

50376
1980
31

50376
1980
31

N° d'ordre : 814

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

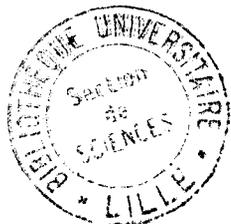
DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spécialité : "Amélioration des Productions Végétales et Microbiennes"

Option MICROBIOLOGIE

par

Kamel-Ridha MAOUI



**ETUDE DU TRANSFERT GENETIQUE DE L'EFFICIENCE
CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI**

Soutenu le 5 mars 1980, devant la Commission d'Examen

| | | |
|-------------------|------------------|------------|
| Membres du Jury : | MM. J. GUILLAUME | Président |
| | R. TAILLIEZ | Rapporteur |
| | C. BONNIER | |
| | J. KREMBEL | Examineurs |
| | G. MARTIN | |

Que mes parents trouvent ici
L'expression de ma profonde gratitude.

Je leur dédie ce travail, pour les
sacrifices consentis, le soutien constant
et l'affection chaleureuse qu'ils m'ont
toujours témoignés au cours de mes études.

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Microbiologie à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, sous la direction de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME. Nous le remercions vivement des sagaces conseils pour l'orientation de cette recherche, des fructueuses discussions au cours des expérimentations et des encouragements permanents qu'il nous a prodigués tout au long de ce travail. Nous lui exprimons toute notre gratitude et notre profond respect.

Nous remercions Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ d'avoir consacré une partie de son temps à la lecture attentive de ce manuscrit et de l'amabilité avec laquelle il a bien voulu accepter de faire partie de notre Jury.

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

Que Monsieur le Professeur J. KREMBEL trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance d'accepter de juger notre travail et de participer à notre Jury.

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

Nous sommes reconnaissant à Monsieur le Professeur Z. KALLAL de l'amabilité avec laquelle il nous a accueilli dans son Institut et l'aide soutenue qu'il nous a accordée pour réaliser ces études.

Que Monsieur BECHET soit remercié de son excellente collaboration tant sur le plan scientifique qu'humain. Nous le remercions des nombreux et utiles conseils techniques et scientifiques, et de sa disponibilité qu'il nous a toujours témoignés au cours de fructueuses discussions.

Nous exprimons notre reconnaissance à Madame BONNIER pour avoir permis la réalisation de ce mémoire.

Nos reconnaissances vont à tous ceux qui nous ont aidé ; qu'ils trouvent ici nos chaleureux remerciements pour l'amitié et l'affection qu'ils nous ont constamment témoignés.

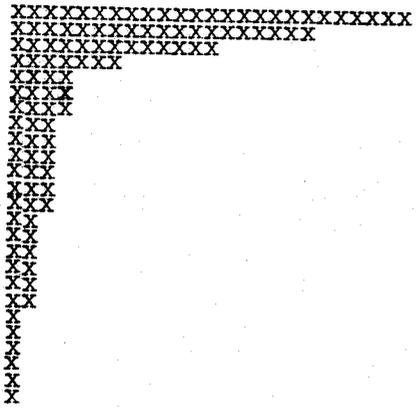
TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 1 |
| BUT DU TRAVAIL | 19 |
| MATERIEL ET METHODES | |
| I - SOUCHES BACTÉRIENNES | 20 |
| II - BACTÉRIOPHAGES | 22 |
| III - LÉGUMINEUSES | 22 |
| IV - MILIEUX DE CULTURE | 23 |
| 1) Milieu complet | 23 |
| 2) Milieu minimum | 23 |
| 3) Gélose blanche | 24 |
| 4) Gélose pour bactériophages | 24 |
| 5) Milieu de NICOL et THORNTON | 25 |
| V - OBTENTION DE MUTANTS RÉSISTANTS À DIFFÉRENTS ANTIBIOTIQUES ... | 26 |
| VI - MÉTHODE DE FILTRATION | 28 |
| VII - MÉTHODE D'OBTENTION ET DE CONSERVATION DES BACTÉRIOPHAGES | 29 |
| VIII - MÉTHODE DE CROISEMENT | 30 |
| IX - MÉTHODE D'ISOLEMENT DES SOUCHES À PARTIR DE NODULES | 31 |
| X - TESTS D'INFECTIVITÉ ET D'EFFICIENCE | 32 |

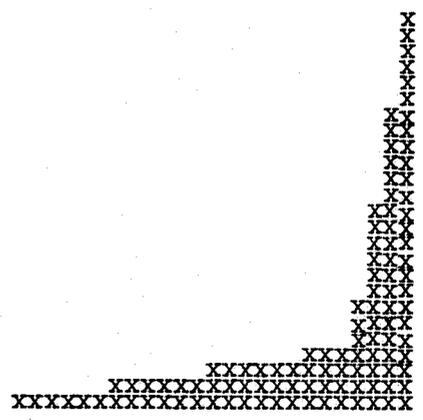
RESULTATS ET COMMENTAIRES

| | | | |
|----|---|---|----|
| I | - | RECHERCHE DES SOUCHES INEFFICIENTES | 36 |
| | | 1) Etude de souches sauvages | 37 |
| | | 2) Etude des clones obtenus par filtration | 40 |
| | | 3) Etude des souches auxotrophes | 43 |
| | | 4) Etude de filiations et de révertants | 52 |
| II | - | ÉTUDE DU TRANSFERT DE L'EFFICIENCE | 63 |
| | | 1) Essai de sélection des bactéries efficaces dans une population inefficace | 64 |
| | | 2) Transfert de l'efficacité par conjugaison | 84 |
| | | A) Croisement effectué entre la souche $M_5N_1(RP_4)$ et la souche 2011 m_{9d} rif | 85 |
| | | a) Fréquence de transfert des caractères d'auxotrophie. | 85 |
| | | b) Propriétés des recombinants obtenus | 87 |
| | | B) Croisement réalisé entre la souche 2011 (RP_4) et la souche A_1a str rif | 91 |
| | | a) Fréquence de transfert des marqueurs génétiques | 91 |
| | | b) Analyse des recombinants | 91 |
| | | DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE | 97 |

BIBLIOGRAPHIE



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



La misère et la famine sévissent dans certaines régions du globe.

Vraisemblablement, les productions agro-alimentaires sont largement suffisantes pour pallier cette faim dans le monde. Mais le problème de base réside dans la répartition inégale de celles-ci. En effet, le gaspillage dans la société actuelle reflète bien cette injustice qui est le résultat des barrières politico-économiques instaurées.

Ainsi donc, les problèmes démographiques, les problèmes de pollution et de conservation de l'énergie dépendront-ils largement à l'avenir des recherches dans le domaine agro-alimentaire.

Un des problèmes fondamentaux de l'agriculture est d'éviter l'épuisement des sols. L'emploi des engrais chimiques, des pesticides et des herbicides pose de plus un grave problème écologique.

En effet, il serait vain de considérer le sol comme un assemblage de roches, comme un simple réservoir de minéraux dans lequel puisent les végétaux. Si tel était le cas, le sol serait rapidement usé, impropre à promouvoir la vie en surface. Grâce à sa microflore, le sol peut être considéré comme un "tout", un organisme vivant qui possède une structure qui respire, assimile, excrète, peut vieillir et même mourir. Les micro-organismes en équilibre entre eux mais également avec les plantes et les facteurs physiques du sol entrent dans divers groupements physiologiques (cycle du carbone et de l'azote en particulier) qui confèrent la vie à un sol.

Les sources du carbone du sol sont nombreuses : le carbone minéral du CO_2 atmosphérique et des carbonates telluriques, le carbone organique des végétaux et des animaux sous ses formes multiples depuis les glucides simples jusqu'aux substances hautement polymérisées comme la cellulose, ou de structure complexe, comme la lignine.

L'oxygène et les composés hydrogénés sont généralement présents dans le sol en quantité suffisante. Dans les sols mal drainés où l'oxygène peut faire plus ou moins défaut, certains microorganismes sont capables d'obtenir cet élément à partir de sels minéraux comme les nitrates et les sulfates.

Quant à l'azote, c'est un élément majeur qui est fixé dans le sol sous plusieurs formes. Les sources d'azote sont diverses. On peut citer les engrais azotés. Au début, ces engrais n'étaient pas chimiques : c'étaient des minéraux naturels bruts, souvent d'origine organique, qui contenaient des éléments utiles aux plantes et parfois en voie d'épuisement dans les terres cultivées depuis des siècles : des craies phosphatées, des os broyés, des sylvinites brutes et toutes sortes de roches de diverses origines. Ce n'est que plus tard, une fois l'industrie suffisamment développée, que la production d'engrais "chimiques" commença et qu'ils se substituèrent aux engrais minéraux bruts, dans une certaine mesure.

Maintenant, la plupart des engrais minéraux sont synthétisés, c'est-à-dire chimiquement transformés, en usine, et rendus plus rapidement assimilables par les plantes en vue de leur alimentation plus ou moins forcée. Il est essentiel de connaître la différence entre un engrais minéral brut, comme le phosphate naturel ou la craie phosphatée, et un engrais de synthèse comme le phosphate d'ammoniaque.

Le premier reste inerte dans le sol en attendant sa mobilisation par l'humus, réglée d'une façon automatique par le besoin de la plante tels que les phosphates naturels. Les phosphates naturels utilisés par l'agriculture biologique sont insolubles et restent où le cultivateur les met. Il peut donc en employer moins, il en reste quand même plus en fin de culture. Leur solubilisation est assurée par un humus actif que leur présence nourrit, alors que les produits chimiques le dégradent en tuant la microflore.

Le second est très diffusible dans le sol et suralimente les plantes : les rendements sont augmentés tandis que l'excès s'écoule avec les eaux de ruissellement pour aller polluer lacs, rivières et eaux souterraines... En passant, il "brûle" l'humus, ce qui fait que les terres cultivées aux engrais chimiques deviennent de plus en plus difficiles à travailler, et qu'il leur faut un tonnage de plus en plus grand d'engrais d'année en année : il en est ainsi avec les phosphates industriels dont le taux dans le sol baisse rapidement de sorte que :

* Il faut en mettre plus pour qu'il en reste jusqu'à la fin de la végétation, ce qui est coûteux ;

* Et il y en a beaucoup plus immédiatement après l'épandage qu'à la fin de la culture. Les plantes sont donc successivement suralimentées, puis privées, ce qui est préjudiciable à leur valeur nutritionnelle.

Il est vrai que les engrais chimiques permettent une augmentation du rendement lors des premières années de leur utilisation. Cependant, après trente ou quarante ans d'épandages répétés, on constate bien souvent une baisse des rendements des principales cultures. On est donc obligé d'augmenter les quantités d'engrais pour assurer des rendements acceptables. Or, en raison de la hausse du prix du pétrole, ceux-ci deviennent de plus en plus chers. Rien que leur transport qui nécessite un coût astronomique, à titre d'exemple, il faudrait mobiliser continuellement environ un tiers du tonnage maritime mondial (1) . L'excès d'engrais chimiques entraîne aussi des carences en oligo-éléments dans les plantes. L'excès d'azote crée une carence en cuivre qui est pour la plante un agent anti-infectieux ; on sait que le

taux de cuivre diminue fortement dans les terrains où l'on pratique l'agriculture chimique intensive. L'excès de potasse entraîne une carence en magnésium responsable de certaines maladies nerveuses chez les consommateurs (2). L'agriculture biologique, quant à elle, ne consomme pas d'engrais coûteux. De plus, en revalorisant la flore microbienne, elle rend la terre plus meuble, plus souple. Il faut trois fois moins d'énergie pour la remuer. Elle permet d'autre part de récolter des plantes saines et de bonne qualité pour la consommation.

Mises à part les infimes quantités d'azote de l'air fixées dans le sol par la voie physico-chimique (lors des décharges électriques dans l'atmosphère par exemple), c'est uniquement à quelques microorganismes (procaryotes : à savoir, certaines algues et certaines bactéries) que revient l'apanage de fixer l'azote gazeux et de renouveler aussi constamment le stock azoté indispensable au maintien de nouvelles synthèses vitales. La fixation biologique d'azote apparaît comme l'un des processus fondamentaux parmi les cycles biogéniques se déroulant dans le sol.

En effet, ce composé essentiel de la matière vivante, est d'origine atmosphérique et resterait inutilisable pour toute forme de vie végétale ou animale, sans l'existence des microorganismes.

A côté des microorganismes fixant, seuls, l'azote atmosphérique, le sol en recèle d'autres qui sont capables de fixer cet azote au profit de la plante avec laquelle ils entrent en symbiose. L'importance agronomique de ces derniers, avec à leur tête l'association Rhizobium-légumineuses, est considérable, ce qui en fit un sujet de prédilection pour maints

scientifiques dès les débuts des sciences appliquées à la microbiologie du sol ; aujourd'hui, les contributions de nombreux chercheurs enrichissent constamment cette étude.

L'extrême importance économique de la fixation biologique d'azote moléculaire ressort bien des calculs de LIPMAN et CONYBEARE (3) : ils évaluent pour la surface totale cultivée des U.S.A. que 60 % de l'azote fixé par les plantes était dû en fait aux microorganismes : en effet, sur les 16,45 millions de tonnes d'azote atmosphérique transformé en matière biologique, 9,83 millions de tonnes sont dûs à l'action des microorganismes dont 5,46 millions de tonnes attribués aux espèces du genre Rhizobium. L'apport biologique azoté, même celui par le genre Rhizobium seul, dépasse de beaucoup l'apport dont sont responsables les engrais chimiques et fumures organiques qui n'interviennent respectivement que pour 0,48 et 2,57 millions de tonnes. Cependant, l'accord est encore loin d'être fait sur de tels chiffres et un bon nombre d'auteurs modernes tendent au contraire à minimiser le rôle de la fixation biologique, tout au moins par les bactéries non symbiotiques.

Dans les assolements céréales-luzerne, la luzerne (légumineuse infectée par Rhizobium meliloti) augmente les rendements céréaliers en accroissant l'azote du sol et en supprimant les mauvaises herbes tout en fournissant une nourriture plus abondante et meilleure au cheptel (4) . Mis à part son emploi comme engrais vert , la luzerne contribue à l'enrichissement du sol, soit par excrétion radiculaire de produits azotés dans le sol, soit lors du détachement des nodules et par le reste des racines laissées au sol.

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

Dans les terres vierges ou inadaptées à la culture d'une légumineuse donnée, il est nécessaire d'apporter les bactéries symbiotes en quantité suffisante, mieux adaptées aux conditions écologiques et particulièrement efficaces.

DÉVELOPPEMENTS RÉCENTS DE LA GÉNÉTIQUE DU RHIZOBIUM

Les difficultés rencontrées dans les manipulations génétiques ne permettent pas encore l'obtention de souches très efficaces.

Des études doivent être réalisées sur des souches isolées de Rhizobium ou de mutants dans le but de déterminer le nombre et les fonctions des gènes participant à la symbiose.

Des recherches devraient être également effectuées sur les méthodes de transfert des gènes et d'établissement de carte génétique afin de trouver des moyens qui permettraient de "construire" une souche souhaitée.

Des mutants de Rhizobium infectieux, mais inefficaces, peuvent être isolés directement à partir de nodules racinaires prélevés dans la nature : cependant, comme le génome parental de telles souches reste inconnu, il est impossible de les utiliser dans des études génétiques comparatives visant à la recherche du ou des gènes qui ont subi la mutation.

Par contre, les récentes études par conjugaison ont montré que ceci n'est pas toujours un obstacle parce que des souches inefficaces peuvent être croisées avec des souches efficaces et le fonctionnement des gènes importants qui interviennent dans la symbiose peut être étudiée chez les recombinants. Un autre moyen, utilisé depuis peu, consiste à isoler des mutants inefficaces obtenus en présence d'un agent mutagène et à les tester sur des plantules.

LORKIEWICZ et MELKE (5) ont isolé des souches exigeantes en histidine ayant perdu leur pouvoir de nodulation, leur analyse montre qu'il s'agit plutôt d'une caractéristique particulière du mutant. BERINGER, JOHNSTON et WELLS (6) ont constaté que 3 % des survivants d'une souche de Rhizobium leguminosarum traitée par la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) étaient inefficients. La moitié de ces mutants originaux, testés sur plantes à 26° C, se sont avérés efficaces dans les mêmes conditions mais à 13° C.

D'autre part, des mutants non-modulants et inefficients ont été isolés par MAIER et BRILL (7) après traitement d'une souche de Rhizobium japonicum avec le même agent mutagène : ces auteurs isolent une souche inefficace intéressante par le fait qu'elle induit la formation de nodules roses dus à la présence de leghémoglobine conjointement synthétisée par les deux partenaires et qui semble être une des causes du fonctionnement préférentiel de la nitrogénase en symbiose (8). L'analyse du mutant a montré qu'il est déficient au niveau du composant II de la nitrogénase. Mais il s'est avéré qu'il existe des souches de Rhizobium qui fixent librement l'azote atmosphérique (9, 10, 11) ce qui complique la compréhension des régulations génétiques existant entre la bactérie et la plante-hôte.

En outre, des études, dans le but d'obtenir de nombreux mutants inefficients différents de Rhizobium (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) et ainsi augmenter le "pool" de gènes intervenant dans la symbiose, sont en cours dans un certain nombre de laboratoires, de même que leur analyse génétique.

Certains auteurs ont remarqué que l'exigence en bases nucléiques (19) ou la résistance à certains antibiotiques, telle la viomycine (20, 21, 22, 23, 24) pouvaient constituer des critères de sélection de mutants inefficients, mais aucune explication génétique n'est mise au point.

Il est maintenant probable que d'ici quelques années, nous pourrions avoir une idée précise sur le nombre et l'emplacement sur le chromosome ou sur le plasmide ou peut être sur les deux, des gènes de Rhizobium responsables de la symbiose.

Il a été établi depuis plusieurs années que le transfert de gènes pouvait être réalisé par transformation (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33) ou transduction (34, 35, 36). A noter que KOWALSKI et DENARIE (37) ont mis en évidence la transduction d'un gène contrôlant l'expression de la fixation d'azote. La crédibilité des résultats peut être contestée par le manque de contrôle au cours des expérimentations. Cependant, ces deux processus de recombinaison n'entraînent le transfert que de petits fragments de DNA, l'établissement d'une carte génétique serait délicate.

La conjugaison, qui implique la formation de cellules partiellement diploïdes et le transfert de fragments assez importants de DNA, est la méthode la plus convenable pour établir la carte génétique. En utilisant des souches de Rhizobium lupini qui sont capables de conjuguer, HEUMANN et ses collaborateurs (38, 39, 40, 41, 42) ont pu établir l'emplacement d'un certain nombre de gènes sur le chromosome. Cependant, leurs souches ne sont pas nodulantes et les données génétiques relatives à cet organisme ne sont pas utilisables pour une analyse de la symbiose.

Ces dernières années, quatre laboratoires ont publié des cartes génétiques circulaires pour des souches de Rhizobium efficaces. Celles-ci ont été obtenues par conjugaison artificielle en utilisant des facteurs R des groupes d'incomptabilité plasmidiques P (P1 et P2).

- Par MEADE et SIGNER (43) pour la souche 2011 de Rhizobium meliloti.

- Par KONDOROSI et collaborateurs (44) pour la souche 41 de Rhizobium meliloti.

- Par JULLIOT et BOISTARD (45) pour la souche 2011 de Rhizobium meliloti.

- Par BERINGER, HOGGAN et JOHNSTON (46) pour la souche 300 de Rhizobium leguminosarum.

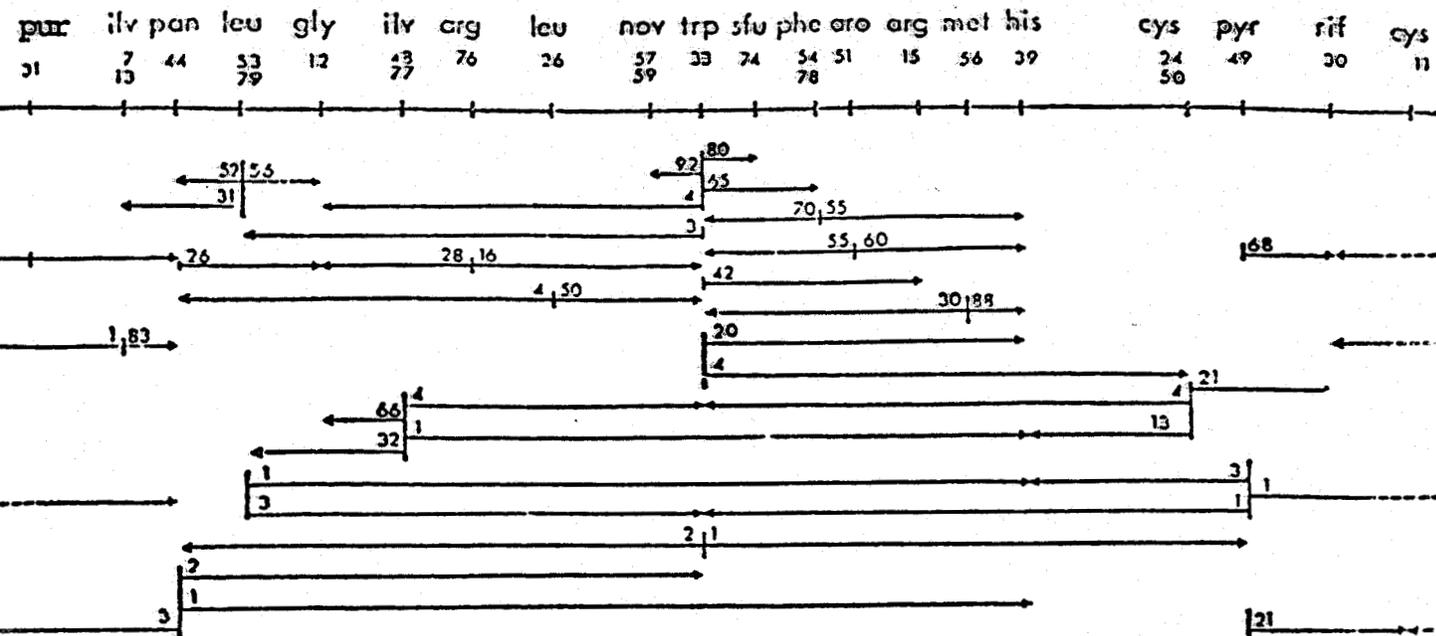


FIGURE 1 : D'après MEADE et SIGNER (1977)

Les abréviations rif, nov et 5 fu représentent respectivement les résistances à la rifampicine, la novobiocine et la 5-fluorouracile. Les chiffres immédiatement au-dessous des marqueurs représentent le numéro des mutants isolés. Chaque flèche montre le pourcentage moyen de liaison entre les différents marqueurs (déterminé à partir de 1 à 5 croisements), avec le marqueur sélectionné situé à la queue de la flèche, et le marqueur non sélectionné à la tête de la flèche.

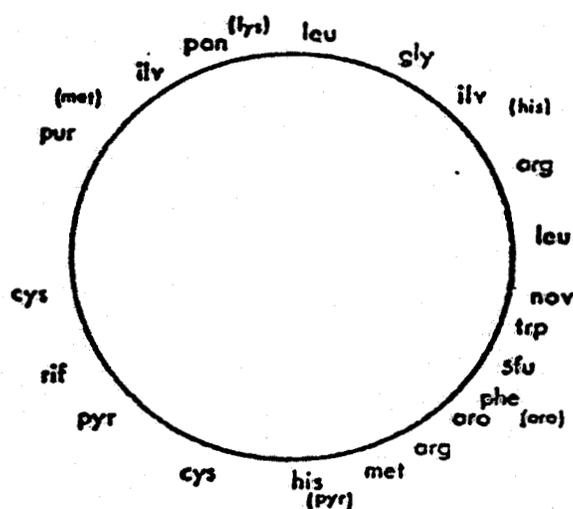


FIGURE 2 : D'après MEADE et SIGNER (1977)

Représentation circulaire des marqueurs ci-dessus ; ceux entre parenthèses sont à une position approximative.



