nous avons nous-même pu constater que la souche 2011 Str₃, immobile dans nos conditions expérimentales, présente une activité nodulante normale.

Cependant le fait que Rhizobium soit mobile et doté d'une fonction chimiotactique assure certainement au genre un atout majeur dans les phénomènes de compétition se développant dans le sol.

En établissant un protocole expérimental en champ à l'aide de bactéries repérables phénotypiquement, nous saurons mieux cerner l'importance du phénomène chimiotactique.

CURRIER et STROBEL 37, 38, 39, ont identifié dans les exsudats racinaires d'une légumineuse (le Lotier) une glycoprotéine à activité chimiotactique positive mais de faible spécificité. Il est possible que la différence que nous observons entre les réponses aux exsudats "naturels" et celles aux fractions acides aminés libres reconstituées soit due à cette glycoprotéine.

Il a été montré que le rôle des lectines dans l'adsorption bactérienne n'était pas aussi spécifique que l'on osait l'espérer (134). Ceci a suscité des travaux (38) sur les relations pouvant s'instaurer entre lectines et activité chimiotactique bactérienne. Mais les résultats ne sont pas concluants : la concanavaline A n'attire pas Rhizobium.

Divers types d'étude doivent être réalisés précisant d'une part le rôle des constituants des exsudats et permettant d'autre part une comparaison des comportements chimiotactiques des autres espèces de Rhizobium. Il deviendra alors possible de situer au sein de la symbiose Rhizobium-légumineuse le chimiotactisme.

.....

B I B L I O G R A P H I E

.....



- 1 ADLER (J.), 1966.
Chemotaxis in Bacteria.
Science, 153, 708-716.
- 2 ADLER (J.), 1969.
Chemoreceptors in Bacteria.
Science, 166, 1588-1597.
- 3 ADLER (J.), 1973.
A method for measuring chemotaxis and use of the method
to determine optimum conditions for chemotaxis by E.coli
J.Gen.Microbiol., 74, 77-91.
- 4 ADLER (J.), 1975.
Chemotaxis in Bacteria.
Annu.Rev.Biochem., 44, 341-356.
- 5 ADLER (J.); DAHL (M.M.), 1967.
A method for measuring the motility of bacteria and for
comparing random and non random motility.
J.Gen.Microbiol., 46, 161-173.
- 6 ADLER (J.); EPSTEIN (W.), 1974.
Phosphotransferase-system enzymes as chemoreceptors for
certain sugars in E.coli chemotaxis.
Proc.Natl.Acad.Sc.U.S., 71 (7), 2895-2899.
- 7 ADLER (J.); GOY (M.F.); SPRINGER (M.S.); SZMELCMAN (S.), 1979.
On the mechanism of sensory transduction in bacterial
chemotaxis-Membrane transduction mechanisms.
CONE (R.A.); DOWLING (J.E.); Ed., Raven Press, New-York.
- 8 ADLER (J.); HAZELBAUER (G.L.); DAHL (M.M.), 1973.
Chemotaxis toward sugars in E.coli.
J.Bacteriol., 115 (3), 824-847.

- 9 ADLER (J.); TSO (W.W.), 1974.
Decision-making in bacteria: Chemotactic response of E.coli to conflicting stimuli.
Science, 184 (4143), 1292-1294.
- 10 AKSAMIT (R.R.); KOSHLAND (D.E.Jr), 1972.
A ribose binding protein of S.typhimurium.
Biochem.Biophys.Res.Communic., 48 (6), 1348-1353.
- 11 AKSAMIT (R.R.); KOSHLAND (D.E.Jr), 1974.
Identification of the ribose binding protein as the receptor for ribose chemotaxis in S.typhimurium.
Biochemistry, 13, 4473-4478.
- 12 AMES (P.); SCHLUEDERBERG (S.A.); BERGMAN (K.), 1980.
Behavioral mutants of R.meliloti.
J.Bacteriol., 141 (2), 722-727.
- 13 ARMSTRONG (J.B.), 1972.
An S.adenosylmethionine requirement for chemotaxis in E.coli.
Can.J.Microbiol., 18, 1695-1701.
- 14 ARMSTRONG (J.B.); ADLER (J.), 1969.
Complementation of non chemotactic mutants of E.coli.
Genetics, 61, 61-66.
- 15 ARMSTRONG (J.B.); ADLER (J.); DAHL (M.M.), 1967.
Non chemotactic mutants of E.coli.
J.Bacteriol., 93, 390-398.
- 16 ASWAD (D.); KOSHLAND (D.E.Jr); 1974.
Role of methionine in bacterial chemotaxis.
J.Bacteriol., 118 (2), 640-645.

- 17 ASWAD (D.); KOSHLAND (D.E.Jr), 1975.
Evidence for an S.A. Me requirement in the chemotactic behavior of S.typhimurium.
J.Molec.Biol., 97 (2), 207-223.
- 18 ASWAD (D.); KOSHLAND (D.E.Jr), 1975.
Isolation, characterization and complementation of S.typhimurium chemotaxis mutants.
J.Molec.Biol., 97 (2), 225-235.
- 19 BALDWIN (I.L.); FRED (E.B.); HASTINGS (E.G.), 1927.
Grouping of legumes according to biological reactions of their seed proteins. Possible explanation of the phenomenon of cross inoculation.
Botanical Gazette, 83, 217-243.
- 20 BAUER (W.D.), 1977.
Lectins as determinants of specificity in legume Rhizobium symbiosis.
Genetic Engineering for Nitrogen Fixation, HOLLAENDER (A) Ed., Plenum Press (N.Y.), 283-297.
- 21 BECHET (M.); GUILLAUME (J.B.), 1978.
Mise en évidence d'A.D.N. extrachromosomique chez R.meliloti.
Can.J.Microbiol., 24, 960-966.
- 22 BERG (H.C.), 1971.
How to track bacteria.
Rev.Sci.Instrum., 42, 868-871.
- 23 BERG (H.C.), 1975.
Bacterial behaviour.
Nature, 254. (5499), 389-392.
- 24 BERG (H.C.), 1975.
Chemotaxis in bacteria.
Annu.Rev.Biophys.Bioengng., 4, 119-136.

- 25 BERG (H.C.); ANDERSON (R.A.), 1973.
Bacteria swim by rotating their flagellar filaments.
Nature, 245, 380-382.
- 26 BERG (H.C.); BROWN (D.A.), 1972.
Chemotaxis in E.coli analyzed by three-dimensional tracking.
Nature, 239, 500-504.
- 27 BERINGER (J.E.), 1974.
R.factor transfer in R.leguminosarum.
J.Gen.Microbiol., 84, 188-198.
- 28 BLONDEAU (R.), 1972.
Contribution à l'étude des interactions plantes-bactéries au niveau de la rhizosphère.
Thèse de Doctorat d'Etat (n° 251), Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 29 BOHLOOL (B.B.); SCHMIDT (E.L.), 1974.
Lectins: a possible basis for specificity in the Rizobium-legume root symbiosis.
Science, 185, 269-271.
- 30 BOOS (W.), 1969.
The galactose binding protein and its relationship to the β -Methylgalactoside permease from E.coli.
Eur.J.Biochem., 10, 66-73.
- 31 BOOS (W.); GORDON (A.S.); HALL (R.E.); PRICE (D.); 1972.
Transport properties of the galactose-binding protein^e of E.coli-substrate-induced conformation change.
J.Biol.Chem., 247, 917-924.
- 32 BOULTER (D.); JEREMY (J.J.); WILDING (M.), 1966.
Aminoacids liberated into the culture medium by pea seedling root.
Plant and Soil, 24, 121-127.

- 33 BRILL (W.J.), 1979.
Nitrogen fixation.
The Bacteria, VII, A Treatise on Structure and Function,
85-109.
- 34 BROUGHTON (W.J.), 1978.
Control of specificity in legume-Rhizobium associations.
J. Appl. Bacteriol., 45 (2), 164-194.
- 35 BROWN (D.A.); BERG (H.C.), 1974.
Temporal stimulation of chemotaxis in E. coli.
Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 71 (4), 1388-1392.
- 36 CHET (I.); MITCHELL (R.), 1976.
The relationship between chemical structure of attractants and chemotaxis by a marine bacterium.
Can. J. Microbiol., 22 (8), 1206-1208.
- 37 CURRIER (W.W.); STROBEL (G.A.), 1976.
Chemotaxis of Rhizobium spp. to plant root exudates.
Plant Physiol., 57 (5), 820-823.
- 38 CURRIER (W.W.); STROEBEL (G.A.), 1977.
Chemotaxis of Rhizobium spp. to a glycoprotein produced by birdsfoot trefoil roots.
Science, 196 (4288), 434-436.
- 39 CURRIER (W.W.); STROBEL (G.A.), 1977.
The chemotactic behavior of trefoil Rhizobium.
F.E.M.S. Microbiol. Letters, 1 (5), 243-246.
- 40 DAHLQUIST (F.W.); LOVELY (P.S.); KOSHLAND (D.E. Jr), 1972.
Quantitative analysis of bacterial migration in chemotaxis.
Nature, 236, 120-123.