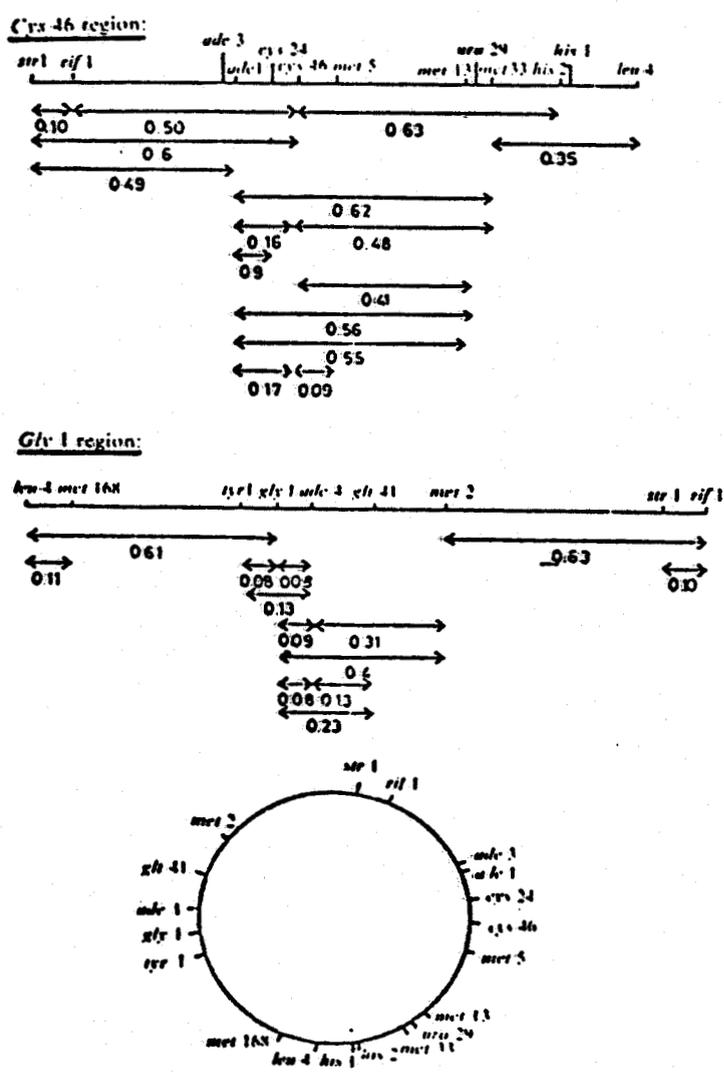


FIGURE 3 : D'après KONDOROSI, KISS, GORRAI, VINCZE et BANFALVI (1977)
 Carte génétique de Rhizobium meliloti 41. Les localisations des
 marqueurs ont été déterminées dans des croisements à 3 points.



FIGURE 4 : D'après JULLIOT et BOISTARD (1979)

Les filtres ont été incubés pendant 22 heures. Les bactéries, remises en suspension, ont été étalées sur les milieux sélectifs variés sans lavage préalable. Les chiffres représentent la quantité de transconjugants par ml dans le volume final. Là où il n'y a pas de chiffre signifie que le nombre de recombinants n'est pas supérieur à celui obtenu avec le RP₄ type sauvage pour le même marqueur. De même, pour la clareté des résultats, des croisements effectués avec les 12 plasmides, qui ne mobilisent aucun marqueur à une fréquence plus grande que le RP₄, ne sont pas mentionnés.

| Plasmids | Genetic markers | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | <i>phe78</i> | <i>trp33</i> | <i>leu53</i> | <i>cys59</i> | <i>met65</i> | <i>pur68</i> | <i>met61</i> | <i>gly58</i> | <i>pyr66</i> | <i>pyr713</i> |
| RP4 | 1,160 | 2,380 | 280 | 1,160 | 1,040 | 1,600 | 820 | 1,000 | 2,200 | 840 |
| pGM1 19 R | | | >20,000 | | | | 10,600 | | | |
| pGM1 26 R | 2,600 | 7,000 | >20,000 | | | | | | | |
| pGM1 42 R | | | | 3,200 | | | | 12,800 | | 6,600 |
| pGM1 51 R | | | | >20,000 | | | | | | |

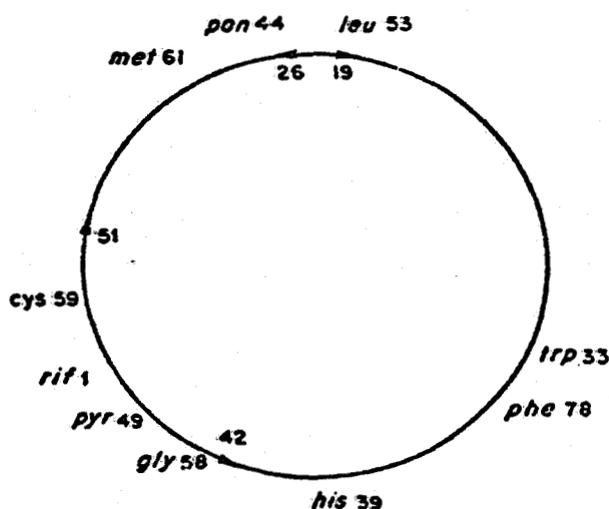


FIGURE 5 : D'après JULLIOT et BOISTARD (1979)

Origine et orientation des transferts favorisés par des plasmides hybrides chez *Rhizobium meliloti* 2011 : celles-ci sont traduites des résultats donnés dans le texte.

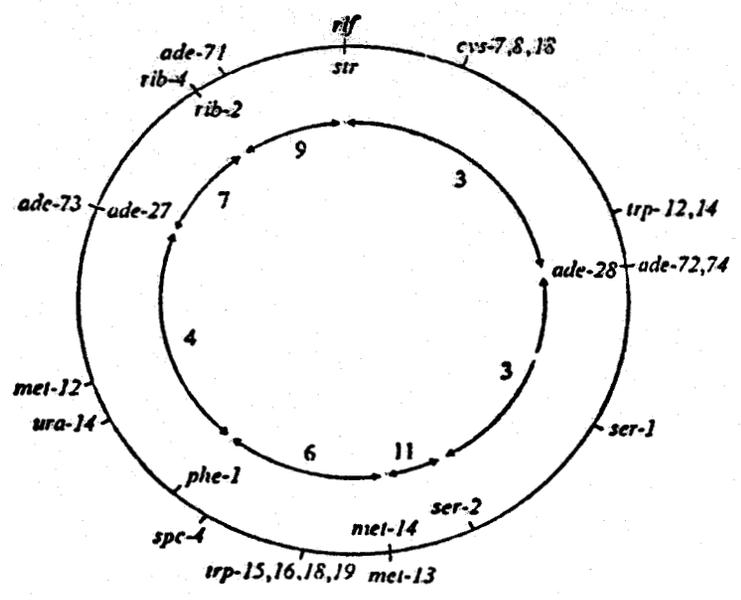


FIGURE 6 : D'après BERINGER, HOGGAN et JOHNSTON (1978)

Carte génétique circulaire de *R. leguminosarum* 300. Les chiffres sur les flèches du cercle interne indiquent les fréquences de co-transfert des marqueurs choisis pour montrer la circularité en utilisant seulement 7 marqueurs avec des fréquences de co-transfert de 3 à 11 %.

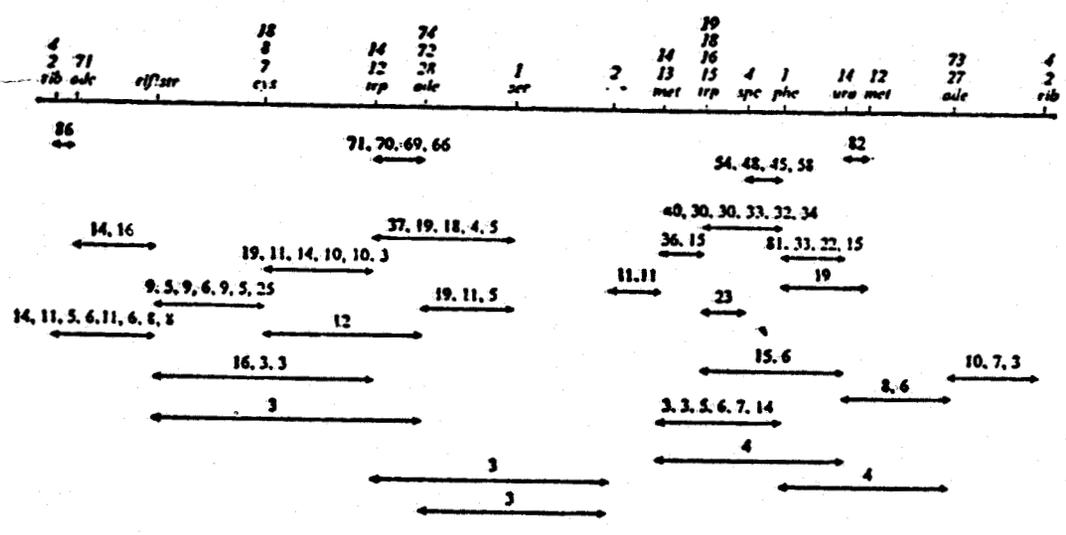


FIGURE 7 : D'après BERINGER, HOGGAN et JOHNSTON (1978)

Carte génétique préliminaire pour la souche de *R. leguminosarum* 300. Les chiffres au-dessus des marqueurs représentent les numéros des allèles. Les chiffres sur les flèches, en dessous de la ligne, sont les pourcentages de co-transfert des allèles correspondants. Chaque nombre a été obtenu à partir d'un croisement différent. L'ordre des marqueurs sur la carte a été déterminé sur la base d'une liaison avec d'autres marqueurs, comme il l'est montré sur la carte, et aussi l'absence de liaison avec d'autres marqueurs.

Cependant, aucune indication concernant les caractères d'infectivité ou d'efficacité n'a pu être identifiée et localisée. Les gènes de l'efficacité pourraient être situés non pas sur le chromosome bactérien, mais sur un plasmide indigène ou sur une combinaison de ces deux structures. Les gènes responsables de la fixation d'azote (appelés gènes "nif" : nitrogen-fixation) étaient particulièrement étudiés sur des fixateurs libres d'azote comme *Klebsiella* (47, 48, 49) et *Azotobacter* (50, 51).

Les plasmides du groupe P_1 sont particulièrement utilisés pour ces études parce qu'ils peuvent être sélectionnés grâce à leur résistance aux antibiotiques et grâce à la formation de cellules partiellement diploïdes. Chez ces dernières, l'appariement résulte du transfert d'un plasmide dans une bactérie qui en est initialement dépourvue.

On a constaté que le plasmide peut aussi permettre le transfert de DNA chromosomique à une fréquence de l'ordre de 10^{-4} . DUNICAN, O'GARA et TIERNEY (52, 53) ont transmis, à l'aide du plasmide déréréprimé R1 drcd 19 les gènes de la fixation de l'azote de Rhizobium trifolii à Klebsiella aerogenes en irradiant aux U.V. la souche donatrice. Aucune explication n'a été apportée sur l'importance de l'irradiation. L'avantage pratique de ces plasmides, c'est qu'ils permettent le transfert d'importants fragments de DNA : par conséquent, plusieurs marqueurs génétiques peuvent être transférés en même temps. Ceci a pu être utilisé pour positionner un nombre de caractères relativement faible. A partir de la carte génétique ainsi établie, d'autres gènes peuvent être placés approximativement par les méthodes de croisement habituelles.

Une des caractéristiques importantes de la relation symbiotique entre le Rhizobium et les légumineuses, est la spécificité. Il ressort des observations de JOHNSTON et BERINGER (54) sur les recombinaisons chromosomiques, des possibilités d'analyse génétique sur la spécificité. A noter que 50 % du chromosome de Rhizobium trifolii a été transféré pièce par pièce dans le Rhizobium leguminosarum, mais aucun des recombinants n'a acquis la spécificité d'hôte du donneur. Cependant, un certain nombre de travaux décrit le transfert des gènes de l'infectivité entre bactéries appartenant à des groupes d'inoculation différents (55). KLEIN, JEMISON et MATTHYSSE (56) et, récemment, NUTI, LEPIDI, LEDEBOER et SCHILPEROORT (57), ainsi que BECHET (58) ont démontré la présence de plasmides de taille importante dans les souches de Rhizobium. En outre, des auteurs (59,60) ont signalé que la perte d'un tel plasmide chez une souche de Rhizobium phaseoli, et aussi de Rhizobium trifolii, correspond à une perte d'infectivité de ces bactéries. Si le plasmide de taille importante est retransféré à ces souches à partir de donneurs infectieux, ils retrouvent leur pouvoir d'infection. Donc, au moins un gène, dont la fonction est de contrôler l'infection, doit résider sur les plasmides des souches qu'ils ont utilisées. Cependant, les gènes de la spécificité d'hôte peuvent ne pas être portés par ces plasmides : en effet, lorsque la souche de Rhizobium trifolii dépourvu de plasmides a été croisée avec une souche efficiente de Rhizobium phaseoli, elle a retrouvé la capacité de noduler le trèfle mais pas le pois (59). Des travaux traitent du facteur R 68.45 qui intervient dans la recombinaison entre Rhizobium leguminosarum et Rhizobium meliloti ; il a été déjà établi, quoique des recombinants haploïdes arrivaient à peine à des fréquences détectables, que la fréquence des recombinants devait augmenter avec les porteurs de R.-primés (61).

Ces derniers représentent des plasmides dans lesquels une partie du chromosome de Rhizobium meliloti a été insérée et par conséquent le marqueur chromosomique (et d'autres liés à ce marqueur) pourrait être transféré entre des souches de Rhizobium à haute fréquence (61) . La capacité de former des diploïdes partiels chez Rhizobium pourrait nous guider à comprendre l'organisation et la fonction des gènes puisqu'ils peuvent permettre de faire des études de complémentation et de dominance.

A l'heure actuelle, nous pouvons dire qu'il existe un système pour l'établissement de carte génétique de souches de Rhizobium à croissance rapide (*) qui peut être utilisé pour faire la carte d'une manière claire et rapide des gènes nouvellement identifiés.

Par contre, quoiqu'il soit relativement difficile d'isoler des souches dont le pouvoir symbiotique est défectueux, il est certain que leur analyse génétique prendra une importance considérable à l'avenir.

Cependant, il reste beaucoup à faire sur l'analyse génétique formelle de Rhizobium ; en effet, aucun système pour établir une carte de souches de Rhizobium à croissance lente (*) n'est jusqu'à présent mis au point. Une analyse de structure doit être effectuée par transformation et transduction pour compléter les cartes génétiques des souches déjà étudiées.

(*) Deux genres de groupes de Rhizobium se distinguent selon leur vitesse de croissance :

Les Rhizobium à croissance rapide, de culture aisée, sur lesquels on peut faire assez facilement des études génétiques et qui concernent : R. leguminosarum, R. meliloti, R. phaseoli et R. trifolii.

Les Rhizobium à croissance lente, très difficiles à manipuler et qui nécessitent un temps plus long pour atteindre approximativement le même développement que le groupe précédent. Il s'agit de : R. japonicum, R. lupini, R. du "cowpea group".

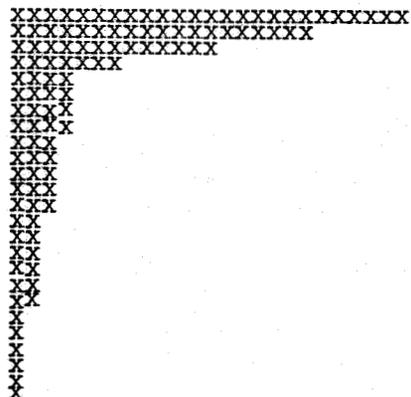
BUT DU TRAVAIL

A l'heure actuelle, il est indispensable de connaître avec précision les mécanismes permettant l'assimilation de l'azote atmosphérique lors de la symbiose plante - bactérie afin de pouvoir améliorer les rendements agricoles.

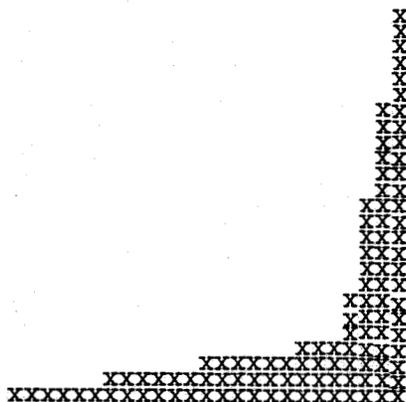
Dans ce travail, nous nous sommes proposés d'étudier les caractères génétiques liés à l'efficacité.

Dans un premier temps, nous avons préparé et isolé des mutants inefficients (incapables de fixer l'azote atmosphérique). Parmi les mutants inefficients isolés au cours de cette étude, on s'est intéressé en particulier aux mutants auxotrophes obtenus par action de la nitrosoguanidine.

Dans un second temps, nous avons cherché à mettre en évidence le transfert de l'efficacité. Le plasmide RP_4 a été utilisé dans les croisements pour tenter d'améliorer les fréquences de transfert des caractères étudiés (auxotrophie et efficacité).



M A T E R I E L
E T M E T H O D E S



I - SOUCHES BACTÉRIENNES

Nous avons utilisé des souches de Rhizobium meliloti de la collection du laboratoire de microbiologie, pour vérifier leur capacité de noduler la luzerne (Medicago sativa) et analyser leurs propriétés symbiotiques. L'ensemble de la collection contient des souches sauvages et des mutants auxotrophes issus de celles-ci.

La souche sauvage 2011 provient de J. DENARIE (Versailles). Les souches sauvages M_5N_1 , M_9S et $M_{14}SN$ ont été isolées au laboratoire ainsi que les mutants qui ont été obtenus par l'action de la N-méthyl - N' - nitro- N - nitrosoguanidine (NTG). Les exigences des souches mutantes sont résumées dans le tableau suivant.

| NOM DE LA SOUCHE | EXIGENCES |
|------------------|--|
| A | Isoleucine - valine |
| A_1 | Isoleucine - valine Tryptophane |
| A_1a | Isoleucine - valine Tryptophane Arginine |
| A_1b | Isoleucine - valine Tryptophane Arginine |
| A_1a_1 | Isoleucine - valine Tryptophane Arginine Glycocolle ou sérine |
| M_9Sm_3 | Adénine |
| M_9Sm_5 | Adénine |
| $M_{14}m_2$ | Méthionine ou leucine |
| $M_{14}m_3$ | Adénine |

| | |
|----------------------|----------------------------------|
| 2011m ₁ | ! Méthionine |
| 2011m ₂ | ! Adénine |
| 2011m ₃ | ! Tryptophane |
| 2011m ₄ | ! Glycocolle |
| 2011m ₅ | ! Auxotrophe non déterminé |
| 2011m ₆ | ! Auxotrophe non déterminé |
| 2011m ₇ | ! Auxotrophe non déterminé |
| 2011m ₈ | ! Adénine |
| 2011m ₉ | ! Pyrimidine |
| 2011m ₁₂ | ! Leucine |
| 2011m ₁ a | ! Méthionine Tryptophane |
| 2011m ₁ b | ! Méthionine Guanine |
| 2011m ₁ c | ! Méthionine Isoleucine - valine |
| 2011mgb | ! Pyrimidine Arginine |
| 2011mgc | ! Pyrimidine Isoleucine - valine |
| 2011mgd | ! Pyrimidine Leucine |
| 2011mge | ! Pyrimidine Isoleucine - valine |
| 2011mgi | ! Pyrimidine Lactose |
| 2011i ₁ | ! Isoleucine - valine |
| 2011i ₃ | ! Lactose Tyrosine |
| 2011i ₄ | ! Lactose Adénine |
| 2011i ₇ | ! Lactose Cystéine |
| 2011i ₁₀ | ! Lactose Arginine |
| 2011i ₁₁ | ! Auxotrophe non déterminé |
| 2011i ₁₂ | ! Lactose Adénine |
| 2011i ₁₅ | ! Lactose Adénine |
| 2011i ₁₆ | ! Lactose Adénine |
| 2011i ₁₇ | ! Lactose Adénine |
| 2011i ₂₀ | ! Lactose Leucine |
| 2011i ₂₂ | ! Lactose Méthionine |



D'autre part, des transconjuguants des souches de Rhizobium meliloti M_5N_1 (RP₄) ; 2011 (RP₄) et A₁ (RP₄) ont été sélectionnés après conjugaison en utilisant la souche 2011 mgb (RP₄) comme bactérie donatrice. Leur isolement a été effectué au cours de ce travail.

II - BACTÉRIOPHAGES

Il s'agit d'une série de bactériophages appartenant à la collection du laboratoire, qui nous ont servi à typer les souches 2011 (RP₄), 2011 mgb rif, M_5N_1 RP₄, A₁ a str rif utilisées pendant les croisements génétiques. Les phages utilisés sont les suivants :

$\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3, \varphi_4, \varphi_{5t}, \varphi_6, \varphi_7, \varphi_9, \varphi_{9L}, \varphi_{10}, \varphi_{11}, \varphi_{12}, \varphi_{13a},$
 $\varphi_{13c}, \varphi_{13H}, \varphi_{14}, \varphi_{16}, \varphi_{19}, \varphi_{20}, \varphi_{21}, \varphi_{22}, \varphi_{M_{23}}, \varphi_{2011g}, \varphi_{M_5-1}$

III - LÉGUMINEUSES

Des essais préliminaires ont été effectués sur des variétés de graines de luzerne (Medicago sativa). La variété "Magali" a été retenue pour son taux de germination et son appareil racinaire bien développé.

IV - MILIEUX DE CULTURE

1) Milieu complet (RC)

Sa composition est définie comme suit :

| | | |
|-----------------------------|-----|---|
| $K_2 H PO_4$ | 1 | g |
| $MgSO_4, 7H_2O$ | 0,2 | g |
| Extrait de levure | 1 | g |
| (Bacto Yeast Extract Difco) | | |
| Eau distillée q.s.p. | 1 | l |

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

Ce milieu est utilisé pour la préculture et la conservation des souches de Rhizobium meliloti. Le milieu est éventuellement gélosé (RCG) à l'aide de 12 g/litre de Bacto Agar (Difco). Il est utilisé pour la numération des souches et la sélection des transconjuguants après addition des antibiotiques indispensables.

2) Milieu minimum (R)

Il présente la composition suivante :

| | | |
|---------------------------|-----|---|
| $K_2 H PO_4$ | 0,5 | g |
| $NH_4 NO_3$ | 0,5 | g |
| $MgSO_4, 7 H_2O$ | 0,2 | g |
| Eau distillée q.s.p. | 1 | l |

Le pH est ajusté entre 7,2 et 7,5. La stérilisation se fait à 120° C pendant 20 mn.

Le milieu R est utilisé couramment pour les dilutions. Le milieu de croissance est le milieu R auquel on ajoute du glucose à 1 %, de la biotine à 0,01 µg/ml et de la thiamine à 0,5 µg/ml (concentrations finales).

Le milieu gélosé correspondant (RG) est obtenu par addition de 15 g/l de Bacto Agar (Difco) et est utilisé pour la sélection de recombinants après addition des amino-acides et des antibiotiques indispensables.

Nous avons effectué quelques essais en remplaçant le $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ par $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ pour éliminer les ions nitrates et avons même essayé un milieu sans source d'azote : les résultats obtenus n'ayant jamais été aussi satisfaisants que le milieu classique, c'est ce dernier qui a été utilisé dans la suite de notre travail.

3) Gélose blanche

Elle renferme 7,5 g de Bacto Agar (Difco) par litre d'eau distillée et est répartie à raison de 4 ml/tube. Sa stérilisation s'effectue à 120° pendant 20 mn. Elle est utilisée pour les numérations sur boîtes.

4) Gélose pour bactériophages

Le milieu est utilisé pour détecter la lyse éventuelle des bactéries par les phages. Sa composition est définie comme suit :

| | |
|---|--------|
| $\text{Na}_2 \text{H PO}_4, 12 \text{ H}_2\text{O}$ | 0,45 g |
| $\text{Na}_2 \text{ SO}_4, 10 \text{ H}_2\text{O}$ | 0,06 g |
| KNO_3 | 0,6 g |
| Fe Cl_3 | 0,01 g |
| $\text{MgCl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$ | 0,1 g |
| Ca Cl_2 | 0,06 g |
| Mannitol | 10 g |
| Agar Difco | 7,5 g |
| Eau distillée q.s.p..... | 1 1 |

Après ébullition, le milieu est réparti en flacons par doses de 100 ml. La stérilisation s'effectue à 105° C pendant 30 mn. En cas d'utilisation pour tester les souches, le milieu gélosé est liquéfié à 60° C, des prélèvements de volume égal à 4 ml sont versés dans des tubes auxquels sont ajoutés 0,3 ml de la suspension bactérienne ; on coule sur boîte contenant du milieu RCG fructosé (le fructose est additionné à la concentration finale de 1 % sous forme d'une solution stérile : 105° à 30 mn) et on laisse reposer pendant 10 mn. On ajoute ensuite une goutte de la suspension phagique et on incube dans l'étuve à 25° C pendant une nuit. Si la lyse est effective, on voit apparaître une plage claire sur la boîte.

5) Le milieu de NICOL et THORNTON (62)

Le milieu utilisé pour la culture des graines de luzerne présente la composition suivante :

| | |
|-------------------------|--------------------------------------|
| $K_2 H PO_4$ | 0,5 g |
| $MgSO_4, 7 H_2O$ | 0,2 g |
| NaCl | 0,1 g |
| $Fe PO_4$ | 1 g |
| $Ca_3 (PO_4)_2$ | 2 g |
| $Fe Cl_3$ | 1 ml d'une solution mère à 10 g/l |
| Eau de forage (X) | 1 l |

(X) obtenue du laboratoire de la Rapidase (SECLIN)

Le milieu de culture est réparti par 20 ml en tubes de 220 mm de hauteur et 20 mm de diamètre dans lesquels a été introduit un support en papier fort (Whatman 3) assurant le maintien de la graine à la surface du liquide et permettant de lui garder une humidité suffisante. Ces tubes contenant le support et le milieu liquide sont bouchés avec de la gaze renfermant du coton et stérilisés par autoclavage pendant 30 mn à 105° C (car à 120° C, on note une variation du pH).

Les plantules utilisées comme témoins non inoculés, avec azote, sont cultivées sur le même milieu contenant en outre 0,5 g de NH_4NO_3/l .

V - OBTENTION DE MUTANTS RÉSISTANTS À DIFFÉRENTS ANTIBIOTIQUES

Ces travaux ont été réalisés dans le but d'isoler des mutants de Rhizobium pour étudier les effets des mutations sur les propriétés symbiotiques ; d'autre part, certains mutants sont utilisés dans les croisements

génétiqnes en vue de la sélection de transconjugants et de recombinants éventuels.

a) Mutants résistants à la fois à la streptomycine et à la viomycine

La streptomycine est utilisée à une concentration de 400 µg/ml (0,16 ml de solution stérile de streptomycine par flacon de 100 ml de milieu).

La résistance de la viomycine est acquise à des concentrations caractéristiques utilisées pour chaque souche. Les souches utilisées portent déjà le caractère Str^R et sont issues de la souche mère 2011 str₃. La sélection de bactéries résistantes à la viomycine est restrictive à quelques souches de Rhizobium. Les bactéries sont cultivées en milieu complet RC jusqu'en fin de phase exponentielle, puis 0,1 ml de cette suspension est étalé sur des boîtes de PETRI contenant du milieu RCG additionné d'antibiotique à différentes concentrations. Les clones apparus sont purifiés par isolements successifs sur milieu RCG puis vérifiés sur milieu liquide (RC) additionné de viomycine (à des concentrations de 50 µg/ml, 100 µg/ml et 150 µg/ml selon la résistance des souches isolées).

Les mutants sont analysés pour leurs propriétés symbiotiques. Ce mode opératoire pour l'isolement de mutants résistants aux antibiotiques est valable dans ce qui suit.

b) Mutants résistants à la fois à la streptomycine et à la rifamycine

La sélection de ces mutants est réalisée par étapes successives. La streptomycine est utilisée à la concentration de 400 µg/ml. La

rifamycine est ajoutée à raison de 0,5 ml d'une solution de 20 mg/ml par flacon de 100 ml de milieu (concentration finale : 100 µg/ml). La rifamycine, vue son instabilité, est remplacée par la rifampicine à la même dose.

c) Mutants résistants à la fois à la streptomycine et à la spectinomycine

On a isolé des mutants résistants à la spectinomycine jusqu'à 2 000 µg/ml selon les mêmes modalités.

Les mutants résistants à la fois à la streptomycine et à la rifamycine (ou à la spectinomycine) sont utilisés : soit pour analyser leurs propriétés symbiotiques, soit pour servir de souches réceptrices dans les croisements génétiques.

VI - MÉTHODE DE FILTRATION

On a choisi la souche sauvage 2011 Sm^S qui est caractérisée par une sécrétion importante de polysaccharides et qui a été rendue résistante à la streptomycine et à la rifamycine (la quantité de polysides produits par cette souche cultivée sur le milieu de WRIGHT est de 900 : exprimée en poids sec en µg/ml de milieu de culture) (63) . Une des colonies résistantes à la streptomycine et à la rifamycine a été isolée pour sa capacité de noduler les semences de luzerne.

On fait une préculture de cette souche sur milieu riche contenant 1 % de fructose. On laisse incuber jusqu'à la phase stationnaire et on filtre sur appareil Millipore en utilisant des filtres ayant des pores de

1,2 μ de diamètre. On ajoute au filtrat un volume égal de milieu RC frais et on laisse croître les bactéries de nouveau jusqu'à ce qu'elles atteignent la phase stationnaire tardive.

Ce processus est répété 10 fois pendant un mois. Ces cellules sont ensuite diluées et étalées sur milieu solide pour observer leur morphologie.

VII - MÉTHODE D'OBTENTION ET DE CONSERVATION DES BACTÉRIOPHAGES

On procède de la manière suivante : on porte 0,1 ml de la suspension de phages dans un tube contenant 0,3 ml de la suspension bactérienne. On prépare ainsi 11 tubes dont un servira de témoin. On laisse 20 mn sans agitation à température ambiante. On coule par la suite 4 ml de gélose pour bactériophages dans chaque tube de cette série ainsi préparée, puis en double couche dans 11 boîtes contenant du milieu RCG fructosé fraîchement coulé. On incube à 25° C pendant une nuit. Le lendemain, on gratte, avec un étaleur, la couche superficielle que l'on place dans un pot à centrifuger de 50 ml (5 boîtes par pot). On ajoute dans ce pot 7,5 ml de RC fructosé et 0,5 ml de chloroforme pour éliminer les bactéries prises lors du grattage.

Après agitation, on laisse reposer pendant 20 mn. On centrifuge à 12 000 g pendant 15 mn à 4° C. Le liquide surnageant est placé dans un tube stérile, on y ajoute quelques gouttes de chloroforme. Le stock ainsi obtenu est conservé à + 4° C.

VII - MÉTHODE DE CROISEMENT

Les souches de Rhizobium meliloti sont précultivées jusqu'en phase exponentielle dans le milieu complet glucosé à 1 %. Les croisements peuvent s'effectuer :

- soit immédiatement après préculture ;
- soit après incubation dans l'étuve à 32° pendant une demi-heure en aérobiose réduite (état statique).

Les temps de contact varient selon les expériences considérées.

On prélève 1 ml de chaque suspension contenant les souches à croiser et on prépare un mélange (2 ml). On filtre sur membrane (SARTORIUS : diamètre 35 mm, porosité 0,2 μ) stérile déposée sur appareil de filtration (SARTORIUS réf. : SM 113, 0,625 mm de diamètre) 1 ml du mélange. Une fois les bactéries recueillies sur le filtre, celui-ci est déposé stérilement dans une boîte de PETRI contenant du ROG additionné de glucose ; un contact entre les deux bactéries à croiser est ainsi établi pendant un temps déterminé. Après incubation à 32° C, la membrane est reprise, placée dans un tube à centrifugation contenant 5 ml de milieu R, puis homogénéisée au vortex.

Après centrifugation, le culot est remis en suspension dans 5 ml de milieu R et recentrifugé pour effectuer un deuxième lavage. On centrifuge de nouveau et on remet en suspension dans 1 ml de milieu R. Parallèlement, on procède de la même manière pour les deux souches filtrées isolément et qui servent de témoins pour le contrôle du taux de réversion et de mutation spontanée.

On effectue des dilutions du milieu de croisement jusqu'à 10^{-6} ; on procède de même pour les deux souches témoins.

On prélève une partie aliquote de 0,1 ml de la dilution appropriée que l'on incorpore à 4 ml de gélose blanche préalablement fondue et maintenue à 60° C et que l'on étale sur les différents milieux de sélection. Les lectures sont faites après 48 heures d'incubation à 32° dans le cas des transconjugants et des souches mères, l'apparition de recombinants n'intervient qu'après 5 à 6 jours.

VIII - MÉTHODE D'ISOLEMENT DES SOUCHES A PARTIR DE NODULES

Après infection de jeunes plantules de luzerne par les souches bactériennes et apparition des nodules, on retire la plantule du tube et on sectionne les racines de part et d'autre du nodule. Le nodule ainsi prélevé est introduit dans un tube contenant 2 ml d'une solution stérile de saccharose à 20 %. On écrase le nodule à l'aide de l'extrémité d'un agitateur stérile. Cette suspension ainsi obtenue est homogénéisée par agitation. On procède à une série de dilutions et on étale 0,1 ml de la dilution 10^{-4} sur milieu riche (RCG). Les clones apparus sont purifiés et leurs caractères sont analysés par méthode des répliques (64).

Cette méthode nous permet de détecter les souches infectieuses d'un mélange de souches ayant des marqueurs génétiques bien définis.

VIII - TESTS D'INFECTIVITÉ ET D'EFFICIENCE

Le principal intérêt des Rhizobium réside, non dans les propriétés qui leur sont inhérentes lorsqu'ils sont envisagés seuls, mais dans celles qu'ils manifestent en présence des légumineuses : c'est-à-dire leur pouvoir de nodulation et celui de fixation d'azote. La première de ces propriétés a reçu le nom "d'infectivité", la seconde "d'efficience" ; mais l'une comme l'autre inter-réagissent avec les facteurs propres à l'hôte et ne peuvent recevoir d'interprétation valable sans considération de ces facteurs.

a) Opérations préliminaires

* La stérilisation des graines de luzerne :

Elle s'effectue de la manière suivante : une centaine de graines préalablement triées est déposée dans une boîte de PETRI. On ajoute une goutte de détergent (Teepol) et on recouvre les graines de 8 ml de chlorure mercurique à 5 ‰ dans l'eau, additionnée de 12 ml d'eau distillée. On laisse agir 5 mn en agitant et ensuite on élimine cette solution stérilement au moyen d'une pipette Pasteur branchée sur une trompe à vide et passée à la flamme. Puis les graines sont rincées 10 fois à l'eau distillée stérile.

* Germination :

Les graines stérilisées sont déposées alors sur la surface d'un milieu riche (RCG glucosé) afin de contrôler la stérilité et la germination (20 graines/boîte de PETRI).

* Culture en tube :

On prend stérilement à l'aide d'une ôse les graines germées sur le milieu riche (ayant une racine d'une longueur de 1 à 2 cm) et on les place sur le support dans le tube à raison d'une plantule par tube. L'incubation est réalisée dans les conditions ambiantes du laboratoire.

* L'inoculation de la souche à tester :

Dès que les racines secondaires sont apparues, on ajoute 1 ml de suspension bactérienne dans le milieu de NICOL et THORNTON ; ces bactéries sont préalablement centrifugées, lavées et reprises dans ce milieu. Pour chaque essai, environ 10^6 bactéries par tube sont utilisées pour minimiser le risque d'une réversion.

b) Le test de l'infectivité

On dit qu'une souche bactérienne de Rhizobium est infective quand elle est capable d'infecter les racines de certaines légumineuses et d'y provoquer l'apparition de nodules. Ce caractère se note Inf^+ ; il se différencie difficilement de la spécificité d'hôte.

L'examen de chacune des souches isolées a porté sur la capacité de former ("in vitro") des nodules sur une légumineuse-test. Le principe du test est de mettre une légumineuse cultivée aseptiquement, en présence de la souche à étudier et d'observer s'il y a formation de nodules. Les tissus internes des graines étant normalement exempts de bactéries par désinfection.

c) Le test d'efficacité

L'efficacité, c'est la qualité de l'association Rhizobium - légumineuse qui aboutit à la fixation d'azote moléculaire. Par extension, c'est la qualité d'une souche de Rhizobium capable d'induire une telle association. Le symbole du caractère est représenté par Eff^+ .

Le contrôle de l'efficacité est réalisé dans les conditions suivantes : après inoculation des souches à tester, les plantules, maintenues en croissance entre 1 mois et demi et 2 mois, sont transférées dans un flacon de 150 ml fermé hermétiquement. On retire à l'aide d'une seringue 17 ml d'air du flacon que l'on remplace par 15 ml d'acétylène (qui sera éventuellement réduit par la nitrogénase) et 2 ml de propane (qui servira de témoin interne pour le dosage). Le flacon est ensuite homogénéisé par agitation manuelle et l'on prélève à l'aide d'une seringue un volume de 0,5 ml pour l'injecter dans le chromatographe en phase gazeuse (Intersmat IGC, 112 F). Ce prélèvement correspond à la quantité d'éthylène formé au temps $t = 0$.

Le flacon contenant la plantule est ensuite placé dans l'étuve à 32°. Après 7 heures d'incubation, on homogénéise de nouveau le contenu du flacon et on injecte la même quantité de gaz dans le chromatographe pour mesurer la quantité d'éthylène éventuellement produite.

La formule appliquée pour déterminer la quantité d'éthylène formé après injection de l'acétylène dans le flacon est :

$$Q = C \times K \times \frac{H_1}{H_2} \frac{(C_2H_4)}{(C_3H_8)}$$

Q = Nombre de μ moles de C_2H_4 produites dans le flacon

C = Nombre de μ moles de C_3H_8 injectées dans le flacon

$C = 1,27 \mu$ moles de C_3H_8 injectées dans le flacon

K = Coefficient de proportionnalité, $K = 1,5$ pour le rapport $\frac{C_3H_8}{C_2H_4}$

H_1 = Hauteur du pic de C_2H_4

H_2 = Hauteur du pic de C_3H_8

C_2H_4 = éthylène

C_3H_8 = propane

$$\Delta Q = Q_7 - Q_0$$

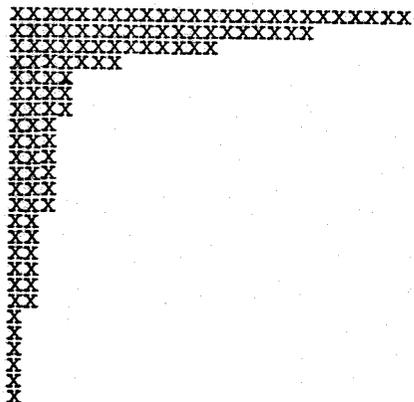
ou

Q_7 = quantité de C_2H_4 produite au temps $t = 7$ heures

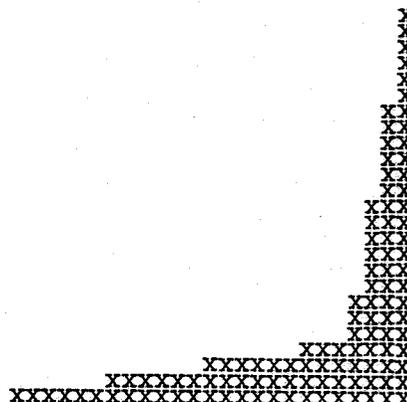
Q_0 = quantité de C_2H_4 produite au temps $t = 0$ heure

Conditions expérimentales :

- Gaz vecteur : N_2
- Température du four : $50^\circ C$
- Température d'injection : $70^\circ C$
- Température du détecteur : $115^\circ C$
- Détecteur : ionisation de flamme
- La longueur de la colonne est de 2 mètres et remplie de sphérosil X₁₀₀B₇₅
- Chromatographe : intersmat IGC, 112 F



R E S U L T A T S
E T C O M M E N T A I R E S



I - RECHERCHE DES
SOUCHES INEFFICIENTES

Le test à l'acétylène (65, 66, 67, 68, 69, 70) est utilisé dans l'évaluation de l'efficacité des souches. Ce test a contribué largement aux progrès scientifiques concernant la fixation de l'azote biologique grâce à sa spécificité pour la mise en évidence de l'action enzymatique de la nitrogénase qui est une protéine d'origine bactérienne codée par les gènes "nif".

Dans cette étude, nous avons testé les souches disponibles appartenant à la collection du laboratoire : parmi elles, on trouve des souches sauvages, des souches rendues résistantes à certains antibiotiques et des mutants à exigences métaboliques diverses.

Ce test nous a permis de savoir si ces souches sont infectieuses ou non, et d'effectuer la mesure de leur efficacité.

D'autre part, à l'aide de procédés basés sur la filtration et le traitement par des antibiotiques, nous avons pu obtenir un certain nombre de souches inefficaces. Après l'étude de souches auxotrophes, notre travail a été complété par l'analyse d'une filiation et des propriétés des révertants provenant de mutants auxotrophes inefficaces.

Les expériences réalisées sur la luzerne avec une série de souches sont toujours accompagnées d'un témoin non inoculé.

Il ne s'agit pas de faire une étude statistique de la valeur quantitative des mutants obtenus concernant la fixation de l'azote atmosphérique (par réduction de l'acétylène en éthylène) mais de chercher des clones nettement inefficaces.

1) Etude de souches sauvages

Les souches sauvages vont nous servir de témoins dans la suite des opérations. Les résultats sont résumés dans le TABLEAU I : en particulier, y sont rapportés les valeurs des poids secs moyens et le nombre de nodules d'une plantule, ainsi que la quantité en acétylène transformée en éthylène après 7 heures ; ces valeurs ont été établies deux mois après l'infection des plantules.

Il est très net que la quantité d'acétylène transformée en éthylène montre une différence considérable entre la luzerne infectée par une souche sauvage et la luzerne non infectée. La quantité d'éthylène produite en 7 heures par la souche sauvage 2011 Sm^S ($180 \cdot 10^{-2}$ μ moles) est très supérieure à celle fournie par le témoin non inoculé ($0,75 \cdot 10^{-2}$ μ moles). On constate que le poids sec moyen d'une plantule non inoculée après environ 8 semaines de culture est sensiblement égal à celui d'une plantule infectée par la souche 2011 Sm^S qui est plus efficace que les autres souches sauvages.

| Traitement des plantules de luzerne | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transformée en éthylène en 7 H | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrogénase en 7 H (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|---|--|---|------------------------------------|---|--|
| | | en μ moles/ flacon | en μ moles/ mg de poids sec | | |
| Non inoculée | 5,11 | $2,07 \cdot 10^{-2}$ | $6,75 \cdot 10^{-4}$ | | |
| Inoculée avec M_3N_1 | 6 | $24 \cdot 10^{-2}$ | $6,66 \cdot 10^{-3}$ | $5,98 \cdot 10^{-3}$ | 8 |
| Non inoculée | 7,95 | $0,11 \cdot 10^{-2}$ | $2,09 \cdot 10^{-5}$ | | |
| Inoculée avec M_9S | 13,56 | $38,79 \cdot 10^{-2}$ | $4,76 \cdot 10^{-3}$ | $4,73 \cdot 10^{-3}$ | 7 |
| Inoculée avec $M_{14}SN$ | 16,53 | $55 \cdot 10^{-2}$ | $5,54 \cdot 10^{-3}$ | $5,51 \cdot 10^{-3}$ | 6 |
| Non inoculée | 5,88 | $0,75 \cdot 10^{-2}$ | $2,12 \cdot 10^{-4}$ | | |
| Inoculée avec 2011 | 5,5 | $180 \cdot 10^{-2}$ | $5,57 \cdot 10^{-2}$ | $5,54 \cdot 10^{-2}$ | 9 |

TABLEAU I : ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE SOUCHES DE *RHIZOBIUM SAUVAGES*, MESURÉE DEUX MOIS APRÈS INFECTION DE PLANTULES DE LUZERNE.
LES MESURES D'ÉTHYLÈNE ONT ÉTÉ FAITES SUR SIX PLANTULES ENTIÈRES.



Par contre, le poids sec moyen des plantules infectées avec la souche M₉S ou la souche M₁₄SN est nettement plus important, bien que les activités nitrogénasiques observées soient plus faibles. Le nombre de nodules ne varie pas beaucoup pour l'ensemble des souches.

Signalons, en outre, que toutes les plantules infectées par les souches sauvages de Rhizobium meliloti présentent un aspect verdoyant et continuent à croître jusqu'à la fin de l'expérience alors que les plantules témoins, non inoculées, cultivées sans azote, ont commencé à montrer des symptômes de carence azotée. Les symptômes étaient très nets après 6 semaines : les feuilles sont jaunes (chlorose), les tiges sont rouges, la plante est rabougrie et la croissance retardée, aboutissant à la mort.

On constate dans l'ensemble de ces résultats, que les quantités d'acétylène réduites sont très différentes selon que les plantules ont été infectées ou non : ce test permet d'affirmer l'efficacité pour la fixation de l'azote. Par contre, les souches efficaces ne provoquent pas toujours une augmentation de poids sec des plantules infectées, dans nos conditions expérimentales ; ceci est vraisemblablement dû à la période de croissance de la plantule que nous avons dû limiter à 2 mois pour des questions de pratiques expérimentales.

L'étude du poids sec ne représente donc pas un critère convenable d'efficacité. Enfin, le nombre de nodules est intéressant à noter, mais il fait intervenir l'infectivité et non l'efficacité.

2) Etude des clones obtenus par filtration

Une première série d'expériences a consisté à tenter d'isoler des clones non muqueux qui pourraient être inefficients à partir de la souche sauvage 2011 (rendue résistante à la streptomycine et à la rifamycine pour des raisons techniques).

Après 5 filtrations successives, on a isolé :

- d'une part, 21 clones non muqueux (numérotés de C_1 à C_{21}). Les résultats du dosage de la fonction nitrogénasique par la méthode de réduction de l'acétylène sont donnés dans le TABLEAU II.
 - d'autre part, 3 clones non muqueux récoltés après 6 filtrations
 3 clones non muqueux récoltés après 7 filtrations
 6 clones non muqueux récoltés après 8 filtrations
 3 clones non muqueux récoltés après 9 filtrations
 3 clones non muqueux récoltés après 10 filtrations
- ont été étudiés (TABLEAU III) comparativement à certains clones qui sont restés muqueux après 8 filtrations comme le clone $C_V F_8$ et le clone $C_{VIII} F_8$.