- 41 DART (P.J.), 1971.
Scanning electron microscopy of plant roots.
J. of Experimental Botany, 22, 163-168.
- 42 DART (P.J.), 1974.
Development of root-nodule symbiosis. I- The infection process.
The Biology of Nitrogen Fixation, Amsterdam: North-Holland Publishing Company. QUISPEL (A.), Ed., 381-429.
- 43 DART (P.J.), 1977.
Infection and development of leguminous nodules.
Treatise on Dinitrogen Fixation- Section III. Biology.
HARDY (R.W.S.); SILVER (W.S.), Ed., 367-472.
- 44 DAZZO (F.B.); BRILL (W.J.), 1977.
Receptor site on clover and alfalfa roots for Rhizobium.
Appl. and Environm. Microbiol., 33, 132-136.
- 45 DAZZO (F.B.); HUBBELL (D.M.), 1975.
Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the Rhizobium-clover association.
Appl. Microbiol., 30 (6), 1017-1033.
- 46 DAZZO (F.B.); NAPOLI (C.A.); HUBBELL (D.H.), 1976.
Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the Rhizobium-clover symbiosis.
Appl. and Environm. Microbiol., 32 (1), 166-171.
- 47 DAZZO (F.B.); YANKE (W.E.); BRILL (W.J.), 1978.
Trifoliin: A Rhizobium recognition protein from white clover.
B.B.A., 539 (3), 276-286.

- 48 DEGENHARDT (T.L.);LARUE (T.A.);PAUL (E.A.),1976.
Investigation of a non nodulating cultivar of Pisum sativarum.
Canadian Journal of Botany,54,1633-1636.
- 49 DELATTRE (J.M.),1971.
Introduction à une étude génétique du genre Rhizobium.
Thèse de Docteur Ingénieur,Université des Sciences et
Techniques de Lille.
- 50 DENARIE (J.);TRUCHET (G.),1976.
Genetics of Rhizobium:a short survey.
Proceedings of the First International on Nitrogen
Fixation.NEWTON (W.E.);NYMAN (C.J.),Ed.,Pullman,
Washington,343-357.
- 51 DENARIE (J.);TRUCHET (G.),1979.
Symbiose Rhizobium-legumineuses:rôles respectifs des
partenaires.
Physiologie Végétale,17 (4),643-667.
- 52 DE PAMPHILIS (M.L.);ADLER (J.),1971.
Purification of intact flagella from E.coli and
B.subtilis.
J. Bacteriol.,105,376-383.
- 53 DE PAMPHILIS (M.L.);ADLER (J.),1971.
Fine structure and isolation of the hook-basal body
complex of flagella from E.coli and B.subtilis.
J. Bacteriol.,105,384-395.
- 54 DE PAMPHILIS (M.L.);ADLER (J.),1971.
Attachment of flagellar basal bodies to the cell
enveloppe:specific attachment to the outer lipopolysac-
charide membrane and the cytoplasmic membrane.
J. Bacteriol.,105,396-407.