On note dans le TABLEAU II que le clone C_{19} réduit faiblement l'acétylène en éthylène ($0,76 \cdot 10^{-2}$ μ moles). Les clones C_2 , C_4 , C_{12} et C_{14} présentent une quantité d'éthylène faible. Le reste des clones montre une activité nitrogénasique analogue, sinon légèrement supérieure, à celle de la souche 2011 str3 rif, excepté le clone C_8 qui manifeste une activité nitrogénasique importante.

Il ressort du TABLEAU III que les clones $C_{III} F_6$ et $C_{II} F_8$, qui donnent des quantités d'éthylène respectivement égales à $0,77 \cdot 10^{-2}$ μ moles

| Traitement des plantules de luzerne | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transformée en éthylène en 7 H | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrification en 7 H (en μ moles mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|--|--|---|------------------------------------|---|--|
| | | en μ moles/ flacon | en μ moles/ mg de poids sec | | |
| Non inoculée | 13,68 | $0,05 \cdot 10^{-2}$ | $6,09 \cdot 10^{-6}$ | | |
| Inoculée avec 2011 str ₃ rif | 12 | $11,2 \cdot 10^{-2}$ | $1,86 \cdot 10^{-3}$ | $1,85 \cdot 10^{-3}$ | 16 |
| Inoculée avec C ₁ | 12,67 | $5,68 \cdot 10^{-2}$ | $1,12 \cdot 10^{-3}$ | $1,11 \cdot 10^{-3}$ | 14 |
| Inoculée avec C ₂ | 16,15 | $1,60 \cdot 10^{-2}$ | $2,47 \cdot 10^{-4}$ | $2,40 \cdot 10^{-4}$ | 15 |
| Inoculée avec C ₃ | 15,77 | $11,33 \cdot 10^{-2}$ | $1,79 \cdot 10^{-3}$ | $1,78 \cdot 10^{-3}$ | 11 |
| Inoculée avec C ₄ | 15,87 | $3,85 \cdot 10^{-2}$ | $6,06 \cdot 10^{-4}$ | $5,99 \cdot 10^{-4}$ | 19 |
| Inoculée avec C ₅ | 18,5 | $26,57 \cdot 10^{-2}$ | $4,78 \cdot 10^{-3}$ | $4,77 \cdot 10^{-3}$ | 15 |
| Inoculée avec C ₆ | 15,67 | $12,48 \cdot 10^{-2}$ | $1,99 \cdot 10^{-3}$ | $1,98 \cdot 10^{-3}$ | 12 |
| Inoculée avec C ₇ | 22,02 | $11,74 \cdot 10^{-2}$ | $1,33 \cdot 10^{-3}$ | $1,32 \cdot 10^{-3}$ | 22 |
| Inoculée avec C ₈ | 21,65 | $93,42 \cdot 10^{-2}$ | $1,07 \cdot 10^{-2}$ | $1,06 \cdot 10^{-2}$ | 16 |
| Inoculée avec C ₉ | 18,7 | $7,28 \cdot 10^{-2}$ | $9,73 \cdot 10^{-4}$ | $9,66 \cdot 10^{-4}$ | 11 |
| Inoculée avec C ₁₀ | 24,33 | $24,43 \cdot 10^{-2}$ | $3,34 \cdot 10^{-3}$ | $3,33 \cdot 10^{-3}$ | 15 |
| Inoculée avec C ₁₁ | 13,27 | $9,47 \cdot 10^{-2}$ | $1,78 \cdot 10^{-3}$ | $1,77 \cdot 10^{-3}$ | 13 |
| Inoculée avec C ₁₂ | 13,58 | $3,37 \cdot 10^{-2}$ | $4,13 \cdot 10^{-4}$ | $4,06 \cdot 10^{-4}$ | 15 |
| Inoculée avec C ₁₃ | 17,4 | $7,11 \cdot 10^{-2}$ | $8,17 \cdot 10^{-4}$ | $8,10 \cdot 10^{-4}$ | 18 |
| Inoculée avec C ₁₄ | 16,48 | $2,65 \cdot 10^{-2}$ | $3,21 \cdot 10^{-4}$ | $3,14 \cdot 10^{-4}$ | 16 |
| Inoculée avec C ₁₅ | 18,53 | $6,12 \cdot 10^{-2}$ | $1,10 \cdot 10^{-3}$ | $1,09 \cdot 10^{-3}$ | 16 |
| Inoculée avec C ₁₆ | 19,08 | $19,11 \cdot 10^{-2}$ | $2,00 \cdot 10^{-3}$ | $1,99 \cdot 10^{-3}$ | 9 |
| Inoculée avec C ₁₇ | 19,55 | $14,68 \cdot 10^{-2}$ | $1,87 \cdot 10^{-3}$ | $1,86 \cdot 10^{-3}$ | 20 |
| Inoculée avec C ₁₈ | 17,35 | $35,19 \cdot 10^{-2}$ | $5,07 \cdot 10^{-3}$ | $5,06 \cdot 10^{-3}$ | 17 |
| Inoculée avec C ₁₉ | 12,5 | $0,76 \cdot 10^{-2}$ | $2,02 \cdot 10^{-4}$ | $1,95 \cdot 10^{-4}$ | 4 |
| Inoculée avec C ₂₀ | 21,9 | $11,23 \cdot 10^{-2}$ | $1,28 \cdot 10^{-3}$ | $1,27 \cdot 10^{-3}$ | 22 |
| Inoculée avec C ₂₁ | 16,95 | $17,71 \cdot 10^{-2}$ | $1,74 \cdot 10^{-3}$ | $1,73 \cdot 10^{-3}$ | 13 |

TABLEAU II : ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE LA COUCHE 2011 STR₃ RIF ET DES CLOUES NON MUGUEUX ISOLÉS PAR FILTRATION. ENVIRON 5 PLANTULES ONT ÉTÉ TESTÉES POUR CHAQUE ESSAI.



| Traitement des plantules de Lucerne | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transformée en éthylène en 7 h | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrification en 7 h (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|--|--|---|------------------------------------|---|--|
| | | en μ moles/ flacon | en μ moles/ mg de poids sec | | |
| Non inoculée | 19,88 | $0,43 \cdot 10^{-2}$ | $4,82 \cdot 10^{-5}$ | | |
| Inoculée avec 2011 str ₃ rif | 14,5 | $9,51 \cdot 10^{-2}$ | $1,31 \cdot 10^{-3}$ | $1,26 \cdot 10^{-3}$ | 19 |
| Inoculée avec C _I F ₆ | 14,76 | $29,4 \cdot 10^{-2}$ | $3,98 \cdot 10^{-3}$ | $3,93 \cdot 10^{-3}$ | 7 |
| Inoculée avec C _{II} F ₆ | 12,88 | $1,09 \cdot 10^{-2}$ | $1,69 \cdot 10^{-4}$ | $1,20 \cdot 10^{-4}$ | 11 |
| Inoculée avec C _{III} F ₆ | 17,7 | $0,77 \cdot 10^{-2}$ | $8,70 \cdot 10^{-5}$ | $3,88 \cdot 10^{-5}$ | 16 |
| Inoculée avec C _I F ₇ | 13,57 | $2,06 \cdot 10^{-2}$ | $3,79 \cdot 10^{-4}$ | $3,30 \cdot 10^{-4}$ | 17 |
| Inoculée avec C _{II} F ₇ | 16,34 | $86 \cdot 10^{-2}$ | $1,05 \cdot 10^{-2}$ | $1,04 \cdot 10^{-2}$ | 13 |
| Inoculée avec C _{III} F ₇ | 21,34 | $27,5 \cdot 10^{-2}$ | $2,57 \cdot 10^{-3}$ | $2,52 \cdot 10^{-3}$ | 15 |
| Inoculée avec C _I F ₈ | 17,17 | $11,2 \cdot 10^{-2}$ | $1,63 \cdot 10^{-3}$ | $1,58 \cdot 10^{-3}$ | 3 |
| Inoculée avec C _{II} F ₈ | 19,62 | $0,3 \cdot 10^{-2}$ | $3,05 \cdot 10^{-5}$ | n. n. | 3 |
| Inoculée avec C _{III} F ₈ | 55,94 | $18,5 \cdot 10^{-2}$ | $6,61 \cdot 10^{-4}$ | $6,12 \cdot 10^{-4}$ | 7 |
| Inoculée avec C _V F ₈ marqueux | 17,08 | $9,26 \cdot 10^{-2}$ | $1,08 \cdot 10^{-3}$ | $1,03 \cdot 10^{-3}$ | 9 |
| Inoculée avec C _{VI} F ₈ | 14,48 | $32,1 \cdot 10^{-2}$ | $4,43 \cdot 10^{-3}$ | $4,38 \cdot 10^{-3}$ | 5 |
| Inoculée avec C _{VII} F ₈ | 16,08 | $57,1 \cdot 10^{-2}$ | $7,10 \cdot 10^{-3}$ | $7,05 \cdot 10^{-3}$ | 10 |
| Inoculée avec C _{VIII} F ₈ marqueux | 20,8 | $24,1 \cdot 10^{-1}$ | $2,31 \cdot 10^{-3}$ | $2,26 \cdot 10^{-3}$ | 13 |
| Inoculée avec C _{IX} F ₈ | 13,2 | $5,79 \cdot 10^{-2}$ | $8,77 \cdot 10^{-4}$ | $8,28 \cdot 10^{-4}$ | 6 |
| Inoculée avec C _I F ₉ | 15,1 | $24,5 \cdot 10^{-2}$ | $3,24 \cdot 10^{-3}$ | $3,19 \cdot 10^{-3}$ | 7 |
| Inoculée avec C _{II} F ₉ | 14,14 | $13,3 \cdot 10^{-2}$ | $1,88 \cdot 10^{-3}$ | $1,83 \cdot 10^{-3}$ | 9 |
| Inoculée avec C _{III} F ₉ | 18,06 | $22,9 \cdot 10^{-2}$ | $2,53 \cdot 10^{-3}$ | $12,48 \cdot 10^{-3}$ | 10 |
| Inoculée avec C _I F ₁₀ | 19,4 | $9,22 \cdot 10^{-2}$ | $9,50 \cdot 10^{-4}$ | $9,01 \cdot 10^{-4}$ | 7 |
| Inoculée avec C _{II} F ₁₀ | 17,44 | $24,6 \cdot 10^{-2}$ | $2,82 \cdot 10^{-3}$ | $2,77 \cdot 10^{-3}$ | 7 |
| Inoculée avec C _{III} F ₁₀ | 15,52 | $63,3 \cdot 10^{-2}$ | $8,15 \cdot 10^{-3}$ | $8,10 \cdot 10^{-3}$ | 5 |

TABLEAU III : ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE LA SOUPE 2011 STR₃ RIF, DES CLOVES NON MARQUEUX AINSI QUE DES DEUX CLOVES MARQUEUX OBTENUS PAR FILTRATION.

5 PLANTULES ONT ÉTÉ UTILISÉES POUR LE DOSAGE DE L'ÉTHYLÈNE.

n. n. : quantité non mesurable



et $0,3 \cdot 10^{-2}$ μ moles, manifestent une capacité très faible pour réduire l'acétylène. Cette quantité d'éthylène est faible pour les clones $C_{II} F_6$ et $C_I F_7$. Les autres clones donnent des quantités d'éthylène sensiblement égales ou supérieures à celle produite par la souche d'origine. Les deux clones muqueux s'identifient à cette série de clones.

La technique précitée ne nous a pas donné satisfaction pour l'isolement d'un nombre appréciable de mutants non muqueux inefficients. Les trois clones inefficients, C_{19} , $C_{III} F_6$ et $C_{II} F_8$, recueillis sur l'ensemble des 39 clones non muqueux, ne présentent aucun caractère marqueur d'auxotrophie, ce qui ne nous permet pas de les utiliser dans des recherches ultérieures concernant des croisements génétiques. Pour cette raison, nous avons abandonné cette technique.

3) Etude des souches auxotrophes

Dans la littérature, il a été plusieurs fois mentionné que des mutants exigeants peuvent être inefficients.

Nous avons d'abord étudié un ensemble de souches réparties en trois séries pour lesquelles les résultats sont rapportés dans le TABLEAU IV, le TABLEAU V et le TABLEAU VI. Ces tableaux tiennent compte d'une même série de plantules non inoculées "témoin".

On remarque, dans le TABLEAU IV, que la quantité d'éthylène est trop faible pour être mesurable pour les souches A_1 , A_1a et $2011 m_9e$. En plus de ces souches nettement inefficientes, on note que les souches $2011 m_9b$, $2011 m_9c$ et $2011 m_9d$ ne réduisent que très faiblement l'acétylène, comparative-

| Traitement des plantules de luzerne | Exigences des mutants auxotrophes | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transformée en éthylène en 7 H | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrocinase en 7 H (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|---|--------------------------------------|--|---|------------------------------------|---|--|
| | | | en μ moles/ flacon | en μ moles/ mg de poids sec | | |
| Non inoculée | | 5,11 | $2,07 \cdot 10^{-2}$ | $6,74 \cdot 10^{-2}$ | | |
| Inoculée avec A | Ilv | 7,36 | $59,1 \cdot 10^{-2}$ | $1,33 \cdot 10^{-2}$ | $1,26 \cdot 10^{-2}$ | 9 |
| Inoculée avec A ₁ | Ilv - Try | 5,28 | n. m. | n. m. | n. m. | 5 |
| Inoculée avec A _{1a} | Ilv - Try - Arg | 5,86 | n. m. | n. m. | n. m. | 5 |
| Inoculée avec A _{1b} | Ilv - Try - Arg | 5,08 | $20,8 \cdot 10^{-2}$ | $6,81 \cdot 10^{-3}$ | $6,13 \cdot 10^{-3}$ | 4 |
| Inoculée avec 2011 m ₁ a | Met - Try | 6,9 | $37,8 \cdot 10^{-2}$ | $9,13 \cdot 10^{-3}$ | $8,45 \cdot 10^{-3}$ | 7 |
| Inoculée avec 2011 m ₁ b | Met - Gua | 6,01 | $17,6 \cdot 10^{-2}$ | $4,87 \cdot 10^{-3}$ | $4,19 \cdot 10^{-3}$ | 6 |
| Inoculée avec 2011 m ₁ c | Met - Ilv | 8,68 | $20,7 \cdot 10^{-2}$ | $3,97 \cdot 10^{-3}$ | $3,29 \cdot 10^{-3}$ | 9 |
| Inoculée avec 2011 m ₃ b | Pyr - Arg | 6,36 | $1,6 \cdot 10^{-2}$ | $4,18 \cdot 10^{-4}$ | n. m. | 2 |
| Inoculée avec 2011 m ₃ c | Pyr - Ilv | 5,16 | $0,4 \cdot 10^{-2}$ | $1,29 \cdot 10^{-4}$ | n. m. | 2 |
| Inoculée avec 2011 m ₃ d | Pyr - Leu | 7,15 | $10,2 \cdot 10^{-2}$ | $2,37 \cdot 10^{-3}$ | $1,69 \cdot 10^{-3}$ | 6 |
| Inoculée avec 2011 m ₃ e | Pyr - Ilv | 8,18 | n. m. | n. m. | n. m. | 6 |
| Inoculée avec 2011 i ₇ | Cyt/Met - Lac | 6,2 | $27,2 \cdot 10^{-2}$ | $7,31 \cdot 10^{-3}$ | $6,45 \cdot 10^{-3}$ | 8 |
| Inoculée avec 2011 i ₁₆ | Ade - Lac | 4,03 | $28 \cdot 10^{-2}$ | $1,15 \cdot 10^{-2}$ | $1,08 \cdot 10^{-2}$ | 8 |
| Inoculée avec 2011 i ₂₀ | Leu - Lac | 5,65 | $18,9 \cdot 10^{-2}$ | $5,57 \cdot 10^{-3}$ | $4,89 \cdot 10^{-3}$ | 7 |

TABLEAU IV : ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE MUTANTS ISSUS DES SOUCHES SAUVAGES M₅I₁ (DE A À A₁⁹) ET 2011 STR₃ (DE 2011_{m1a} À 2011_{i20})

LE TEST EST RÉALISÉ SUR 6 PLANTULES ENTÈRES.

n. m. : quantité non mesurable

Ilv. : Isoleucine valine ; Try : Tryptophane ; Arg : Arginine ; Met : Méthionine ; Gua : Guanine ;

Pyr : Pyrimidine ; Leu : Leucine ; Cyt : Cytosine ; Lac : Lactose ; Ade : Adénine



| Traitement des plantules de luzerne | Exigences des souches auxotrophes | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transformée en éthylène en 7 H | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrogénase en 7 H (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|---|--------------------------------------|--|---|------------------------------------|---|--|
| | | | en μ moles/ flacon | en μ moles/ mg de poids sec | | |
| Non inoculée | | 5,88 | $0,75 \cdot 10^{-2}$ | $2,12 \cdot 10^{-4}$ | | |
| Inoculée avec 2011 m ₁ | Met | 6,76 | $242 \cdot 10^{-2}$ | $5,96 \cdot 10^{-2}$ | $5,93 \cdot 10^{-2}$ | 8 |
| Inoculée avec 2011 m ₂ | Ada | 4,38 | $111 \cdot 10^{-2}$ | $4,22 \cdot 10^{-2}$ | $4,19 \cdot 10^{-2}$ | 4 |
| Inoculée avec 2011 m ₃ | Try | 4,21 | $49,3 \cdot 10^{-2}$ | $1,94 \cdot 10^{-2}$ | $1,91 \cdot 10^{-2}$ | 5 |
| Inoculée avec 2011 m ₄ | Gly | 5,2 | $130 \cdot 10^{-2}$ | $4,16 \cdot 10^{-2}$ | $4,13 \cdot 10^{-2}$ | 5 |
| Inoculée avec 2011 m ₅ | Auxotrophe non déterminé | 4,6 | $150 \cdot 10^{-2}$ | $5,43 \cdot 10^{-2}$ | $5,40 \cdot 10^{-2}$ | 4 |
| Inoculée avec 2011 m ₆ | Auxotrophe non déterminé | 7,31 | $127 \cdot 10^{-2}$ | $2,89 \cdot 10^{-2}$ | $2,86 \cdot 10^{-2}$ | 11 |
| Inoculée avec 2011 m ₇ | Auxotrophe non déterminé | 3,76 | $152 \cdot 10^{-2}$ | $6,72 \cdot 10^{-2}$ | $6,69 \cdot 10^{-2}$ | 6 |
| Inoculée avec 2011 m ₈ | Ada | 4,45 | $32,2 \cdot 10^{-2}$ | $8,68 \cdot 10^{-3}$ | $8,46 \cdot 10^{-3}$ | 5 |
| Inoculée avec 2011 m ₉ | Pyr | 4,88 | $43,6 \cdot 10^{-2}$ | $1,48 \cdot 10^{-2}$ | $1,45 \cdot 10^{-2}$ | 5 |
| Inoculée avec 2011 m ₁₂ | Leu | 4,86 | $29,9 \cdot 10^{-2}$ | $1,02 \cdot 10^{-2}$ | $9,98 \cdot 10^{-3}$ | 7 |

TABLEAU V : MESURE DE L'EFFICACITÉ DES SIMPLES MUTANTS ISSUS DE LA SOUCHE 2011 AYANT ACQUIS LE CARACTÈRE DE RÉSISTANCE À LA STREPTOMYCINE.

LE TEST EST RÉALISÉ SUR 6 PLANTULES-ENTIÈRES.

Gly : Glycocolle ; pour les autres abréviations, voir tableau IV



| Traitement des plantules de luzerne | Exigences des mutants auxotrophes | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transmise en éthylène en 7 H | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrémie en 7 H (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nécules par plantule |
|---|--------------------------------------|--|---|------------------------------------|--|--|
| | | | en μ moles/ flacon | en μ moles/ mg de poids sec | | |
| Non inoculée | | 7,95 | $0,11 \cdot 10^{-2}$ | $2,30 \cdot 10^{-5}$ | | |
| Inoculée avec 2011 ₁ | Lac - Ilv | 10,18 | $42,2 \cdot 10^{-2}$ | $6,90 \cdot 10^{-3}$ | $6,87 \cdot 10^{-3}$ | 7 |
| Inoculée avec 2011 ₃ | Tyr - Lac | 9,2 | $21,9 \cdot 10^{-2}$ | $3,96 \cdot 10^{-3}$ | $3,93 \cdot 10^{-3}$ | 17 |
| Inoculée avec 2011 ₄ | Adc - Lac | 9,25 | $41,2 \cdot 10^{-2}$ | $7,42 \cdot 10^{-3}$ | $7,39 \cdot 10^{-3}$ | 6 |
| Inoculée avec 2011 ₁₀ | Arg - Lac | 9,05 | $37,2 \cdot 10^{-2}$ | $6,85 \cdot 10^{-3}$ | $6,82 \cdot 10^{-3}$ | 7 |
| Inoculée avec 2011 ₁₁ | Auxotrophe non déterminé | 7,85 | $12,9 \cdot 10^{-2}$ | $2,73 \cdot 10^{-3}$ | $2,70 \cdot 10^{-3}$ | 5 |
| Inoculée avec 2011 ₁₂ | Adc - Lac | 5,9 | $27,8 \cdot 10^{-2}$ | $7,85 \cdot 10^{-3}$ | $7,82 \cdot 10^{-3}$ | 6 |
| Inoculée avec 2011 ₁₅ | Adc - Lac | 8,1 | $27,8 \cdot 10^{-2}$ | $5,72 \cdot 10^{-3}$ | $5,69 \cdot 10^{-3}$ | 6 |
| Inoculée avec 2011 ₁₇ | Adc - Lac | 9,85 | $26,1 \cdot 10^{-2}$ | $4,41 \cdot 10^{-3}$ | $4,38 \cdot 10^{-3}$ | 4 |
| Inoculée avec 2011 ₂₂ | Met - Lac | 9,13 | $34,4 \cdot 10^{-2}$ | $6,27 \cdot 10^{-3}$ | $6,24 \cdot 10^{-3}$ | 8 |
| Inoculée avec 2011 ₉ ₁ | Pyr - Lac | 10,41 | $34,2 \cdot 10^{-2}$ | $5,47 \cdot 10^{-3}$ | $5,44 \cdot 10^{-3}$ | 5 |
| Inoculée avec M ₁₄ ^m ₂ | Met / Leu | 9,33 | $13,6 \cdot 10^{-2}$ | $2,42 \cdot 10^{-3}$ | $2,39 \cdot 10^{-3}$ | 5 |
| Inoculée avec M ₁₄ ^m ₃ | Adc | 7,5 | $19,5 \cdot 10^{-2}$ | $4,33 \cdot 10^{-3}$ | $4,30 \cdot 10^{-3}$ | 4 |
| Inoculée avec M ₉ S _m ₃ | Adc | 9,3 | $12,4 \cdot 10^{-2}$ | $2,22 \cdot 10^{-3}$ | $2,19 \cdot 10^{-3}$ | 7 |
| Inoculée avec M ₉ S _m ₅ | Adc | 7,91 | $6,5 \cdot 10^{-2}$ | $1,36 \cdot 10^{-3}$ | $1,33 \cdot 10^{-3}$ | 6 |

TABLEAU VI : DÉTERMINATION DE L'EFFICIENCE DES CLONES ISSUS DE LA SOUCHE 2011 STR₃ (DE 2011₁₁ À 2011₉₁) ;

DES CLONES ISSUS DE LA SOUCHE M₉S (M₉S_m₃ ET M₉S_m₅) ;
ET DES CLONES ISSUS DE LA SOUCHE M₁₄SN (M₁₄^m₂ ET M₁₄^m₃)

LE NOMBRE DE PLANTULES UTILISÉES POUR LE TEST CORRESPOND À 6.

Tyr : Tyrosine ; pour les autres abréviations, voir tableaux IV et V.



ment à la souche sauvage 2011 Sm^S. Des analyses ultérieures des souches A₁a et 2011 mgd confirment clairement leur inefficience (TABLEAUX VIII et IX).

Les souches mutantes citées dans le TABLEAU V sont obtenues par une mutation unique de la souche 2011 Sm^S ainsi rendue résistante à la streptomycine (2011 Str₃). La quantité d'éthylène formée par ces mutants est assez importante et parfois légèrement supérieure (avec la souche 2011 m₁ : $242 \cdot 10^{-2}$ μ moles) à celle produite par la souche mère.

Dans le TABLEAU VI, figurent les résultats obtenus avec les clones (2011 i₁ à 2011 m₉i) dérivant de la souche 2011 Str₃ par deux mutations successives. Ces clones montrent une activité nitrogénasique relativement moins importante que celle de leur souche d'origine. Les souches M₉ Sm₃ et M₉ Sm₅ issues de la souche M₉S, ainsi que les souches M₁₄ m₂ et M₁₄ m₃ issues de la souche M₁₄SN donnent une quantité d'éthylène du même ordre de grandeur que leurs souches d'origine. On remarque, dans le cas des souches inefficentes, que les nodules se forment tardivement, ils sont petits, parfois nombreux et pâles ou bien peu nombreux mais plus volumineux et d'aspect spongieux. L'état des plantules infectées par les souches inefficentes est analogue à celui des plantes témoins, c'est-à-dire qu'on retrouve les mêmes symptômes déjà mentionnés pour la luzerne non infectée.

Devant le faible nombre de mutants auxotrophes inefficents trouvé, nous avons tenté de rendre quelques clones résistants à la viomycine, caractère qui semblerait lié à l'inefficience, pour augmenter le degré d'inefficience. Les résultats obtenus sont indiqués dans le TABLEAU VII. Les mutants résistants à la viomycine transforment l'acétylène en éthylène moins bien que les souches dont ils sont issus ; la souche 2011 i₂₀ Vio₁₀₀ est la seule

| Traitement des plantules de luzerne | Exigences des mutants autotrophes | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transformée en éthylène en 7 H | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrocinase en 7 H (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|--|--------------------------------------|--|---|------------------------------------|---|--|
| | | | en μ moles/ flacon | en μ moles/ mg de poids sec | | |
| Non inoculée | | 38,85 | $0,04 \cdot 10^{-2}$ | $3,00 \cdot 10^{-6}$ | | |
| Non inoculée + Azote | | 13,48 | $0,07 \cdot 10^{-2}$ | $2,96 \cdot 10^{-6}$ | | |
| Inoculée avec 2011 m ₉ c | Pyr - Ilv | 12,43 | $0,62 \cdot 10^{-2}$ | $6,23 \cdot 10^{-5}$ | $5,93 \cdot 10^{-5}$ | 13 |
| Inoculée avec 2011 m ₉ c V10,100 | Pyr - Ilv | 14,3 | $0,06 \cdot 10^{-2}$ | $6,99 \cdot 10^{-6}$ | $4,03 \cdot 10^{-6}$ | 12 |
| Inoculée avec 2011 m ₉ e | Pyr - Ilv | 12,86 | $0,12 \cdot 10^{-2}$ | $1,55 \cdot 10^{-5}$ | $1,25 \cdot 10^{-5}$ | 4 |
| Inoculée avec 2011 m ₉ e V10,150 | Pyr - Ilv | 12,28 | $0,06 \cdot 10^{-2}$ | $8,14 \cdot 10^{-6}$ | $5,18 \cdot 10^{-6}$ | 8 |
| Inoculée avec 2011,20 | Leu - Lac | 13,85 | $16,1 \cdot 10^{-2}$ | $1,16 \cdot 10^{-3}$ | $1,15 \cdot 10^{-3}$ | 16 |
| Inoculée avec 2011,20 V10,100 | Leu - Lac | 13,12 | $10,8 \cdot 10^{-2}$ | $1,64 \cdot 10^{-3}$ | $1,63 \cdot 10^{-3}$ | 27 |

TABLEAU VII : ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE CERTAINES SOUCHES REJUES RÉSISTANTES À LA VIOMYCINE.
LES BACTÉRIES SONT PRÉ-CULTIVÉES EN PRÉSENCE DE VIOMYCINE AVANT L'INOCULATION DE LA LUZERNE.
EN MOYENNE, 7 PLANTULES ONT ÉTÉ TESTÉES PAR SOUCHE.

Pour les abréviations, voir les tableaux précédents.



exception puisque la quantité d'éthylène obtenue est la même que pour la souche 2011₂₀.

Comme l'isolement des mutants résistants à la viomycine était très délicat à pratiquer, nous n'avons pas poursuivi ces études.

L'inefficience très nette de certains mutants auxotrophes n'est-elle pas due à leur exigence en un facteur qui leur manque au cours de leur développement dans le nodule ?

Il est difficile de comparer valablement l'efficience d'une souche prototrophe avec ses mutants auxotrophes, auxquels un facteur peut manquer pour exprimer ses potentialités à fixer l'azote. C'est pourquoi nous avons testé l'efficience de nos mutants auxotrophes "inefficients" en présence de facteurs indispensables à leurs biosynthèses.

Le TABLEAU VIII montre la stabilité de la souche A₁a qui reste inefficente même en présence de ses facteurs de croissance : les quantités d'éthylène produites par cette souche sont faibles et sensiblement du même ordre de grandeur en présence de ses exigences ($2,81 \cdot 10^{-2}$ μ moles) aussi bien qu'en leur absence ($1,80 \cdot 10^{-2}$ μ moles). De même, le mutant 2011 m₉d se comporte de façon identique en présence, ou en absence, de ses exigences : les quantités d'éthylène produites par ce mutant sont approximativement égales en présence de Leucine ($1,47 \cdot 10^{-2}$ μ moles) qu'en son absence ($1,98 \cdot 10^{-2}$ μ moles). On note par contre, pour la souche A₁, une augmentation nette de la production d'éthylène lorsqu'on lui ajoute son exigence.

L'ensemble de ces résultats indique que les souches A₁a et 2011 m₉d restent inefficentes en présence du facteur exigé pour leur croissance, alors que cette addition a des effets variables sur la souche A₁.

| Traitement des plantules de luzerne | Exigences des souches mutantes | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transformée en éthylène en 7 H | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrofixase en 7 H (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|---|-----------------------------------|--|---|------------------------------------|---|--|
| | | | en μ moles/ flacon | en μ moles/ mg de poids sec | | |
| Non inoculée | | 6,11 | $0,11 \cdot 10^{-2}$ | $1,80 \cdot 10^{-5}$ | | |
| Non inoculée + Try | | 6,98 | $0,15 \cdot 10^{-2}$ | $3,57 \cdot 10^{-5}$ | $1,77 \cdot 10^{-5}$ | |
| Non inoculée + Try + Arg | | 7,51 | $1,54 \cdot 10^{-2}$ | $3,41 \cdot 10^{-4}$ | $3,23 \cdot 10^{-4}$ | |
| Non inoculée + Leu | | 9,51 | $0,03 \cdot 10^{-2}$ | $5,25 \cdot 10^{-6}$ | n. m. | |
| Inoculée avec A_1 | Ilv - Try | 7,88 | $33,9 \cdot 10^{-2}$ | $7,16 \cdot 10^{-3}$ | $7,14 \cdot 10^{-3}$ | 6 |
| Inoculée avec A_1 + Try | Ilv - Try | 7,18 | 1,00 | $2,32 \cdot 10^{-2}$ | $2,31 \cdot 10^{-2}$ | 5 |
| Inoculée avec $A_1 a$ | Ilv - Try - Arg | 8,35 | $1,80 \cdot 10^{-2}$ | $3,59 \cdot 10^{-4}$ | $3,41 \cdot 10^{-4}$ | 8 |
| Inoculée avec $A_1 a$ + Try + Arg | Ilv - Try - Arg | 5,35 | $2,81 \cdot 10^{-2}$ | $6,75 \cdot 10^{-4}$ | $8,57 \cdot 10^{-4}$ | 9 |
| Inoculée avec 2011 $n_{y d}$ | Pyr - Leu | 5,65 | $1,98 \cdot 10^{-2}$ | $5,84 \cdot 10^{-4}$ | $5,66 \cdot 10^{-4}$ | 15 |
| Inoculée avec 2011 $n_{y d}$ + Leu | Pyr - Leu | 7,25 | $1,47 \cdot 10^{-2}$ | $3,37 \cdot 10^{-4}$ | $3,19 \cdot 10^{-4}$ | 23 |

TABLEAU VIII : DOSAGE DE L'EFFICIENCE DES SOUCHES "INEFFICIENTES" EN PRÉSENCE ET EN ABSENCE DE LEURS EXIGENCES.
LES EXIGENCES SONT AJOUTÉES À RAISON DE 10 μ G/ML DE MILIEU.
SIX PLANTULES SONT TESTÉES.

Pour les abréviations : voir tableaux IV et V





FIGURE 8 : ASPECT DES PLANTULES DE LUZERNE INFECTÉES PAR :
 A) LA SOUCHE INEFFICIENTE 2011 MgD
 B) LA SOUCHE EFFICIENTE 2011 Mg
 ON VOIT NETTEMENT LA PRÉSENCE DE NODULES RACINAIRES



FIGURE 9 : ASPECT DES PLANTULES DE LUZERNE CULTIVÉES DANS LE MILIEU DE NICOL ET THORNTON. ON REMARQUE L'ASPECT VERDOYANT DES PLANTULES CULTIVÉES SUR MILIEU AZOTÉE ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$) A) ; ET CELLES INFECTÉES AVEC LA SOUCHE EFFICIENTE 2011 Mg C). LES PLANTES CULTIVÉES SANS SOURCE D'AZOTE B) ; AINSI QUE CELLES NODULÉES PAR LA SOUCHE INEFFICIENTE 2011 MgD AVEC SON EXIGENCE LEUCINE E) ; ET SANS EXIGENCE D) ; SONT CHÉTIVES ET MANQUENT DE CHLOROPHYLLE.

4) Etude de filiations et de révertants

Dans les résultats précédemment donnés, on constate que parmi les mutants auxotrophes, quelques uns sont inefficients. L'ensemble de ces mutants provient de mutations successives, à partir de quelques souches sauvages. Il nous a paru intéressant d'étudier, non plus au hasard, ces mutants pour leur efficacité, mais selon leur filiation de mutagenèse et de voir l'activité des mutants réverses.

Les schémas suivants montrent la filiation des souches inefficientes obtenues.

| | | | |
|---------|-----------|---|-----------------|
| | M_5N_1 | : | sauvage |
| | A | : | Ilv |
| | A_1 | : | Ilv Try |
| A_1^b | A_1^a | : | Ilv Try Arg |
| | $A_1^a_1$ | : | Ilv Try Arg Ser |

FILIATION I conduisant à la souche inefficiente A_1^a .

| | | | |
|------|---------|---|------------------------------|
| 2011 | Str_3 | : | résistant à la streptomycine |
| 2011 | m_9 | : | Pyr |
| 2011 | m_9^d | : | Pyr Leu |

FILIATION II aboutissant à la souche inefficiente 2011 m_9^d .

Dans la filiation I, à partir de la souche M_5N_1 prototrophe qui est capable de fournir un taux en éthylène très important, on a isolé le clone A obtenu par une première mutation qui porte sur le caractère isoleucine valine et qui est capable de donner aussi une quantité d'éthylène assez importante ($46,2 \cdot 10^{-2} \mu$ moles). Le mutant A_1 est obtenu à partir de A par une seconde mutation sur le caractère tryptophane ; ce mutant montre une quantité d'éthylène faible ($15,1 \cdot 10^{-2} \mu$ moles) par rapport à celle de la souche sauvage ($103 \cdot 10^{-2} \mu$ moles).

Les mutants A_1a et A_1b sont obtenus à la suite d'une troisième mutation portant sur le caractère arginine. On note l'inefficience nette de la souche A_1a ; par contre, la souche A_1b présente une quantité d'éthylène ($25,2 \cdot 10^{-2} \mu$ moles) supérieure à celle produite par la souche A_1 . Cependant, la souche A_1a_1 est moins inefficente que la souche A_1a .

Quant à la filiation II, qui comporte la souche 2011 Str₃ et ses dérivés, on constate que la souche 2011 m₉d qui ne donne pas une quantité d'éthylène mesurable ; elle manifeste naturellement son inefficience vis-à-vis de la souche 2011 m₉ ($66,6 \cdot 10^{-2} \mu$ moles) dont elle dérive immédiatement et qui présente une activité nitrogénasique du même ordre de grandeur que celle de la souche mère 2011 Str₃ ($93 \cdot 10^{-2} \mu$ moles).

A partir de la souche inefficente A_1a str rif qui est mutée sur trois caractères (isoleucine-valine, tryptophane et arginine), on a isolé en premier lieu des révertants portant sur chacun d'eux (3 clones par caractère).

| Traitement des plantules de luzerne | Exigences des clones mutants | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transformée en éthylène en 7 H | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrofixation en 7 H (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|--|---------------------------------|--|---|------------------------------------|---|--|
| | | | en μ moles/ flacon | en μ moles/ mg de poids sec | | |
| Non inoculée | | 19,65 | $0,02 \cdot 10^{-2}$ | $1,11 \cdot 10^{-6}$ | | |
| Non inoculée + Azote | | 32,08 | $16,8 \cdot 10^{-2}$ | $5,23 \cdot 10^{-4}$ | $5,21 \cdot 10^{-4}$ | |
| Inoculée avec 2011 Str ₃ | Prototrophe | 30,86 | $93,0 \cdot 10^{-2}$ | $3,01 \cdot 10^{-3}$ | $3,00 \cdot 10^{-3}$ | 16 |
| Inoculée avec 2011 (Str ₄) | Prototrophe | 26,08 | $143 \cdot 10^{-2}$ | $4,98 \cdot 10^{-3}$ | $4,97 \cdot 10^{-3}$ | 17 |
| Inoculée avec 2011 m ₉ | Pyr | 23,68 | $66,6 \cdot 10^{-2}$ | $2,81 \cdot 10^{-3}$ | $2,80 \cdot 10^{-3}$ | 13 |
| Inoculée avec 2011 m _{3d} | Pyr - Leu | 22,59 | n. m. | n. m. | n. m. | 9 |
| Inoculée avec M ₅ N ₁ | Prototrophe | 30,36 | $103 \cdot 10^{-2}$ | $3,39 \cdot 10^{-3}$ | $3,38 \cdot 10^{-3}$ | 16 |
| Inoculée avec M ₅ N ₁ (Str ₄) | Prototrophe | 26,12 | $65,8 \cdot 10^{-2}$ | $2,51 \cdot 10^{-3}$ | $2,50 \cdot 10^{-3}$ | 17 |
| Inoculée avec A | Ilv | 21,84 | $46,2 \cdot 10^{-2}$ | $2,11 \cdot 10^{-3}$ | $2,10 \cdot 10^{-3}$ | 13 |
| Inoculée avec A ₁ | Ilv - Try | 20,54 | $15,1 \cdot 10^{-2}$ | $6,68 \cdot 10^{-4}$ | $6,66 \cdot 10^{-4}$ | 6 |
| Inoculée avec A _{1a} | Ilv - Try - Arg | 19,92 | $0,99 \cdot 10^{-2}$ | $4,96 \cdot 10^{-5}$ | $4,84 \cdot 10^{-5}$ | 12 |
| Inoculée avec A _{1b} | Ilv - Try - Arg | 19,23 | $25,2 \cdot 10^{-2}$ | $2,18 \cdot 10^{-3}$ | $2,17 \cdot 10^{-3}$ | 16 |
| Inoculée avec A _{1a1} | Ilv - Try - Arg - Ser | 22 | $5,92 \cdot 10^{-2}$ | $2,67 \cdot 10^{-4}$ | $2,65 \cdot 10^{-4}$ | 12 |

TABLEAU IX : MESURE DE L'EFFICIENCE DE LA FILIATION DES CLONES INEFFICIENTS DÉJÀ TESTÉS.
NOMBRE DE PLANTULES TESTÉES : 10.

Pour les abréviations : voir tableaux IV et V



Cette sélection est réalisée à la suite de cultures successives sur milieu riche et étalement sur milieu minimum additionné des aminoacides correspondants. Le schéma récapitulatif suivant précise les caractères des différents clones.

ISOLEMENT DES REVERTANTS

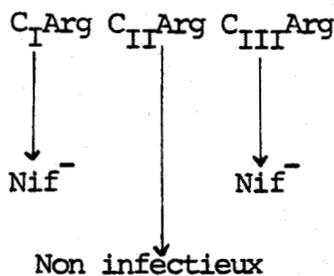
Schéma récapitulatif

Souche de départ : $A_1 a \text{ str rif}$ (souche inefficente : Nif^-)

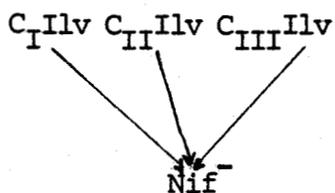
Exigences :
 - Arginine
 - Isoleucine-valine
 - Tryptophane

Cultures successives

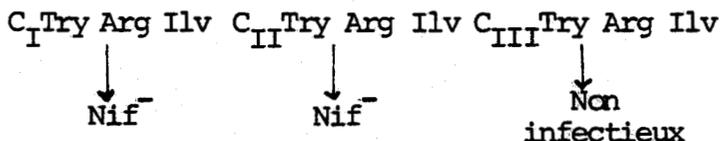
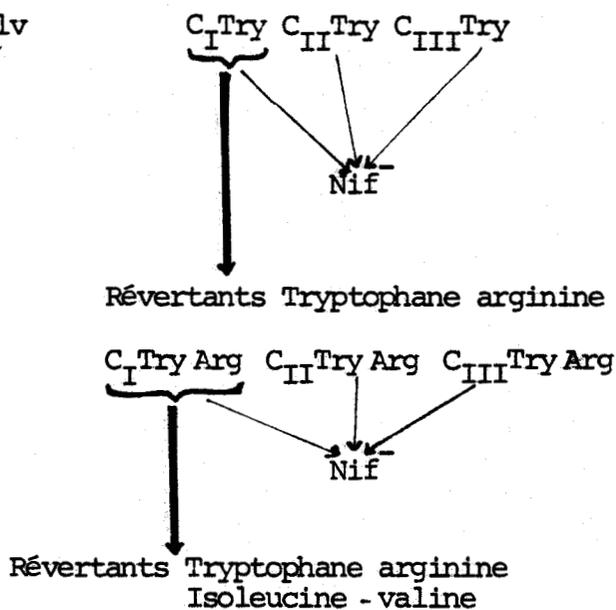
Révertants Arginine



Révertants Isoleucine-valine



Révertants Tryptophane



Les clones testés sur des plantules de luzerne s'avèrent inefficients (TABLEAU X). Le clone C_{II}^{Arg} qui a réversé sur l'arginine n'infecte pas les plantules. On a récolté à partir du clone C_I^{Try} (réversion sur le caractère tryptophane) d'autres révertants où la réversion a porté sur le caractère arginine : on a isolé ainsi trois clones qui ont réversé sur les caractères tryptophane et arginine : il s'agit des clones $C_I^{Try Arg}$, $C_{II}^{Try Arg}$ et $C_{III}^{Try Arg}$. Leur analyse fait toujours apparaître une incapacité de produire l'éthylène à partir de l'acétylène.

A partir du clone Rev $C_I^{Try Arg}$, on a recueilli d'autres révertants : cette réversion est localisée sur le gène Isoleucine-valine ; ce retour à la prototrophie montre pour les clones $C_I^{Try Arg Ilv}$ et $C_{II}^{Try Arg Ilv}$ une production d'éthylène très faible attestant leur inefficience.

Le clone $C_{III}^{Try Arg Ilv}$ est de plus non infectieux.

Par ailleurs, trois autres clones ont été isolés à partir de la souche A_1a str rif : les résultats obtenus figurent au bas du TABLEAU X. L'isolement a été réalisé sur milieu minimum gélosé additionné des deux antibiotiques (sans sélection des étapes intermédiaires). Ce retour global à la prototrophie nous informe, excepté le clone $C_I^{Arg Ilv Try}$ non infectieux, que les clones $C_{II}^{Arg Ilv Try}$ et $C_{III}^{Arg Ilv Try}$ ont une activité de réduction de l'acétylène non mesurable, qui reflète bien leur inefficience.

La perte, par reversion, des différentes exigences ne modifie donc en rien l'inefficience du mutant A_1a str rif.

| Traitement des plantules de luzerne | Réversion sur les caractères | Poids sec moyen d'une plantule | Quantité totale d'acétylène transformée en éthylène en 7 H | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrocellulose en 7 H (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|---|---|--|---|------------------------------------|--|--|
| | | | en μ moles/ flacon | en μ moles/ mg de poids sec | | |
| Non inoculée | | 17,78 | $1,78 \cdot 10^{-2}$ | $2,00 \cdot 10^{-4}$ | | |
| Inoculée avec X A.a str rif | | 17,76 | $0,37 \cdot 10^{-2}$ | $2,05 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 8 |
| Inoculée avec X Rev C _I Arg | Arginine | 20,04 | $1,17 \cdot 10^{-2}$ | $1,16 \cdot 10^{-4}$ | n. m. | 12 |
| Inoculée avec X Rev C _{II} Arg | Arginine | 16,85 | n. m. | n. m. | n. m. | 0 |
| Inoculée avec X Rev C _{III} Arg | Arginine | 16,2 | n. m. | n. m. | n. m. | 8 |
| Inoculée avec X Rev C _I Ilv | Isoleucine - valine | 17,32 | $1,64 \cdot 10^{-2}$ | $1,89 \cdot 10^{-4}$ | n. m. | 10 |
| Inoculée avec X Rev C _{II} Ilv | Isoleucine - valine | 17,25 | $1,35 \cdot 10^{-2}$ | $1,95 \cdot 10^{-4}$ | n. m. | 5 |
| Inoculée avec X Rev C _{III} Ilv | Isoleucine - valine | 19,02 | $0,6 \cdot 10^{-2}$ | $7,88 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 8 |
| Inoculée avec X Rev C _I Try | Tryptophane | 21,04 | $2,6 \cdot 10^{-2}$ | $2,42 \cdot 10^{-4}$ | $4,2 \cdot 10^{-5}$ | 7 |
| Inoculée avec X Rev C _{II} Try | Tryptophane | 25,96 | $1,93 \cdot 10^{-2}$ | $1,48 \cdot 10^{-4}$ | n. m. | 6 |
| Inoculée avec X Rev C _{III} Try | Tryptophane | 11,62 | $2,88 \cdot 10^{-2}$ | $4,95 \cdot 10^{-4}$ | $2,95 \cdot 10^{-4}$ | 2 |
| Inoculée avec Rev C _I Try Arg | Tryptophane Arginine | 17,16 | $4,41 \cdot 10^{-2}$ | $5,13 \cdot 10^{-4}$ | $3,13 \cdot 10^{-4}$ | 7 |
| Inoculée avec Rev C _{II} Try Arg | Tryptophane Arginine | 19,82 | $3,24 \cdot 10^{-2}$ | $4,08 \cdot 10^{-4}$ | $2,08 \cdot 10^{-4}$ | 5 |
| Inoculée avec Rev C _{III} Try Arg | Tryptophane Arginine | 23,44 | $2,54 \cdot 10^{-2}$ | $2,16 \cdot 10^{-4}$ | $1,60 \cdot 10^{-5}$ | 6 |
| Inoculée avec Rev C _I Try Arg Ilv | Tryptophane Arginine Isoleucine - valine | 23,03 | $1,86 \cdot 10^{-2}$ | $2,69 \cdot 10^{-4}$ | $6,9 \cdot 10^{-5}$ | 11 |
| Inoculée avec Rev C _{II} Try Arg Ilv | Tryptophane Arginine Isoleucine - valine | 8,5 | $3,66 \cdot 10^{-2}$ | $1,07 \cdot 10^{-3}$ | $8,7 \cdot 10^{-4}$ | 4 |
| Inoculée avec Rev C _{III} Try Arg Ilv | Tryptophane Arginine Isoleucine - valine | 14,2 | n. m. | n. m. | n. m. | 0 |
| Inoculée avec Rev C _I Arg Ilv Try | Arginine Isoleucine valine Tryptophane | 5,72 | $1,98 \cdot 10^{-2}$ | $6,92 \cdot 10^{-4}$ | $4,92 \cdot 10^{-4}$ | 0 |
| Inoculée avec Rev C _{II} Arg Ilv Try | Arginine Isoleucine valine Tryptophane | 24,86 | $0,53 \cdot 10^{-2}$ | $4,26 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 15 |
| Inoculée avec Rev C _{III} Arg Ilv Try | Arginine Isoleucine valine Tryptophane | 15,82 | $0,43 \cdot 10^{-2}$ | $5,43 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 1 |

TABLEAU X : ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DES RÉVERTANTS ISSUS DE LA SOUCHE TÉMOIN A₁ STR RIF.
CE TEST EST EFFECTUÉ SUR 5 PLANTULES ENTIÈRES.