- 55 DIXON (R.O.D.), 1969.
Rhizobia (with particular reference to host plants).
Annual Review of Microbiologie, 23, 137-158.
- 56 ENGELMANN (T.W.), 1881.
Zur Biologie der Schizomyceten.
Arch. Gesamte Physiol. Pfluger's, 26, 537-545.
- 57 FRERE (J.M.), 1977.
Bacterial tumble regulator may be inactivated by
methylation.
Nature, 266 (5599), 261-262.
- 58 FRERE (J.M.), 1977.
La chimiotaxie chez les bactéries.
Bull. Inst. Pasteur, 75 (2), 187-203.
- 59 FRIEDEN (C.), 1970.
Kinetic aspects of regulation of metabolic process :
the hysteretic enzyme concept.
J. Biol. Chem., 245, 5788-5799.
- 60 GIBBINS (A.M.); GREGORY (K.F.), 1972.
Relatedness among Rhizobium and Agrobacterium species
determined by three methods of nucleic acid hybridizationⁿ
J. Bacteriol., 111, 129-141.
- 61 GITTE (R.R.); RAI (P.V.); PATIL (R.B.), 1978.
Chemotaxis of Rhizobium sp. towards root exudates of
Cicer arietinum.
Plant and Soil, 50, 553-566.
- 62 GRAHM (P.K.), 1963.
Vitamin requirements of root nodule bacteria.
J. Gen. Microbiol., 30, 245-248.

- 63 GUEU (V.), 1980.
Le chimiotactisme chez R.meliloti :Méthode d'étude en milieu gélifié.
Mémoire de D.E.A. "Amélioration des Productions Végétales et Microbiennes", Université des Sciences et Techniques de Lille.
- 64 HARDY (R.W.P.); HAVELKA (U.D.); 1975.
Nitrogen fixation research: a key to world food.
Science, 188, 633-643.
- 65 HARDY (R.W.F.); SILVER (W.S.), Ed., 1977.
A Treatise on Dinitrogen Fixation. Section III. John Wileys and Sons, N.Y.
- 66 HAZELBAUER (G.L.), 1975.
Maltose chemoreceptor of E.coli.
J. Bacteriol., 122 (1), 206-214.
- 67 HAZELBAUER (G.L.); ADLER (J.), 1971.
Role of the binding protein in chemotaxis of E.coli toward galactose.
Nature, 230, 101-104.
- 68 HOLL (F.B.), 1975.
Host plant control of the inheritance of dinitrogen fixation in the pismus-Rhizobium symbiosis.
Euphitica, 24, 767-770.
- 69 HOLL (F.B.); LARUE (T.A.), 1976.
Genetics of legume plant hosts.
Proceedings of First International Symposium on Nitrogen Fixation. NEWTON (W.E.); NYMAN (C.J.), Ed.; Pullman, Washington: Washington State University Press., 391-399.
- ⁶⁹_b HORNEZ (J.P.); COURTOIS (B.); DERIEUX (J.C.), 1976.
Mise en évidence de voies de métabolisme différent à partir du glucose ou du fructose chez Rhizobium.
C. R. Acad. Sc. Paris, 283, 1559-1562.

70 HUXLEY (H.E.) ; ZUBAY (G.), 1960.

Electron microscope observations on the structure of microsomales particules from E. coli
J. Molec. Biol., 2, 10-18.

71 ISWARAN (V.); SEN (A.); APTE (R.), 1973.

A simple medium for quick growth of R. japonicum.
Zbl. Bakt., 128 (5), 23-24.

72 JOHNSTON (A.W.B.); BEYNON (J.L.); BUCHAN-WOLLASTON (A.V.);
SETCHELL (S.M.); HIRSCH (P.R.); BERINGER (J.E.), 1978.

High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of Rhizobium.
Nature, 276, 634-636.

73 JONES (D.G.); RUSSEL (P.E.), 1972.

The application of immunofluorescence techniques to host plant bacteria selectivity experiments using Trifolium repens.
Soil Biology and Biochemistry, 4, 277-282.

74 KELLERMAN (O.) SZMELCMAN (S.), 1974.

Active transport of maltose in E. coli K12. Involvement of a periplasmic maltose binding protein.
Eur. J. Biochem., 47, 139-149.

75 KORT (E.N.); GOY (M.F.); LARSEN (S.H.); ADLER (J.), 1975.

Methylation of a membrane protein involved in bacterial chemotaxis.
Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 72 (10), 3939-3943.

76 KOSHLAND (D.E. Jr), 1974.

Chemotaxis as a model for sensory systems.
F.E.B.S. Letters, 40 (Suppl.), 3-9.