Rev : Révertant ; X : Clones ayant été testés 2 fois

Les trois dernières lignes correspondent aux révertants isolés à partir de la souche A₁ str rif après sélection des étapes intermédiaires.



DISCUSSION

L'efficience caractérise la capacité des deux partenaires (Rhizobium et légumineuse) à réduire l'azote atmosphérique. Cette efficience caractéristique d'une souche donnée de Rhizobium n'est pas une propriété immuable. Comme les caractères cultureux et physiologiques, elle peut être tributaire de phénomènes de variations. Ces dernières sont dues à plusieurs facteurs liés aux conditions expérimentales et au matériel utilisé. Les difficultés d'interprétation sont dues à l'expérimentation qui porte sur l'association de deux partenaires appartenant à des règnes différents.

Pour contrôler de façon précise l'infectivité et l'efficience, il est indispensable de maîtriser toutes les conditions physico-chimiques requises au bon développement de la bactérie et de la plante hôte. Dans notre expérimentation, les conditions de milieu semblent être satisfaisantes. Par contre, les conditions physiques de cultures végétales ont été variables : les fluctuations naturelles de la température, de l'éclairage et de l'humidité sont susceptibles d'apporter des changements considérables dans la croissance de la luzerne. Quand les conditions de culture sont excellentes, on constate que les plantes se développent convenablement dès la germination des graines, la luzerne s'épanouit dans le tube entier et son aspect est verdoyant ; après infection par Rhizobium elle présente des nodules plus ou moins développés et précoces, selon que la souche est efficiente ou non ; de même, le poids et la quantité d'éthylène formée fluctuent en fonction de la souche utilisée. Par contre, dans de mauvaises conditions, la croissance est moins bonne dès le début du développement de la plante ; dans ce cas, celle-ci

peut dépérir avant que la symbiose par inoculation d'une souche efficiente ne se manifeste : les nodules sont alors petits, blanchâtres et leur activité de réduction de l'acétylène est très faible. Dans nos essais, nous avons toujours réalisé des séries d'expérimentations dans des conditions identiques pour pouvoir comparer les résultats obtenus.

Il est toutefois impossible de détecter l'efficiencia des nodules d'après les différences de croissance et de développement entre plantes inoculées et plantes témoins, d'autant plus que cette croissance est limitée dans le temps : nous avons suivi pendant 2 mois les cultures de plantules de luzerne. Il faut signaler que parfois les plantes non inoculées en milieu sans azote ont une croissance comparable à celle des plantes inoculées après 2 mois de culture, ceci est vraisemblablement dû à l'importance des réserves azotées présentes dans les graines (71). Un tel phénomène complique la détermination de l'efficiencia d'une souche donnée.

En outre, certaines graines manifestent une résistance à l'infection : en effet, on note dans certains cas l'absence de formation de nodules qui peut s'expliquer par l'utilisation de lignées de plantes résistantes à l'infection (72,73). NUTMAN a prouvé qu'avec une même souche de Rhizobium trifolii, le nombre de nodules formés sur trèfle différait beaucoup suivant la constitution génétique de l'hôte. Il précisa ces notions en établissant qu'il existait, sur la racine, un nombre limité de loci capables de donner naissance à des nodules (74, 75). Ces éléments de variabilité nous ont amené à interpréter avec précaution les valeurs de poids sec des plantules inoculées ou des plantules témoins et, dans bien des cas, à ne pas en tenir compte comme critère d'efficiencia.

Le test à l'acétylène, qui consiste à doser une quantité d'éthylène formée à partir d'une quantité initiale d'acétylène, est sujet à des erreurs d'ordre expérimental. Les erreurs peuvent porter sur la mesure des volumes d'acétylène et de propane ajoutés à l'aide d'une seringue dans le flacon ; de même, l'homogénéisation des divers gaz dans ce dernier, ainsi que la mesure des volumes injectés dans le chromatographe aux temps t_0 et t_7 (après 7 heures d'incubation) peuvent entraîner des erreurs expérimentales. En plus de ces variations opératoires, un manque de précision s'explique par la faible sensibilité de cette méthode de détermination de quantités infimes d'éthylène, d'autant plus qu'on utilise un nombre réduit de plantules (5 ou 6 en moyenne).

Malgré toutes ces difficultés à quantifier l'efficacité des souches de Rhizobium -chaque expérience d'inoculation ayant été effectuée plusieurs fois-, il s'avère que les souches inefficaces sont en général restées inefficaces, excepté les rares cas de réversion vers l'efficacité ; les souches efficaces ont donné quant à elles des résultats variables, mais toujours positifs pour la réduction de l'acétylène.

Dans la recherche de mutants inefficaces, nous avons entrepris la sélection de clones non mucueux. Le rendement obtenu, par le processus de filtration qui nous a permis d'isoler quelques mutants inefficaces, est faible. Ces mutants inefficaces ne sont pas utilisables dans des expériences de transfert génétique du fait de l'absence d'un caractère marqueur (par exemple : l'auxotrophie :incapacité d'utiliser un sucre, etc...) permettant d'obtenir des recombinants sur milieu sélectif.

Parmi les mutants auxotrophes inefficients, on a constaté qu'il y avait deux groupes :

- ceux qui deviennent efficaces quand on leur ajoute leurs exigences (cas de la souche A_1) : pour ceux là, l'inefficacité vient peut être du fait qu'ils ne trouvent pas dans la plante les substances indispensables (tryptophane) pour faire les synthèses protéiques nécessaires à la fixation de l'azote. Cette hypothèse ne paraît pas exacte puisque la souche A_{1b} présentant les mêmes exigences (en plus de l'arginine) est relativement efficace en absence de ces produits. Le tryptophane est un acide aminé utilisé dans le métabolisme de la plante pour la synthèse de l'acide indol acétique, par exemple. On peut interpréter le retour à l'efficacité de la souche A_1 par le fait que la plante détourne le tryptophane endogène à son profit et l'utilise pour son développement.

- ceux qui restent inefficients même lorsqu'on leur apporte leurs exigences, telle la souche A_{1a} . On pourrait penser que l'arginine est indispensable pour que cette souche manifeste son efficacité. Cette hypothèse n'est pas vraie ; en effet, la souche A_{1b} est relativement efficace et possède les mêmes exigences que la souche A_{1a} dont l'arginine qu'elle est incapable de synthétiser. Cette efficacité réelle est confirmée par les révertants redevenus prototrophes et qui sont restés inefficients.

Entre autre, on peut expliquer l'incohérence de cette filiation par les clonages successifs qui ont été réalisés en vue de la mise en collection de chaque souche, ainsi que par les mutations effectuées pour leur obtention. En effet, l'isolement de la souche inefficace A_{1a} est obtenu à la suite d'une série de clonages au hasard : un premier clonage de la souche A_1 , puis une mutation qui conduit à la souche A_{1a} , suivie d'un nouveau

clonage pour tester les caractères isoleucine-valine, tryptophane et arginine de cette souche ; un troisième clonage est effectué avant la mise en collection. Au cours de ces opérations, on peut aussi bien piquer des clones efficients qu'inefficients sans qu'on le sache, car on n'a pas encore des procédés biochimiques pour tester l'efficiencce qui ne peut être détectée actuellement que par passage sur la plante-hôte et analyse par la chromatographie en phase gazeuse. La filiation est donc réellement plus complexe qu'il n'apparaît sur le schéma de la page 52 .

II - ÉTUDE DU TRANSFERT DE L'EFFICIENCE

L'efficience est-elle transférable d'une bactérie efficiente à une bactérie inefficente ? Les études expérimentales réalisées jusqu'à présent dans la recherche du transfert de marqueurs génétiques (résistance et auxotrophie) n'ont données que des résultats fragmentaires : les transferts se font toujours à fréquence très faible chez Rhizobium, même en utilisant le plasmide RP₄ pour une amélioration des conjugaisons (76).

Pour rechercher un transfert éventuel de l'efficience à des mutants inefficients, il faudrait analyser plusieurs milliers de clones afin de déterminer l'efficience des recombinants, ce qui nécessite un nombre considérable de plantules pour les tester. L'identification et la sélection de tels recombinants ne peuvent être concrétisées que par l'inoculation de la plante hôte. Nous nous sommes demandés, s'il n'était pas possible de sélectionner les bactéries efficientes parmi les inefficentes en effectuant l'inoculation du mélange à des plantules ; on peut alors partir de l'hypothèse qu'une bactérie efficiente doit avoir un avantage sélectif au niveau des nodules par rapport aux bactéries inefficentes.

On s'est proposé de faire une analyse dans une population bactérienne composée par un mélange d'une dizaine de cellules efficaces (qui pourraient être, le cas échéant, des recombinants) et de 10^8 cellules inefficaces : il s'agit de savoir si ces cellules efficaces sont capables d'induire des nodules malgré leur nombre restreint. Ceci nous amène à étudier la compétition entre une souche efficace et une souche inefficace. Après l'infection mixte (10 cellules infectieuses et efficaces + 10^8 cellules infectieuses et inefficaces) de la luzerne, on recherchera si les nodules formés contiennent des bactéries efficaces ou non.

1) Essai de sélection des bactéries efficaces dans une population inefficace

Les mélanges artificiels qu'on se propose de réaliser vont nous permettre de clarifier le phénomène de compétition "in vitro". On évalue l'activité nitrogénasique des plantules ayant subi une infection mixte de bactéries efficaces et inefficaces.

On a sélectionné pour cet essai, les souches suivantes :

2011 (RP₄) : efficace, A₁ (RP₄) : inefficace, A₁a str rif (A₁a str spc) : inefficace.

On s'est d'abord intéressé au mélange formé par la souche efficace 2011 (RP₄) et la souche inefficace A₁a str rif. Après culture de la luzerne dans le milieu de NICOL et THORNTON, sans addition des acides aminés (donc dépourvu de toute source d'azote), on effectue l'inoculation des plantules par le mélange des deux souches dans les conditions suivantes :

pour chaque essai, le nombre de bactéries inefficaces A_1 a str rif est de 10^8 ou 10^9 dans 20 ml de milieu ; par contre, le nombre de bactéries de la souche efficace varie de 10 à 10^6 . Les deux souches sont inoculées simultanément. Parallèlement, des essais sont réalisés avec chacune des souches : pour la souche 2011 (RP_4) 10^6 bactéries dans 20 ml de milieu et pour la souche A_1 a str rif 10^8 et 10^9 bactéries dans 20 ml de milieu ont été utilisés pour l'inoculation.

Après l'isolement et la purification des clones obtenus à partir de trois nodules provenant de luzerne inoculée avec le mélange I (10 bactéries environ de la souche 2011 (RP_4) + 10^8 bactéries de la souche A_1 a str rif). La purification est réalisée sur milieu riche gélosé (RCG) additionné de glucose. On a utilisé la méthode des répliques de LEDERBERG (64) qui nous permet d'identifier les clones purifiés. Dans le tableau qui suit, on indique les souches bactériennes susceptibles de se développer sur les milieux utilisés pour étudier les clones répliqués.



TABLEAU XI : CARACTÈRES RÉFÉRENTIELS DES CLONES SUSCEPTIBLES DE SE DÉVELOPPER SUR UN MILIEU SÉLECTIF DONNÉ, + : LES CLONES (AVANT ACQUIS UN OU DES CARACTÈRES) SE DÉVELOPPENT SUR LE MILIEU 0 : LES CLONES SONT INCAPABLES DE SE DÉVELOPPER

| Milieu riche + streptomycine + tétracycline (RCG str rlf Tc) | Milieu riche + streptomycine + rifampycine (RCG str rlf) | Milieu minimum + streptomycine + rifampycine (RCG str rlf) | Milieu minimum + tétracycline : (RC Tc) | Milieu riche : (purification) (RCG) | Milieu minimum (RCG) | Milieu riche + tétracycline | Mutants spontanés éventuels de souche 2011 (RP) résistants à la streptomycine, à la rifampycine | A ₁ str rlf : résistance à la streptomycine, à la rifampycine, à l'isoleucine-valine, tryptophane, arginine | Révertants spontanés éventuels de la souche A ₁ str rlf sensibles à la streptomycine, à la rifampycine | Transconjugants éventuels A ₁ (RP) résistants à la tétracycline, à la streptomycine et à la rifampycine |
|--|--|--|---|-------------------------------------|----------------------|-----------------------------|---|--|---|--|
| + | + | 0 | + | + | + | 0 | + | + | 0 | + |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Les résultats obtenus à la suite des répliques sont résumés dans le TABLEAU XII.

| Milieux! | RCG | RG T _C | RG str rif | RCG str rif | RCG str rif T _C |
|----------|-----|-------------------|------------|-------------|----------------------------|
| | A | B | D | C | E |
| NODULE 1 | 60 | 38 | 0 | 0 | 0 |
| NODULE 2 | 60 | 57 | 0 | 0 | 0 |
| NODULE 3 | 55 | 55 | 0 | 0 | 0 |

TABLEAU XII : NOMBRE DE CLONES PRÉALABLEMENT PURIFIÉS SUR MILIEU RICHE GÉLOSÉ (RCG) ET REPIQUÉS SUR DIFFÉRENTS MILIEUX, (LES CLONES SONT ISSUS DE NODULES APRÈS INFECTION DE PLANTULES DE LUZERNE PAR LE MÉLANGE I).

Il apparait que presque tous les clones dérivent de la souche 2011 (RP₄) comme le montre la photo de la FIGURE 10.

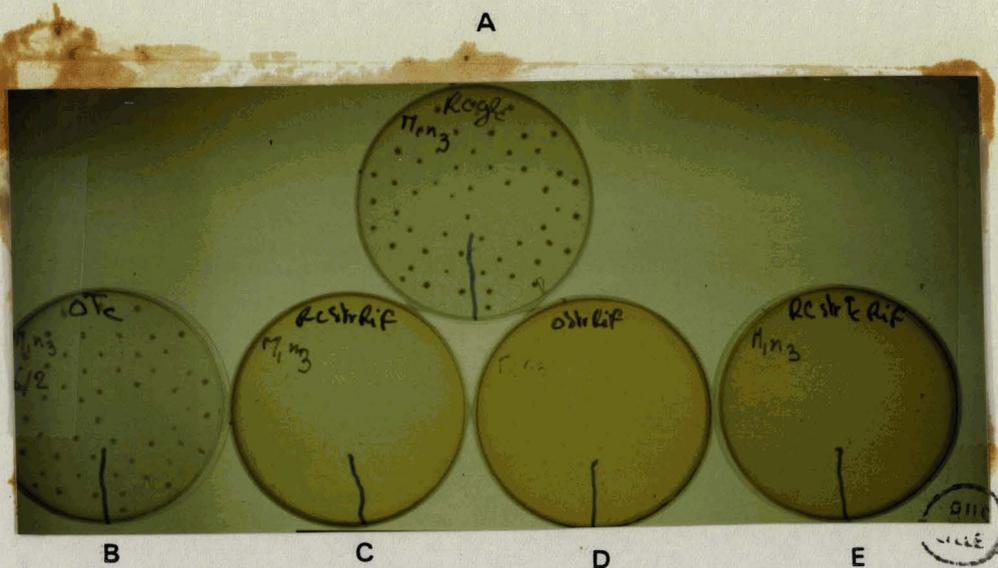


FIGURE 10 : Aspect des répliques obtenues à partir de nodules (nodule 3) de plantules ayant subies une infection mixte (voir résultats TABLEAU XII).

La même opération est réalisée avec le mélange II contenant 10^5 bactéries de la souche 2011 (RP₄) et 10^8 bactéries de la souche A₁ str rif.

| Milieux! | RCG | RG T _C | RG str rif | RCG str rif | RCG str rif T _C |
|----------|-----|-------------------|------------|-------------|----------------------------|
| NODULE 1 | 61 | 61 | 0 | 0 | 0 |
| NODULE 2 | 65 | 64 | 0 | 0 | 0 |
| NODULE 3 | 61 | 61 | 0 | 0 | 0 |

TABLEAU XIII : NOMBRE DE CLONES PRÉALABLEMENT PURIFIÉS SUR MILIEU RICHE GÉLOSÉ (RCG) ET REPIQUÉS SUR DIFFÉRENTS MILIEUX.
(LES CLONES SONT ISSUS DE NODULES APRÈS INFECTION DE PLANTULES DE LUZERNE PAR LE MÉLANGE II).

On constate ici aussi que seule la souche 2011 (RP₄) a provoqué la formation de nodules : en effet, aucune bactérie ne se développe sur les milieux RC str rif, RCG str rif et RCG str rif T_C pouvant mettre en évidence éventuellement la présence de la souche A₁a str rif ou de transconjugants A₁a (RP₄). Il semblerait donc que les souches efficientes présentent un avantage sélectif considérable par rapport aux souches inefficientes au niveau des nodules en particulier au cours de la première manipulation où on a mélangé 10 cellules efficientes et 10^8 cellules inefficientes tous les nodules contiennent des cellules efficientes.

Il peut aussi s'agir d'un avantage sélectif du à l'effi-
cience de la souche 2011 (RP₄) ou d'un avantage de la souche 2011 (RP₄) dû
à sa prototrophie vis-à-vis du mutant.

A la suite de ces résultats, on a été amené à numérer les
souches présentes dans le milieu de culture de NICOL et THORNTON afin d'étu-
dier une éventuelle multiplication des bactéries efficaces au cours ou
avant la nodulation.

On effectue des dilutions à partir de 2 tubes contenant
une solution mère de NICOL et THORNTON où ont été cultivées des plantules
de luzerne infectées par les 2 souches 2011 (RP₄) et A₁a str rif. Les
numérations réalisées pour des proportions différentes des bactéries sont
rapportées dans les TABLEAUX XIV et XV.

| E S S A I S | Milieux | RCG | RGT _C | RCG str | RCG str T _C |
|-------------|------------------|---------|------------------|---------|------------------------|
| | Dilutions | | | | |
| Essai n° 1 | 10 ⁻⁴ | 356 | 211 | 52 | 0 |
| | 10 ⁻⁵ | 32 | 30 | 5 | 0 |
| | 10 ⁻⁶ | 3 | 1 | 0 | 0 |
| Essai n° 2 | 10 ⁻⁴ | > 1 000 | 357 | 14 | 0 |
| | 10 ⁻⁵ | 137 | 32 | 2 | 0 |
| | 10 ⁻⁶ | 17 | 3 | 0 | 0 |

TABLEAU XIV : NUMÉRATION DU MÉLANGE DES DEUX SOUCHES INOCULÉES SIMULTANÉMENT DANS LES PROPORTIONS SUIVANTES :

- 2011 (P₄) (10 BACTÉRIES/20 ML DE MILIEU)
- A₁A STR RIF (10⁸ BACTÉRIES/20 ML DE MILIEU)

L'INOCULATION A ÉTÉ RÉALISÉE 2 MOIS AUPARAVANT. L'EXPÉRIENCE A ÉTÉ EFFECTUÉE À LA TEMPÉRATURE AMBIANTE.

- POUR LES NUMÉRATIONS, 0,1 ML DE CHAQUE DILUTION BACTÉRIENNE EST UTILISÉ.



| E S S A I S | Milieux | RCG | RGT _c | RCG str | RCG str T _c |
|-------------|------------------|-----|------------------|---------|------------------------|
| | Dilutions | | | | |
| Essai n° 1 | 10 ⁻⁴ | 152 | 57 | 10 | 0 |
| | 10 ⁻⁵ | 19 | 4 | 1 | 0 |
| | 10 ⁻⁶ | 4 | 1 | 0 | 0 |
| Essai n° 2 | 10 ⁻⁴ | 789 | 458 | 30 | 0 |
| | 10 ⁻⁵ | 85 | 63 | 2 | 0 |
| | 10 ⁻⁶ | 4 | 5 | 0 | 0 |

TABLEAU XV : NUMÉRATION DU MÉLANGE DES DEUX SOUCHES INOCULÉES DANS LES PROPORTIONS SUIVANTES :

- 2011 (RP₄) (10⁵ BACTÉRIES/20 ML DE MILIEU)
- A₁A STR RIF (10⁸ BACTÉRIES/20 ML DE MILIEU)

CONDITIONS IDENTIQUES À CELLES DU TABLEAU XIV



On constate, d'après le TABLEAU XIV, que, dans le cas où 10 bactéries de la souche 2011 (RP₄) sont introduites dans le tube, celles-ci prolifèrent jusqu'à atteindre un nombre de l'ordre de 6.10^8 dans les 20 ml de la solution de NICOL et THORNTON. Par contre, dans les mêmes conditions opératoires, pour la souche A₁a str rif, on note une stagnation, voire une légère diminution du nombre de bactéries dans le milieu.

On note également une augmentation du nombre de bactéries de la souche 2011 (RP₄) dans le milieu de culture lorsque 10^5 bactéries sont introduites initialement dans le tube (TABLEAU XV). Là encore, on note la constance relative du nombre de bactéries de la souche A₁a str rif.