- 77 KOSHLAND (D.E.Jr), 1977.
 Sensory response in bacteria.
 Advances in neurochemistry. AGRANOFF (B.W.); APRISON (M.H.);
 Ed. Plenum Press. New-York, 2, 277-341.
- 78 KOSHLAND (D.E.Jr), 1979.
 Bacterial chemotaxis.
 The bacteria; VII, A Treatise of Structure and Function,
 111-166.
- 79 KUNDIG (W.); ROSEMAN (S.), 1971.
 Sugar transport. I- Isolation of the phosphotransferase
 system from E.coli.
 J. Biol. Chem., 246, 1393-1406.
- 80 KUNDIG (W.); ROSEMAN (S.), 1971.
 Sugar transport. II- Characterization of constitutive
 membrane-bound enzymes II of the E.coli phosphotrans-
 ferase system.
 J. Biol. Chem., 246, 1407-1417.
- 81 LAIRD (D.J.), 1932.
 Bacteriophage and the root nodule bacteria.
 Arch. Microbiol., 3, 159-193.
- 82 LAMARRE (A.G.); STRALEY (S.C.); CONTI (S.F.), 1977.
 Chemotaxis towards amino-acids by Bdellovibrio bacte-
riovorus.
 J. Bacteriol., 131 (1), 201-207.
- 83 LARSEN (S.H.); READER (R.W.); KORT (E.N.); TSO (W.W.); ADLER (J.),
 1974.
 Change in direction of flagellar rotation is the basis
 of the chemotactic response in E.coli.
 Nature, 249 (5452), 74-77.

- 84 LOVELY (P.); DAHLQUIST (F.W.); MACNAB (R.M.);
KOSHLAND (D.E.Jr), 1974.
An instrument for recording the motions of micro-organisms in chemical gradients.
Rev. Sci. Instrum., 45 (5), 683-686.
- 85 MACNAB (R.M.), 1978.
Bacterial motility and chemotaxis: the molecular biology of a behavioral system.
Criti. Rev. in Biochemistry, 5 (4), 291-341.
- 86 MACNAB (R.M.); KOSHLAND (D.E.Jr), 1972.
The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis.
Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 69 (9), 2509-2512.
- 87 MACNAB (R.M.); KOSHLAND (D.E.Jr), 1973.
Persistence as a concept in the motility of chemotactic bacteria.
J. Mecanochem. Cell. Motil., 2 (3), 141-148.
- 88 MACNAB (R.M.); KOSHLAND (D.E.Jr), 1974.
Bacterial motility and chemotaxis. Light-induced tumbling response and visualization of individual flagella.
J. Molec. Biol., 84 (3), 399-406.
- 89 MAIER (R.J.); BRILL (W.J.), 1978.
Involvement of R. japonicum O antigen in soybean nodulation.
J. Bacteriol., 133, 1295-1299.
- 90 MAYFIELD (C.I.); INNISS (W.E.), 1977.
A rapid, simple, method for staining bacterial flagella.
Can. J. Microbiol., 23, 1311-1313.

- 91 MELTON (T.); HARTMAN (P.E.); STRATIS (J.P.); LEE (T.L.);
DAVIS (A.T.), 1978.
Chemotaxis of S. typhimurium to aminoacids and some
sugars.
J. Bacteriol., 133 (2), 708-716.
- 92 MESIBOV (R.); ADLER (J.), 1972.
Chemotaxis towards aminoacids in E. coli.
J. Bacteriol., 112 (1), 315-326.
- 93 MESIBOV (R.); ORDAL (J.); ADLER (J.), 1973.
The range of attractant concentrations for bacterial
chemotaxis and the threshold and size of response over
the range.
J. Gen. Physiol., 62, 203-223.
- 94 MOENCH (T.T.); KONETZKA (W.A.), 1978.
Chemotaxis in Pseudomonas aeruginosa.
J. Bacteriol., 133 (1), 427-429.
- 95 MOULTON (R.C.); MONTIE (T.C.), 1979.
Chemotaxis by Pseudomonas aeruginosa.
J. Bacteriol., 137 (1), 274-280.
- 96 NAPOLI (C.); ALBERSHEIM (P.), 1980.
Infection and nodulation of clover by nonmotile
R. trifolii.
J. Bacteriol., 141 (2), 979-980.
- 97 NICOL (L.H.); THORNTON (H.G.), 1941.
Competition between related strains of nodule bacteria
and its influence on infection of the legume host.
Proc. Roy. Soc., B 130, 32-59.
- 98 NORRIS (D.O.), 1956.
Legumes and the Rhizobium symbiosis.
Empire Journal of Experimental Agriculture, 24, 247-270.