Cette étude a porté aussi sur l'activité nitrogénasique des mélanges de bactéries étudiés précédemment. Elle concerne les plantules infectées par les différents clones seuls ou en mélange en proportions diverses (TABLEAU XVI). D'une part, les quantités d'éthylène produites par les 2 souches inoculées séparément montrent bien que la souche 2011 (RP₄) est efficiente et la souche A₁a str rif est inefficente. D'autre part, dans les mélanges effectués, on note une production d'éthylène analogue à celle produite par la souche témoin 2011 (RP₄).

| Traitement des plantules de luzerne | Nombre de plantules testées | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transformée en éthylène en 7 H | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrosamine en 7 H (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|--|-----------------------------|-------------------------------------|--|--------------------------------|---|--------------------------------------|
| | | | en μ moles/fiacon | en μ moles/mg de poids sec | | |
| Non inoculée | 10 | 8,42 | $0,86 \cdot 10^{-2}$ | $1,02 \cdot 10^{-4}$ | | |
| Inoculée avec 2011 (PP ₄) 10^6 | 7 | 10,33 | $10,06 \cdot 10^{-2}$ | $1,39 \cdot 10^{-3}$ | $1,28 \cdot 10^{-3}$ | 13 |
| Inoculée avec A ₁ a str rif 10^8 | 7 | 9,14 | $0,45 \cdot 10^{-2}$ | $7,02 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 7 |
| Inoculée avec 2011 (PP ₄) 10^6 + A ₁ a str rif 10^8 | 5 | 12,09 | $9,33 \cdot 10^{-2}$ | $1,55 \cdot 10^{-3}$ | $1,44 \cdot 10^{-3}$ | 20 |
| Inoculée avec 2011 (PP ₄) 10^2 + A ₁ a str rif 10^8 | 10 | 15,15 | $26,59 \cdot 10^{-2}$ | $1,75 \cdot 10^{-3}$ | $1,64 \cdot 10^{-3}$ | 16 |
| Inoculée avec 2011 (PP ₄) 10^3 + A ₁ a str rif 10^8 | 7 | 7,66 | $7,69 \cdot 10^{-2}$ | $1,43 \cdot 10^{-3}$ | $1,32 \cdot 10^{-3}$ | 10 |
| Inoculée avec 2011 (PP ₄) 10^4 + A ₁ a str rif 10^8 | 8 | 11,52 | $5,62 \cdot 10^{-2}$ | $6,09 \cdot 10^{-4}$ | $5,07 \cdot 10^{-4}$ | 12 |
| Inoculée avec 2011 (PP ₄) 10^5 + A ₁ a str rif 10^8 | 7 | 9,08 | $16,06 \cdot 10^{-2}$ | $2,52 \cdot 10^{-3}$ | $2,41 \cdot 10^{-3}$ | 10 |
| Inoculée avec A ₁ a str rif 10^9 | 6 | 6,80 | $0,04 \cdot 10^{-2}$ | $9,79 \cdot 10^{-6}$ | n. m. | 12 |
| Inoculée avec 2011 (PP ₄) 10^6 + A ₁ a str rif 10^9 | 5 | 11,57 | $8,88 \cdot 10^{-2}$ | $1,53 \cdot 10^{-3}$ | $1,42 \cdot 10^{-3}$ | 14 |
| Inoculée avec 2011 (PP ₄) 10^2 + A ₁ a str rif 10^9 | 7 | 9,59 | $9,94 \cdot 10^{-2}$ | $1,48 \cdot 10^{-3}$ | $1,37 \cdot 10^{-3}$ | 10 |
| Inoculée avec 2011 (PP ₄) 10^3 + A ₁ a str rif 10^9 | 6 | 10,01 | $17,64 \cdot 10^{-2}$ | $2,93 \cdot 10^{-3}$ | $2,82 \cdot 10^{-3}$ | 8 |
| Inoculée avec 2011 (PP ₄) 10^4 + A ₁ a str rif 10^9 | 5 | 9,72 | $10,41 \cdot 10^{-2}$ | $2,14 \cdot 10^{-3}$ | $2,03 \cdot 10^{-3}$ | 9 |
| Inoculée avec 2011 (PP ₄) 10^5 + A ₁ a str rif 10^9 | 7 | 7,54 | $3,65 \cdot 10^{-2}$ | $6,91 \cdot 10^{-4}$ | $5,89 \cdot 10^{-4}$ | 9 |
| Inoculée avec 2011 (PP ₄) 10^6 + A ₁ a str rif 10^9 | 7 | 15,04 | $7,9 \cdot 10^{-2}$ | $7,49 \cdot 10^{-4}$ | $6,47 \cdot 10^{-4}$ | 15 |

TABLEAU XVI : DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ NITROGÉNÉSIQUE :

- DE LA SOUCHE 2011 (PP₄) 10^6 BACTÉRIES/20 ML DE MILIEU
- DE LA SOUCHE A₁A STR RIF 10^8 ET 10^9 BACTÉRIES/20 ML DE MILIEU
- DES MÉLANGES :
 - { 2011 (PP₄) DE 10^4 A 10^5 BACTÉRIES/20 ML DE MILIEU
 - { A₁A STR RIF 10^8 BACTÉRIES/20 ML DE MILIEU
 - { 2011 (PP₄) DE 10^4 A 10^6 BACTÉRIES/20 ML DE MILIEU
 - { A₁A STR RIF 10^9 BACTÉRIES/20 ML DE MILIEU

Des résultats des expériences décrites au paragraphe précédent, il apparaît que la souche prototrophe 2011 (RP₄) prend rapidement l'avantage sur la souche auxotrophe A₁a str rif en milieu de NICOL et THORNTON en présence de luzerne. Pourtant, on sait que lors de la germination, puis au cours de la croissance, les plantules donnent des exsudats racinaires, riches en amino-acides, capables de favoriser la croissance des mutants auxotrophes. Pour élucider ce point, nous avons complété nos recherches en utilisant d'une part le mélange de souches utilisé auparavant et d'autre part un autre mélange dans lequel la souche 2011 (RP₄) a été remplacée par le mutant A₁ qui a reçu le facteur (RP₄) (ce qui permet sa sélection dans un mélange contenant la souche A₁a str rif). Les deux mutants A₁ (RP₄) et A₁a str rif sont inefficients et sont issus de la souche M₅ N₁.

Les proportions des mélanges préparés sont les suivantes :

| | | |
|-------------|---|--|
| Mélange III | } | 2011 (RP ₄) à raison de 10 bactéries dans 20 ml de milieu NICOL et THORNTON |
| | | A ₁ a str rif à raison de 10 ⁸ bactéries dans 20 ml de milieu NICOL et THORNTON |
| Mélange IV | } | A ₁ (RP ₄) à raison de 10 bactéries dans 20 ml de milieu NICOL et THORNTON |
| | | A ₁ a str rif à raison de 10 ⁸ bactéries dans 20 ml de milieu NICOL et THORNTON |

Pour étudier l'influence sur la croissance des bactéries auxotrophes des métabolites excrétés dans le milieu par la plante-hôte, nous avons effectué des numérations de milieu de culture avec et sans plantules. Les numérations sont réalisées à l'apparition des premiers nodules, c'est-à-dire une dizaine de jours après infection de la plante par la bactérie ; les milieux ne contenant pas de plantules sont numérés après le même intervalle de temps. Les résultats sont rapportés dans les TABLEAUX XVII et XVIII.

| Souches (quantité pour 20 ml de milieu) | Milieux | RCG | RG Tc | RG Tc + Ilv Try | RCG str | RCG str Tc |
|--|---------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------|
| 2011 (RP ₄) (10 bactéries) | | 4,2.10 ⁷ bac./ml | 2,69.10 ⁷ bac./ml | | | |
| A ₁ (RP ₄) (10 bactéries) | | 0,14.10 ⁷ bac./ml | | 0,10.10 ⁷ bac./ml | | |
| A _{1a} str rif (10 ⁸ bactéries) | | 0,40.10 ⁷ bac./ml | | | 0,41.10 ⁷ bac./ml | |
| Mélange III 2011 (RP ₄) : (10 ⁸ bactéries) A _{1a} str rif : (10 ⁸ bactéries) | | 2,81.10 ⁷ bac./ml | 0,94.10 ⁷ bac./ml | | 0,65.10 ⁷ bac./ml | - |
| Mélange IV A ₁ (RP ₄) : (10 ⁸ bactéries) A _{1a} str rif : (10 ⁸ bactéries) | | 0,46.10 ⁷ bac./ml | | - | 0,35.10 ⁷ bac./ml | - |

TABLEAU XVII : NUMÉRATIONS DES DIVERSES SOUCHES AYANT SERVI À L'INOCULATION DE PLANTULES (SEULES OU EN MÉLANGE) APRÈS APPARITION DES PREMIERS NODULES.
LES NUMÉRATIONS ONT ÉTÉ RÉALISÉES 10 JOURS APRÈS INFECTION.
LA CULTURE EST EFFECTUÉE À TEMPÉRATURE AMBIANTE.

La numération montre bien encore une fois que la souche 2011 (RP₄) s'est multipliée dans le milieu de culture ainsi que la souche A₁ (RP₄) lorsqu'elle est seule. Par contre, pour la souche A_{1a} str rif, on note une baisse numérique analogue à celle que nous avons déjà remarquée (TABLEAUX XIV et XV). Il faut signaler la non prolifération de la souche A₁ (RP₄) dans le mélange effectué ci-dessus : elle est due vraisemblablement à l'utilisation par les nombreuses cellules de la souche A_{1a} str rif de la totalité des substrats indispensables aux quelques cellules de la souche A₁ (RP₄).

| Souches (quantité pour 20 ml de milieu) | Milieux | RCG | RG Tc | RG Tc + Ilv Try | RCC str | RCG str Tc |
|--|---------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------------|---------------|
| 2011 (RP ₄) (10 ⁸ bactéries) | | 1,62.10 ⁷ bac./ml | 0,54.10 ⁷ bac./ml | | | |
| A ₁ (RP ₄) | | non réalisée | | | | |
| A _{1a} str rif (10 ⁸ bactéries) | | 0,10.10 ⁷ bac./ml | | | 0,15.10 ⁷ bac./ml | |
| Mélange III 2011 (RP ₄) : (10 ⁸ bactéries) A _{1a} str rif : (10 ⁸ bactéries) | | 0,79.10 ⁷ bac./ml | 0,08.10 ⁷ bac./ml | | 0,07.10 ⁷ bac./ml | - |
| Mélange IV A ₁ (RP ₄) : (10 ⁸ bactéries) A _{1a} str rif : (10 ⁸ bactéries) | | 0,08.10 ⁷ bac./ml | | - | 0,09.10 ⁷ bac./ml | - |

TABLEAU XVIII : NUMÉRATIONS DES DIVERSES SOUCHES (SEULES OU EN MÉLANGE)
CULTIVÉES DANS LE MILIEU DE NICOL ET THORNTON EN ABSENCE DE
PLANTULES.
LE MILIEU DE CULTURE EST MAINTENU SOUS AGITATION À TEMPÉRA-
TURE DE 32° C.

On note bien la prolifération de la souche 2011 (RP₄) même
en absence de plantule. Mais dans tous les cas, un nombre de cellules est
nettement plus faible qu'en présence de luzerne (TABLEAU XVII).



Les résultats concernant l'activité nitrogénasique sont indiqués dans le TABLEAU IXX : la souche 2011 (RP₄) montre une activité nitrogénasique assez importante ; celle-ci est retrouvée dans le mélange III. Par contre, les souches A₁ (RP₄) et A₁a str rif, comme auparavant, donnent une quantité d'éthylène très faible qui reflète bien leur inefficience. Ce résultat est confirmé avec le mélange IV contenant 10 bactéries A₁ (RP₄) et 10⁸ bactéries A₁a str rif.

| Traitement des plantules de luzerne | Nombre de plantules testées | Exigences des souches auxotrophes | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transformée en éthylène en 7 H | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrification en 7 H (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|---|-----------------------------------|---|--|---|------------------------------------|---|--|
| | | | | en μ moles/ flacon | en μ moles/ mg de poids sec | | |
| Non inoculée | | | 22,83 | $0,76 \cdot 10^{-2}$ | $8,33 \cdot 10^{-5}$ | | |
| Inoculée avec 2011 (RP ₁) 10 bac./tube | 13 | sauvage | 17,51 | $84,04 \cdot 10^{-2}$ | $3,69 \cdot 10^{-3}$ | $3,60 \cdot 10^{-3}$ | 19 |
| Inoculée avec A ₁ (RP ₁) 10 bac./tube | 6 | Ilv Try | 24,36 | $0,53 \cdot 10^{-2}$ | $3,62 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 4 |
| Inoculée avec A ₁ str rif 10 ⁸ bac./tube | 5 | Ilv Try Arg | 19,88 | n. m. | n. m. | n. m. | 8 |
| Inoculée avec Mélange III 2011 (RP ₁) 10 bac./tube A ₁ str rif 10 ⁸ bac./tube | 10 | sauvage Ilv Try Arg | 24,62 | $126 \cdot 10^{-2}$ | $5,11 \cdot 10^{-3}$ | $5,02 \cdot 10^{-3}$ | 19 |
| Inoculée avec Mélange IV A ₁ (RP ₁) 10 bac./tube A ₁ str rif 10 ⁸ bac./tube | 4 | Ilv Try Ilv Try Arg | 20,8 | n. m. | n. m. | n. m. | 5 |

TABEAU IXX : DÉTERMINATION DE L'EFFICIENCE DES DIVERSES SOUCHES (SEULES OU EN MÉLANGE), MESURÉE DEUX MOIS APRÈS INFECTION DE PLANTULES DE LUZERNE.

n. m. : quantité non mesurable



Les exsudats racinaires permettent-ils la croissance des souches auxotrophes ?

On constate que la croissance de la souche auxotrophe A_1 a str rif reste faible, que ce soit en présence ou en absence de plantules (donc d'exsudats racinaires). Par contre, la souche A_1 (RP_4) se comporte comme la souche 2011 (RP_4) en présence des plantules : ceci montre que les exsudats racinaires contiennent suffisamment de substrats pour assurer la croissance d'une souche auxotrophe.

Dans le mélange III qui contient les souches 2011 (RP_4) et A_1 a str rif (TABLEAU XVII), la compétition est en faveur de la souche 2011 (RP_4) ; cet avantage sélectif de la souche 2011 (RP_4) par rapport à la souche A_1 a str rif est très probablement lié à la prototrophie et peut-être aussi lié au caractère de l'efficacité.

Les difficultés d'interprétation des expériences portent aussi sur le devenir des Rhizobium dans les nodules. En effet, on a constaté qu'une faible proportion de plantules infectées par la seule souche inefficace A₁ str rif étaient bien développés (aspect verdoyant). Les bactéries des nodules de ces plantules ont été analysées : on remarque que les quatre clones testés sont devenus efficaces, sensibles à la streptomycine et ont conservé leurs caractères d'auxotrophie. Cela n'est probablement pas dû à un défaut de stérilisation des graines, car en aucun cas au cours de nombreuses expériences réalisées sur la luzerne, il n'a été mis en évidence de nodule chez des témoins non inoculés. Le TABLEAU XX montre que les quatre clones présentent une activité nitrogénasique importante.

On a mis en évidence des révertants qui ont retrouvé leur prototrophie globale et qui sont restés inefficaces. Ceci explique l'indépendance de l'efficacité et des caractères d'auxotrophie.

La réversion vers l'efficacité ne concerne évidemment qu'une proportion très faible de la population bactérienne (inoculation de 10^8 bactéries par tube environ). Si quelques révertants efficaces sont capables d'entrer avec succès en compétition avec l'ensemble de la population inefficace, cela est en faveur de l'hypothèse selon laquelle une souche efficace a un avantage sélectif important dans la plante.

DISCUSSION

Le problème est de savoir si la compétition dans le nodule se fait en faveur de l'efficiencce ou de la prototrophie. En partant d'une population bactérienne en majorité formée par des bactéries inefficentes, on a remarqué, après deux mois de culture sur luzerne, que les nodules ne contenaient que des bactéries prototrophes et efficaces. Cet avantage sélectif en faveur de la souche prototrophe et efficace pourrait résulter d'une compétition réelle et effective vis-à-vis de la souche auxotrophe et inefficente.

Lorsque l'on utilise un faible nombre de bactéries efficaces dans les mélanges des souches pour l'inoculation, on a peut-être une affinité plus forte entre celles-ci et la plante hôte. Les résultats obtenus par les numérations de cette population bactérienne inégalement répartie dans les tubes de culture contenant de la luzerne, montrent qu'il y a prolifération de la souche prototrophe et diminution de la souche auxotrophe. Cette multiplication de la souche prototrophe au cours de la formation des nodules nous empêche de se prononcer sur l'exactitude de la compétition. En effet, les numérations ont été réalisées 10 jours après inoculation de la luzerne par les souches, le moment de l'entrée des bactéries après l'inoculation n'est pas déterminable, d'autant plus que cet intervalle de temps correspond à l'apparition des premiers nodules. On ne peut donc conclure s'il s'agit d'une compétition avantageant la souche efficace ou la souche prototrophe. Ce problème se complique par l'apparition de mutants redevenus efficaces.

Nous n'avons pu démontrer avec suffisamment de certitude que les souches efficaces présentaient un avantage sélectif important par rapport aux souches inefficaces pour utiliser pratiquement ce procédé à la sélection de recombinants efficaces au sein d'une population inefficace.

2) Transfert de l'efficience par conjugaison

Dans ce qui suit, nous allons essayer d'étudier si le caractère de l'efficience est transférable ou non. Les résultats obtenus par conjugaison en faisant intervenir des éléments génétiques du groupe P, sont prometteurs et ont permis l'établissement de plusieurs ébauches de cartes génétiques qui, dans l'ensemble, présentent de grandes similitudes. Les expériences de conjugaison effectuées avec les facteurs de résistance montrent l'importance qu'ont ces plasmides pour les transferts génétiques chez Rhizobium.

Nous avons tenté, par le biais de cette technique, en utilisant le facteur (RP₄) isolé de Pseudomonas aeruginosa qui est très proche de Rhizobium du point de vue phylogénique, de transférer le ou les marqueurs génétiques qui ont trait à l'efficience. Ce plasmide porte les gènes de résistance à la tétracycline (Tc), la kanamycine (Km), la carbénicilline (Cb) et l'ampicilline (Ap).

On a tenté par des croisements, entre des souches efficaces portant le facteur (RP₄) et des souches auxotrophes inefficaces, de sélectionner des recombinants et des transconjugants éventuellement efficaces. On sélectionne les recombinants sur les caractères d'auxotrophie acquis au cours de la conjugaison par les souches inefficaces réceptrices. Les deux souches efficaces M₅N₁ (RP₄) et 2011 (RP₄) servent de souches donatrices. Les souches inefficaces 2011 m₉d rif et A₁a str rif (A₁a str spc) sont utilisées comme souches réceptrices.

A) Croisement effectué entre la souche M_5N_1 (RP_4) et la souche 2011 m_9d rif

a) Fréquence de transfert des caractères d'auxotrophie
 ++++++

La souche réceptrice 2011 m_9d rif est incapable de synthétiser la leucine et les bases pyrimidiques.

La sélection des recombinants est réalisée sur les milieux indiqués dans le TABLEAU XXI.

| Marqueurs reçus par les recombinants | Milieux sélectifs | RG str rif Tc | RG str rif | RG str rif + Leu | RG str rif + Pyr |
|--|-------------------|---------------|------------|------------------|------------------|
| Leucine | | - | - | - | + |
| Pyrimidine | | - | - | + | - |
| Leucine - Pyrimidine | | - | + | + | + |
| Leucine - Pyrimidine + Tétracycline (facteur RP_4) | | + | + | + | + |

TABLEAU XXI : CARACTÈRES DES RECOMBINANTS OBTENUS À PARTIR DE LA SOUCHE 2011 m_9d RIF.

Les fréquences de transfert du croisement M_5N_1 (RP_4) x 2011 m_9d rif sont décrits dans le TABLEAU XXII.

| Fréquences | | Fréquence des mutants spontanés de la souche $M_5N_1 (RP_4)$ Str ^S Rif ^S → Str ^R Rif ^R | Fréquence de réversion de la souche 2011 m ₉ d rif Leu ⁻ → Leu ⁺ Pyr ⁻ → Pyr ⁺ Leu ⁻ Pyr ⁻ → Leu ⁺ Pyr ⁺ | Fréquence de transfert par rapport à la souche 2011 m ₉ d rif Leu ⁻ → Leu ⁺ Pyr ⁻ → Pyr ⁺ Leu ⁻ Pyr ⁻ → Leu ⁺ Pyr ⁺ Leu ⁻ Pyr ⁻ T _c → Leu ⁺ Pyr ⁺ T _c | Fréquence de transconjugants par rapport à | | Durée du croisement en heures |
|-------------------------|---------------------------|---|--|--|--|-------------------------------------|-------------------------------|
| Scuche Nif ⁺ | Scuche Nif ⁻ | | | | la souche $M_5N_1 (RP_4)$ | la souche 2011 m ₉ d rif | |
| $M_5N_1 (RP_4)$ | 2011 m ₉ d rif | $< 1,89.10^{-9}$ | Leu $< 1,06.10^{-9}$ Pyr $< 1,06.10^{-9}$ Pyr Leu $< 1,06.10^{-9}$ | Leu = $1,06.10^{-8}$ Pyr = $1,06.10^{-8}$ Leu Pyr = $1,06.10^{-8}$ Leu Pyr T _c = $4,69.10^{-7}$ | $2,20.10^{-6}$ | $2,69.10^{-6}$ | 24 |

TABLEAU XXII : FRÉQUENCES DE TRANSFERT OBTENUES POUR LE CROISEMENT $M_5N_1 (RP_4)$ X 2011 m₉d RIF.

Exemple :

Réversion : Leu⁺ → Leu⁺ ; le clone a retrouvé le caractère leucine par retour à l'état sauvage pour ce marqueur (il s'agit d'une mutation spontanée).

Transfert : Leu⁻ → Leu⁺ ; le clone a acquis le caractère leucine par recombinaison (la sélection est réalisée sur milieu minimum RG additionné de pyrimidine).



On constate que les fréquences de transfert sont faibles à l'issue de ce croisement. Cette fréquence est améliorée lorsque la sélection des recombinants a été faite en présence de tétracycline. La fréquence de transfert du plasmide, quant à elle, est relativement peu élevée.

b) Propriétés des recombinants obtenus
 ++++++

On a purifié 11 clones (recombinants isolés sur milieu contenant de la tétracycline) et on les a testés pour leur efficacité. La mesure de leur activité nitrogénasique est rapportée dans le TABLEAU XXIII.

Tous les clones analysés se sont montrés inefficients donc du même caractère que la souche réceptrice. Le transfert des deux marqueurs génétiques (leucine et pyrimidine) n'est pas accompagné de celui de l'efficacité. Etant donné la faible fréquence de transfert, nous avons vérifié que les clones étudiés provenaient bien de la souche 2011 mgd rif en la typant par un phage spécifique.

Pour cela, on a sélectionné parmi les phages de la collection un phage (Ψ_{11}) spécifique des souches M_5N_1 (RP_4) et A_1a str rif utilisées pour les divers croisements que nous avons étudiés (TABLEAU XXIV).