- 99 NUTMAN (P.S.), 1946.
Genetic factors concerned in the symbiosis of clover
and nodule bacteria.
Nature, 157, 463-465.
- 100 NUTMAN (P.S.), 1952.
Host factors influencing infection and nodule develop-
ment in leguminous plants.
Proc. Roy. Soc., B 139, 176-185.
- 101 NUTMAN (P.S.), 1954.
Symbiotic effectiveness in nodulated red clover.
I- Variation in host and bacteria.
Heredity, 8, 35-46.
- 102 NUTMAN (P.S.), 1954.
Symbiotic effectiveness in nodulated red clover.
II- A major gene for ineffectiveness in the host.
Heredity, 8, 47-60.
- 103 NUTMAN (P.S.), 1956.
The influence of the legume in root-nodule symbiosis.
A comparative study of determinants and functions.
Biological Reviews, 31, 109-151.
- 104 NUTMAN (P.S.), 1959.
Some observations on root-hair infection by nodule
bacteria.
Journal of Experimental Botany, 10, 250-263.
- 105 NUTMAN (P.S.), 1959.
Sources of incompatibility affecting nitrogen fixation
in legume symbiosis.
Utilization of Nitrogen and its compounds by plants.
PORTER (H.K.), Ed. Thirteen Symposium of the Society
for Experimental Biology. Cambridge: Cambridge University
Press, 42-58.

106 NUTMAN (P.S.), 1962.

The relation between root-hair infection by Rhizobium and nodulation in Trifolium and Vicia.
Proc. Roy. Soc., B 156, 122-137.

107 NUTMAN (P.S.), 1963.

Factors influencing the balance of mutual advantages in legume symbiosis.

Symbiotic Associations. NUTMAN (P.S.); MOSSE (B.), Ed. Thirteenth Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge: Cambridge University Press, 51-71.

108 NUTMAN (P.S.), 1965.

The relations between nodule bacteria and the legume host in the rhizosphere and the process of infection. Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens. BARKER (K.F.); SNYDER (W.C.), Ed. Berkeley: University of California Press, 231-247.

109 NUTMAN (P.S.), 1969.

Genetics of symbiosis and nitrogen fixation in legumes. Proc. Roy. Soc., B 172, 417-437.

110 ORDAL (G.W.), 1976.

Control of tumbling in bacterial chemotaxis by divalent cation.
J. Bacteriol., 126 (2), 706-711.

111 ORDAL (G.W.), 1977.

Calcium in regulates chemotactic behaviour in bacteria. Nature, 270 (5632), 66-67.

- 112 ORDAL (G.W.);ADLER (J.),1974.
Isolation and complementation of mutants in galactose taxis and transport.
J. Bacteriol.,117 (2),509-516.
- 113 ORDAL (G.W.);ADLER (J.),1974.
Properties of mutants in galactose taxis and transport.
J. Bacteriol.,117 (2),517-526.
- 114 ORDAL (G.W.);FIELDS (R.B.),1977.
A biochemical mechanism for bacteria chemotaxis.
J. Theor. Biol.,68 (4),491-500.
- 115 ORDAL (G.W.);GIBSON (K.J.),1977.
Chemotaxis toward aminoacids by Bacillus subtilis.
J. Bacteriol.,129 (1),151-155.
- 116 PARKER (C.A.),1968.
On the evolution of symbiosis in legumes.
Festschrift til Hans Lauritz Jensen.Denmark:Gadgaard
Nielsens Botrykkerl,Lwmvig,107-116.
- 117 PARKINSON (J.S.),1974.
Data processing by chemotaxis machinery of E. coli.
Nature,252 (5481),317-319.
- 118 PARKINSON (J.S.),1976.
Che A,Che B and Che C genes of E. coli and their role
in chemotaxis.
J. Bacteriol.,126 (2),758-770.
- 119 PFEFFER (W.),1888.
Über chemotaktische Bewegungen von Bakterien,
Flagellaten und Volvocineen.
Untersuch. Bot. Inst. Tübingen,2,582-661.

- 120 QUISPÉL (A.), Ed., 1974.
The biology of nitrogen fixation. North Holland,
Amsterdam.
- 121 RAO (A.V.), 1976.
Root exudation in relation to inoculation with Rhizobia.
Zbl. Bakteriologie Parasitenkunde Infect. Krankh. Hyg., 2,
131 (1), 79-82.
- 122 RICHTER (M.), WILMS (W.); SCHEFFER (F.), 1968.
Determination of root exudates in a sterile continuous
flow culture. II- Short term and long term variations
of exudation intensity.
Plant. Physiol., 43, 1747-1754.
- 123 ROVIRA (A.D.), 1961.
Rhizobium numbers in rhizosphere of red clover and
paspalum in relation to soil treatment and the numbers
of bacteria and fungi.
Australian Journal of Agricultural Research, 12, 77-83.
- 124 ROVIRA (A.D.), 1965.
Interaction between plant roots and soil microorganisms.
Annual Review of Microbiology, 19, 241-266.
- 125 ROVIRA (A.D.), 1965.
Plant root exudates and their influence upon soil
microorganisms.
Ecology of soil-borne Plant Pathogens. BARKER (K.F);
SNYDER (W.C.), Ed., 170-184.
- 126 ROVIRA (A.D.); HARRIS (J.R.), 1961.
Plant root excretions in relation to the rhizosphere
effect. V- The exudation of B. group vitamins.
Plant and Soil, 14, 199-214.

- 127 SANDERS (R.E.); CARLSON (R.W.); ALBERSHEIM (P.), 1978.
A Rhizobium mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion.
Nature, 271, 240-242.
- 128 SCHWINGHAMER (E.A.), 1977.
Genetics aspects of nodulation and dinitrogen fixation by legumes: the microsymbiont.
A Treatise on Dinitrogen Fixation. Section III. Biology.
HARDY (R.W.F.); SILVER (W.S.), Ed., New-York: Wiley - Interscience, 577-622.
- 129 SEYMOUR (F.W.K.); DOETSCH (R.N.), 1973.
Chemotactic responses by motile bacteria.
J. Gen. Microbiol., 78 (2), 287-296.
- 130 SHERROD (L.L.); DOMSCH (K.H.), 1970.
Aminoacids in exudates of healthy and fungus affected pea roots.
Arch. Microbiol., 70, 240-242.
- 131 SILVERMAN (M.); SIMON (M.), 1974.
Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility.
Nature, 249, 73-74.
- 132 SILVERMAN (M.); SIMON (M.), 1977.
Identification of polypeptides necessary for chemotaxis in E. coli.
J. Bacteriol., 130 (3), 1317-1325.
- 133 SOKATCH (J.R.), 1979.
Roles of Appendages and surface layers in adaptation of bacteria to their environment.
The Bacteria, VII, A Treatise on Structure and Function, 229-289.

- 134 SOLHEIM (B.);RAA (J.),Ed.,1976.
Cell wall biochemistry related to specificity in host -
plant pathogen interactions.
- 135 SPRINGER (M.S.);GOY (M.F.);ADLER (J.),1979.
Protein methylation in behavioural control mechanisms
and in signal transduction.
Nature,280,279-284.
- 136 SPRINGER (M.S.);KORT (E.N.);LARSEN (S.H.);ORDAL (G.W.);
READER (R.W.);ADLER (J.),1975.
Role of methionine in bacterial chemotaxis:Requirement
for tumbling and involvement in information processing.
Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.,72 (11),4640-4644.
- 137 SPUDICH (J.L.);KOSHLAND (D.E.Jr),1979.
Specific inactivator of flagellar reversal in
S. typhimurium.
J. Bacteriol.,139 (2),442-447.
- 138 STOCK (J.B.);KOSHLAND (D.E.Jr),1978.
A protein methylesterase involved in bacterial sensing.
Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.,75 (8),3659-3663.
- 139 STRALEY (S.C.);CONTI (S.F.),1974.
Chemotaxis in Bdellovibrio bacteriovorus.
J. Bacteriol.,120 (1),549-551.
- 140 STRALEY (S.C.);CONTI (S.F.),1977.
Chemotaxis by Bdellovibrio bacteriovorus toward prey.
J. Bacteriol.,132 (2),628-640.

- 141 STRANGE (P.G.);KOSHLAND (D.E.Jr),1976.

Receptor interactions in a signalling system:competition between ribose receptor and galactose receptor in the chemotaxis response.

Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.,73 (3),762-766.

- 142 SZMELCMAN (S.),1978.

Etude du mécanisme sensoriel chez E. coli:influence de l'environnement ionique sur la motilité cellulaire. Regards sur la Biochimie,(2),12.

- 143 SZMELCMAN (S.);ADLER (J.),1976.

Change in membrane potentiel during bacterial chemotaxis. Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.,73 (12),4387-4391.

- 144 TAYLOR (B.L.);KOSHLAND (D.E.Jr),1974.

Reversal of flagella rotation in monotrichous and peritrichous bacteria:Generation of change of direction. J. Bacteriol.,119,640-642.

- 145 THORNTON (H.G.),1952.

The symbiosis between Rhizobium and leguminous plants and the influence of this on the bacterial strain.

Proc. Roy. Soc.,B 139,171-176.

- 146 T'MANNETJE (L.),1967.

A re-examination of the taxonomy of the genus Rhizobium and related genera using numerical analysis.

Antonie van Leeuwenhock: J. Microbiol. Serol.,33, 477-491.

- 147 TSANG (N.);MACNAB (R.M.);KOSHLAND (D.E.Jr),1973.

Common mechanism for repellents and attractants in bacterial chemotaxis.

Science,181 (4094),60-63.

- 148 TSO (W.W.);ADLER (J.),1974.
Negative chemotaxis in E. coli.
J. Bacteriol.,118 (2),560-576.
- 149 UCKER (D.S.);SIGNER (E.R.),1978.
Catabolic-Repression-Like Phenomenon with R. meliloti.
J. Bacteriol.,136 (3),1197-1200.
- 150 VAN DER DRIFT (C.);DE JONG (M.H.),1974.
Chemotaxis toward aminoacids in Bacillus subtilis.
Arch. Microbiol.,96 (2),83-92.
- 151 VAN DER DRIFT (C.);DUIVERMAN (J.);BEXKENS (H.);
KRIJNEN (A.),1975.
Chemotaxis of a motile Streptococcus toward sugars and
aminoacids.
J. Bacteriol.,124 (3),1142-1147.
- 152 VAN EGERAAT (A.W.S.M.),1972.
Pea-root exudates and their effect upon root-nodule
bacteria.
Medelingen Landbouwoogschool Wageningen,72-27,1-91.
- 153 VINCET (J.M.),1967.
Symbiotic specificity.
Australian Journal of Science,29,192-197.
- 154 VINCENT (J.M.),1974.
Root-nodule symbiosis with Rhizobium.
Biology of Nitrogen Fixation.QUISPEL (A.),Ed.,
Amsterdam:North Holland Pub. Co.,265-341.
- 155 VINCENT (J.M.),1977.
Rhizobium:General Microbiology.
A Treatise on Dinitrogen Fixation.Section III-Biology.
HARDY (R.W.F.);SILVER (W.S.),Ed.,New-York.,277-366.

- 156 WARRICK (H.M.);TAYLOR (L.);KOSHLAND (D.E.Jr),1977..
Chemotactic mechanism of S. typhimurium:preliminary
mapping and characterization of mutants.
J. Bacteriol.,130 (1),223-231.
- 157 WOLPERT (J.S.);ALBERSHEIM (P.),1976.
Host Symbiont Interactions: I- The lectins of legumes
interact with the O antigen containing lipopolysacchari-
des of their symbiont Rhizobia.
Biochem. Biophys. Res. Commun.,70 (3),729-737.
- 158 WRIGHT (W.H.),1962.
The nodule bacteria of soybeans. I- Bacteriology of
strains.
Soil Sc.,20,95-129.
- 159 YAO (P.Y.);VINCENT (J.M.),1976.
Factors responsible for the curling and branching of
clover root hairs by Rhizobium.
Plant and Soil,45,1-6.
- 160 ZUKIN (R.S.);KOSHLAND (D.E.Jr),1976.
Mg⁺⁺,Ca⁺⁺-dependent adenosine triphosphatase as receptor
for divalent cations in bacterial sensing.
Science,193 (4251),405-408.