Il faut signaler que ce phage a été préféré aux phages Ψ_6 , Ψ_7 et Ψ_{12} qui ne donnent pas toujours des résultats reproductibles.

| Traitement des plantules de luzerne | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transformée en éthylène en 7 H | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrocoénase en 7 H (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|---|-------------------------------------|--|--------------------------------|--|--------------------------------------|
| | | en μ moles/flacon | en μ moles/mg de poids sec | | |
| Non inoculée | 30,84 | $0,04 \cdot 10^{-2}$ | $1,85 \cdot 10^{-6}$ | | |
| Inoculée avec M_2N_1 (RP ₄) | 20,58 | $28,3 \cdot 10^{-2}$ | $2,75 \cdot 10^{-3}$ | $2,74 \cdot 10^{-3}$ | 9 |
| Inoculée avec 2011 m ₃ d rif | 20,36 | n. m. | n. m. | n. m. | 1 |
| Inoculée avec Rec C ₁ | 17,76 | n. m. | n. m. | n. m. | 0 |
| Inoculée avec Rec C ₂ | 12,97 | $0,28 \cdot 10^{-2}$ | $5,39 \cdot 10^{-5}$ | $5,2 \cdot 10^{-5}$ | 3 |
| Inoculée avec Rec C ₃ | 18,28 | $0,01 \cdot 10^{-2}$ | $1,09 \cdot 10^{-6}$ | n. m. | 1 |
| Inoculée avec Rec C ₄ | 14,78 | n. m. | n. m. | n. m. | 4 |
| Inoculée avec Rec C ₅ | 17,66 | n. m. | n. m. | n. m. | 6 |
| Inoculée avec Rec C ₆ | 17,6 | n. m. | n. m. | n. m. | 1 |
| Inoculée avec Rec C ₇ | 21,64 | n. m. | n. m. | n. m. | 1 |
| Inoculée avec Rec C ₈ | 17,5 | n. m. | n. m. | n. m. | 5 |
| Inoculée avec Rec C ₉ | 13,34 | n. m. | n. m. | n. m. | 7 |
| Inoculée avec Rec C ₁₀ | 21,84 | n. m. | n. m. | n. m. | 0 |
| Inoculée avec Rec C ₁₁ | 19,02 | n. m. | n. m. | n. m. | 1 |

TABLEAU XXIII : ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DES RECOMBINANTS (REC C₁ À C₁₁) OBTENUS À LA SUITE DU CROISEMENT M_2N_1 (RP₄) X 2011 m₃d RIF. CES RECOMBINANTS DEVENUS RÉSISTANTS À LA TÉTRACYCLINE ONT ACQUIS LES DEUX CARACTÈRES : LEUCINE ET PYRIMIDINE. CINQ PLANTULES ONT ÉTÉ UTILISÉES POUR LE DOSAGE DE L'ÉTHYLÈNE.
 Rec. : Recombinant



| Phages de la collection souches utilisées | 1 | 2 | 3 | 4 | 5t | 6 | 7 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13a | 13c | 13H | 14 | 16 | 19 | 20 | 21 | 22 | M23 | 2011 s | φ _{M5} |
|--|---|---|---|---|----|---|---|---|----|----|----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|-----|--------|-----------------|
| M ₅ N ₁ (RP ₄) | - | - | - | - | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| A ₁ a str rif | - | - | - | - | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 2011 (RP ₄) | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 2011 M ₅ d rif | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - |

TABLEAU XXIV : TYPAGE PHAGIQUE DES SOUCHES UTILISÉES DANS LES CROISEMENTS : M₅N₁ (RP₄) X 2011 M₅d RIF ET 2011 (RP₄) X A₁a STR RIF

- : PAS DE LYSE
+ : LYSE



On constate que le phage φ 11 ne provoque pas la lyse des 11 colonies analysées, ce qui nous amène à conclure que ces clones analysés proviennent de la souche 2011 m₉d rif.

Ces recombinants ont été isolés sur milieu minimum additionné de tétracycline ce qui prouve, d'une part, qu'ils ont reçu le facteur (RP₄), et d'autre part, acquis les deux caractères à la fois (la leucine et la base pyrimidique). Comme nous l'avons vu, le test à l'acétylène montre que ces recombinants restent inefficients (TABLEAU XXIII) : on peut donc dire que le caractère d'efficiencce n'a pas été transmis au cours de ce croisement, et qu'il est indépendant des caractères d'auxotrophie transférés.

B) Croisement réalisé entre la souche 2011 (RP₄) et la souche A₁a str rif

Etant donné la faible fréquence constatée lors du croisement précédent, nous avons effectué un autre croisement avec la souche prototrophe efficiente 2011 (RP₄) comme souche donatrice et la souche auxotrophe inefficente A₁a str rif (ou A₁a str spc) comme souche réceptrice. Cette dernière est incapable de synthétiser l'isoleucine-valine, le tryptophane et l'arginine. Ce croisement a été réalisé trois fois.

a) Fréquence de transfert des marqueurs génétiques
 ++++++

Les résultats obtenus sont rapportés dans le TABLEAU XXV.

On remarque dans les deux premiers croisements que la fréquence de recombinaison est de l'ordre de 10^{-5} . Dans le troisième croisement, la fréquence de recombinaison est plus faible. Il faut noter que le transfert du plasmide (RP₄) est nettement plus important dans le premier croisement que dans les deux autres.

b) Analyse des recombinants
 ++++++

A partir du premier croisement 2011 (RP₄) x A₁a str rif on a récolté et purifié 8 recombinants. Ces clones ont été testés par typage phagique : ils ont été lysés par le phage Ψ 11, ce qui prouve qu'ils dérivent de la souche réceptrice A₁a str rif. On remarque que les recombinants ne se développent pas en présence de tétracycline, ce qui implique qu'ils n'ont pas reçu le gène de résistance à la tétracycline du plasmide RP₄. Ils ont aussi été analysés pour leur activité nitrogénasique (TABLEAU XXVI) : les 8 clones se sont révélés être efficaces.



| Fréquences | | Fréquence des mutants spontanés de la souche 2011 (RP ₄) Str ^S Rif ^S → Str ^R Rif ^R Str ^S Spc → Str ^R Spc | Fréquence de réversion de la souche A ₁ a str rif | | | Fréquence de transfert par rapport à la souche A ₁ a str rif | | | Fréquence de transconjuants par rapport à | | Durée du croisement en heures | | | | | | | | |
|-------------------------|--------------------------|--|--|-------------------------------|-------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|---|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----|
| Souche Nif ⁺ | Souche Nif ⁻ | | Arg → Arg ⁺ | Ilv → Ilv ⁺ | Try → Try ⁺ | Arg → Arg ⁺ | Ilv → Ilv ⁺ | Try → Try ⁺ | la souche 2011 (RP ₄) | la souche A ₁ a str rif | | | | | | | | | |
| 2011 (RP ₄) | A ₁ a str rif | 2,17 . 10 ⁻⁷ | Arg < 10 ⁻⁷ | Ilv = 10 ⁻⁷ | Try = 4.10 ⁻⁷ | Arg Ilv < 10 ⁻⁷ | Arg Try = 3.10 ⁻⁷ | Ilv Try = 10 ⁻⁷ | Arg Ilv Try < 10 ⁻⁷ | Arg = 5,58 . 10 ⁻⁵ | Ilv = 7,5 . 10 ⁻⁵ | Try = 6,33 . 10 ⁻⁵ | Arg Ilv = 6,33 . 10 ⁻⁵ | Arg Try = 6,58 . 10 ⁻⁵ | Ilv Try = 5,41 . 10 ⁻⁵ | Arg Ilv Try = 7,08 . 10 ⁻⁵ | 1,22.10 ⁻⁵ | 3,66.10 ⁻⁵ | 48 |
| 2011 (RP ₄) | A ₁ a str rif | 1,26 . 10 ⁻⁸ | Arg < 2 . 10 ⁻⁷ | Ilv = 5 . 10 ⁻⁸ | Try = 2,58 . 10 ⁻⁸ | Arg Ilv < 1,25 . 10 ⁻⁸ | Arg Try = 3 . 10 ⁻⁷ | Ilv Try = 2,12 . 10 ⁻⁷ | Arg Ilv Try = 1,75 . 10 ⁻⁷ | Arg = 5,32 . 10 ⁻⁵ | Ilv = 2,47 . 10 ⁻⁶ | Try = 3,82 . 10 ⁻⁶ | Arg Ilv = 3,87 . 10 ⁻⁵ | Arg Try = 5,61 . 10 ⁻⁵ | Ilv Try = 2,06 . 10 ⁻⁵ | Arg Ilv Try = 5,56 . 10 ⁻⁵ | 6,32.10 ⁻⁸ | 1,12.10 ⁻⁸ | 48 |
| 2011 (RP ₄) | A ₁ a str spc | 3,70 . 10 ⁻⁹ | Arg < 6,21 . 10 ⁻⁹ | Ilv < 6,21 . 10 ⁻⁹ | Try = 2,73 . 10 ⁻⁷ | Arg Ilv < 6,21 . 10 ⁻⁹ | Arg Try < 6,21 . 10 ⁻⁹ | Ilv Try < 6,21 . 10 ⁻⁹ | Arg Ilv Try < 6,21 . 10 ⁻⁹ | Arg < 1,07 . 10 ⁻⁸ | Ilv < 1,07 . 10 ⁻⁸ | Try = 3,19 . 10 ⁻⁷ | Arg Ilv = 1,06 . 10 ⁻⁸ | Arg Try < 1,06 . 10 ⁻⁸ | Ilv Try = 3,19 . 10 ⁻⁸ | Arg Ilv Try < 1,06 . 10 ⁻⁸ | 2,65.10 ⁻⁷ | 5,68.10 ⁻⁷ | 48 |

TABLEAU XXV : FRÉQUENCES DE TRANSFERT OBTENUS POUR LES CROISEMENTS :
 2011 (RP₄) x A₁A STR RIF
 2011 (RP₄) x A₁A STR RIF
 2011 (RP₄) x A₁A STR SPC

| Traitement des plantules de luzerne | Nombre de plantules testées | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transférée en éthylène en 7 h | | Quantité d'acétylène transférée en éthylène par la nitrification en 7 h (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|--|-----------------------------------|--|--|------------------------------------|--|--|
| | | | en μ moles/ flacon | en μ moles/ mg de poids sec | | |
| Non inoculée | 5 | 17,32 | $0,11 \cdot 10^{-2}$ | $1,77 \cdot 10^{-5}$ | | |
| Inoculée avec 2011 (RP ₄) | 8 | 26,68 | $113 \cdot 10^{-2}$ | $4,92 \cdot 10^{-3}$ | $4,90 \cdot 10^{-5}$ | 17 |
| Inoculée avec A ₁ a str rif | 9 | 17,76 | $0,37 \cdot 10^{-2}$ | $2,08 \cdot 10^{-5}$ | $8,1 \cdot 10^{-6}$ | 16 |
| Inoculée avec Rec C _I | 8 | 17,65 | $128 \cdot 10^{-2}$ | $9,06 \cdot 10^{-3}$ | $9,04 \cdot 10^{-3}$ | 10 |
| Inoculée avec Rec C _{II} | 9 | 19,53 | $154 \cdot 10^{-2}$ | $8,76 \cdot 10^{-3}$ | $8,74 \cdot 10^{-3}$ | 11 |
| Inoculée avec Rec C _{III} | 8 | 19,66 | $93 \cdot 10^{-2}$ | $5,91 \cdot 10^{-3}$ | $5,69 \cdot 10^{-3}$ | 14 |
| Inoculée avec Rec C _{IV} | 6 | 26,88 | $81 \cdot 10^{-2}$ | $5,02 \cdot 10^{-3}$ | $5,00 \cdot 10^{-3}$ | 14 |
| Inoculée avec Rec C _V | 8 | 22,27 | $126 \cdot 10^{-2}$ | $7,07 \cdot 10^{-3}$ | $7,06 \cdot 10^{-3}$ | 11 |
| Inoculée avec Rec C _{VI} | 9 | 18,56 | $113 \cdot 10^{-2}$ | $6,76 \cdot 10^{-3}$ | $6,74 \cdot 10^{-3}$ | 11 |
| Inoculée avec Rec C _{VII} | 8 | 20 | $196 \cdot 10^{-2}$ | $12,2 \cdot 10^{-3}$ | $12,18 \cdot 10^{-3}$ | 17 |
| Inoculée avec Rec C _{VIII} | 9 | 20,66 | $123 \cdot 10^{-2}$ | $6,61 \cdot 10^{-3}$ | $6,59 \cdot 10^{-3}$ | 13 |

TABLEAU XXVI : MESURE DE L'EFFICIENCE DES RECOMBINANTS (REC C_I À C_{VIII}) OBTENUS À LA SUITE DU PREMIER CROISEMENT 2011 (RP₄) X A₁A STR RIF. CES RECOMBINANTS TOUJOURS SENSIBLES À LA TÉTRACYCLINE ONT ACQUIS LES TROIS CARACTÈRES : ISOLEUCINE-VALINE, ARGININE ET TRYPTOPHANE.

Rec = recombinants



Ici le transfert des caractères d'auxotrophie est accompagné de celui de l'efficacité. Mais ce transfert de l'efficacité peut être dû à un transfert chromosomique (gènes d'auxotrophie et gènes de l'efficacité) ou au passage d'un plasmide quelconque porteur du caractère de l'efficacité.

Ceci nous a conduit à isoler des transconjugants ayant reçu peut-être un plasmide de ce genre.

Cet isolement a été effectué sur milieu riche (RCG) additionné de streptomycine, de spectinomycine et de tétracycline : on a récolté 20 clones qui sont tous lysés par le phage $\phi 11$. Leurs activités nitrogénasiques (TABLEAU XXVII) montrent qu'ils sont tous inefficients comme la souche parentale A_1a str spc. On constate donc que les 20 clones qui sont issus de la souche réceptrice A_1a str spc ont acquis le gène de résistance à la tétracycline du plasmide RP_4 et sont restés inefficients.

| Traitement des plantules de luzerne | Nombre de plantules testées | Poids sec moyen d'une plantule (mg) | Quantité totale d'acétylène transformée en éthylène en 7 H | | Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrification en 7 H (en μ moles/mg de poids sec) | Nombre moyen de nodules par plantule |
|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|--|--------------------------------|---|--------------------------------------|
| | | | en μ moles/flacon | en μ moles/mg de poids sec | | |
| Luzerne non inoculée | 5 | 19,88 | $0,48 \cdot 10^{-2}$ | $4,8 \cdot 10^{-5}$ | | |
| 2011 (PP ₄) | 13 | 17,51 | $84,04 \cdot 10^{-2}$ | $3,69 \cdot 10^{-3}$ | $3,64 \cdot 10^{-3}$ | 19 |
| A ₁ str spc | 5 | 17,76 | $0,37 \cdot 10^{-2}$ | $2,08 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 8 |
| Trans C ₁ | 5 | 16,2 | $0,77 \cdot 10^{-2}$ | $9,50 \cdot 10^{-5}$ | $4,7 \cdot 10^{-5}$ | 6 |
| Trans C ₂ | 5 | 19 | $0,25 \cdot 10^{-2}$ | $2,63 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 6 |
| Trans C ₃ | 5 | 12,32 | $0,64 \cdot 10^{-2}$ | $1,03 \cdot 10^{-4}$ | $5,5 \cdot 10^{-5}$ | 6 |
| Trans C ₄ | 5 | 16,26 | $0,57 \cdot 10^{-2}$ | $7,01 \cdot 10^{-5}$ | $2,21 \cdot 10^{-5}$ | 10 |
| Trans C ₅ | 5 | 22,52 | $0,35 \cdot 10^{-2}$ | $3,10 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 11 |
| Trans C ₆ | 5 | 18,58 | n. m. | n. m. | n. m. | 19 |
| Trans C ₇ | 5 | 19,6 | n. m. | n. m. | n. m. | 3 |
| Trans C ₈ | 5 | 13,52 | $0,05 \cdot 10^{-2}$ | $7,39 \cdot 10^{-6}$ | n. m. | 9 |
| Trans C ₉ | 5 | 14,4 | $0,17 \cdot 10^{-2}$ | $2,36 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 8 |
| Trans C ₁₀ | 5 | 16,26 | $1 \cdot 10^{-2}$ | $1,23 \cdot 10^{-4}$ | $7,5 \cdot 10^{-5}$ | 17 |
| Trans C ₁₁ | 5 | 24 | $0,11 \cdot 10^{-2}$ | $9,16 \cdot 10^{-6}$ | n. m. | 10 |
| Trans C ₁₂ | 4 | 14,72 | $0,48 \cdot 10^{-2}$ | $8,14 \cdot 10^{-6}$ | n. m. | 12 |
| Trans C ₁₃ | 5 | 15,36 | $0,48 \cdot 10^{-2}$ | $6,25 \cdot 10^{-5}$ | $1,45 \cdot 10^{-5}$ | 26 |
| Trans C ₁₄ | 4 | 14,5 | $0,08 \cdot 10^{-2}$ | $1,37 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 20 |
| Trans C ₁₅ | 5 | 18,94 | $0,2 \cdot 10^{-2}$ | $2,11 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 8 |
| Trans C ₁₆ | 5 | 12,02 | $0,12 \cdot 10^{-2}$ | $1,99 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 8 |
| Trans C ₁₇ | 5 | 15,02 | $0,15 \cdot 10^{-2}$ | $1,99 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 6 |
| Trans C ₁₈ | 5 | 17,86 | $0,19 \cdot 10^{-2}$ | $2,12 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 9 |
| Trans C ₁₉ | 5 | 23,98 | $0,38 \cdot 10^{-2}$ | $3,16 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 7 |
| Trans C ₂₀ | 5 | 17,46 | $0,29 \cdot 10^{-2}$ | $3,32 \cdot 10^{-5}$ | n. m. | 14 |

TABLEAU XXVII : ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DES TRANSCONJUGANTS ISOLÉS À LA SUITE DU CROISEMENT 2011 (PP₄) X A₁ STR SPC.

Trans : Transconjugants

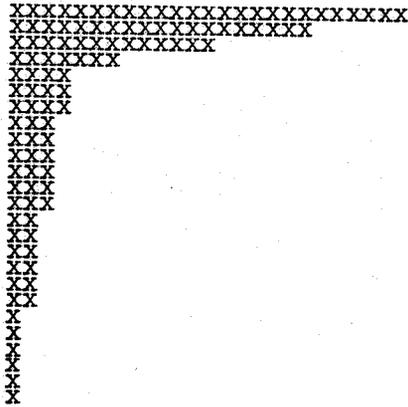


En résumé, nous avons dans un premier croisement (M_5N_1 (RP₄) x 2011 m₉d rif) sélectionné des recombinants résistants à la tétracycline qui ont acquis les deux caractères : leucine et pyrimidine et qui sont restés inefficients.

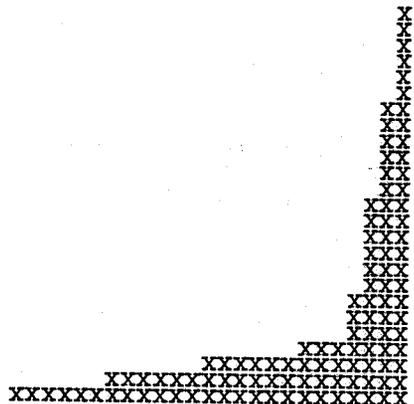
Dans un second croisement (2011 (RP₄) x A₁a str rif), nous avons isolé des recombinants sensibles à la tétracycline qui possèdent les caractères d'auxotrophie ainsi que le caractère de l'efficacité.

Dans un troisième croisement (2011 (RP₄) x A₁a str spc), on a sélectionné des transconjugants qui sont donc résistants à la tétracycline et se sont avérés inefficients.

En aucun cas, des clones (recombinants et transconjugants) ayant reçu le gène tétracycline, n'ont acquis en même temps le caractère de l'efficacité.



DISCUSSION ET CONCLUSION
GENERALE



Les travaux rapportés au début de notre étude nous ont permis d'isoler des mutants incapables de fixer l'azote atmosphérique. Ces mutants sont obtenus soit par des procédés de filtration, soit par traitement à la viomycine, soit par action d'un agent mutagène. Nous n'avons pas utilisé dans la suite de nos recherches les clones non muqueux inefficients isolés par filtration, car ils ne présentent pas des caractères d'auxotrophie pouvant servir de marqueurs dans nos croisements.

L'acquisition du caractère "résistance à la viomycine" n'entraîne pas la perte de l'efficacité; il a été constaté seulement que dans certains cas celle-ci est diminuée. Par mutagenèse, nous avons isolé au hasard des mutants auxotrophes inefficients. Leur analyse détaillée nous a conduit à distinguer deux groupes différents :

- Le premier est constitué par des inefficients retrouvant leur capacité à fixer l'azote en présence de leurs substrats exigés (cas de la souche A_1) comme l'avaient montré précédemment SCHWINGHAMER sur une souche de Rhizobium trifolii (77), ainsi que TRUCHET et DENARIE sur une souche de Rhizobium meliloti (78).

- Le second groupe est formé par des inefficients qui gardent ce caractère en présence des substrats indispensables pour leur croissance (cas des souches A_1a et 2011 m_0d). Il n'a pas été possible d'établir une relation entre des caractères d'auxotrophie trouvés et les gènes d'efficacité en étudiant la filiation conduisant aux mutants inefficients (particulièrement la souche A_1a).

Par contre, l'obtention de mutants réverses à partir de la souche auxotrophe et inefficace A_1a (exigente en isoleucine-valine, tryptophane et arginine) montre que le retour vers la prototrophie totale n'entraîne pas un retour à l'efficacité. Ces dernières observations démontrent que les déterminants génétiques de celle-ci sont portés par des gènes différents de ceux codant pour la synthèse d'acides-amino.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons étudié le transfert de l'efficacité. L'analyse des recombinants (C_1 à C_{11}) obtenus après croisement des souches M_5N_1 (RP_4) et 2011 m_9d rif montre que ceux-ci sont issus de la souche réceptrice utilisée dans ce croisement (2011 m_9d rif) : ceci a été établi par typage au moyen de phages. Ces recombinants devenus capables de se développer sur milieu minimum ont donc acquis les caractères de prototrophie de la souche donatrice et ont aussi conservé leur inefficacité. Les conclusions de la première partie de notre travail sur l'existence de gènes particuliers commandant le caractère de l'efficacité sont donc confirmées.

Au contraire l'étude des propriétés symbiotiques des recombinants C_I à C_{VIII} provenant du croisement entre les souches 2011 (RP_4) x A_1a str rif montre qu'ils ont acquis le caractère de l'efficacité. Il faut remarquer que la souche utilisée dans cette conjugaison possède des caractères génétiques stables dont les fréquences de réversion ont été établies et sont nettement inférieures aux fréquences de transfert : il est donc bien prouvé que les caractères de l'efficacité ont été transférés.

Si l'on observe l'ébauche de carte génétique établie par MEADE et SIGNER (43) qui ont utilisé la même souche donatrice 2011, on remarque que certains de nos marqueurs (isoleucine-valine, tryptophane et arginine) se situent à proximité les uns des autres : ceci serait en faveur du transfert en bloc de ces mêmes gènes d'auxotrophie au cours de nos deux premiers croisements (2011 (RP₄) x A₁a str rif). On pourrait dire que le caractère de l'efficacité qui est transféré en même temps que ces caractères d'auxotrophie est situé au niveau d'une même région chromosomique. Il faudrait alors admettre soit un transfert d'un secteur du chromosome, comme l'ont prouvé HEUMANN et coll. (39, 41) pour une souche qui appartiendrait au groupe "Rhizobium lupini", soit des conditions de conjugaison telles qu'il y ait passage orienté d'un segment relativement long de DNA.

Nous allons maintenant envisager différentes hypothèses pour expliquer les résultats obtenus, accompagnés des schémas correspondants. Celles-ci tiennent compte de la présence, dans chacune des souches M₅N₁ et 2011 d'un plasmide indigène dont la fonction est encore inconnue (79, 80) et qui pourrait porter les gènes de l'efficacité.

A partir du croisement M₅N₁ (RP₄) x 2011 m₉d str rif (FIGURE 11 a), nous avons sélectionné des recombinants résistants à la tétracycline (Tc^R) qui se sont montrés inefficients. Ceci doit être dû à une mobilisation des gènes chromosomiques Pyr Leu situés sur un même fragment de chromosome de taille inconnue. Le fait qu'ils soient inefficients implique deux hypothèses :

1) Les gènes Nif sont chromosomiques et ne sont pas situés dans la région Cyt - Leu ;

2) Les gènes Nif sont situés sur le plasmide X de la souche M_5N_1 et ne sont pas transférés.

Dans la cellule réceptrice, il y a :

- Soit recombinaison au niveau du chromosome et le facteur RP_4 retrouve son autonomie (FIGURE 11 b) ;

- Soit formation d'un RP_4 -prime portant ce fragment transféré, qui est la conséquence d'un manque de zones d'homologie chromosomiques (puisqu'on a affaire à deux souches différentes) empêchant la recombinaison au niveau du chromosome, ou d'un ordre différent des marqueurs (FIGURE 11 c).

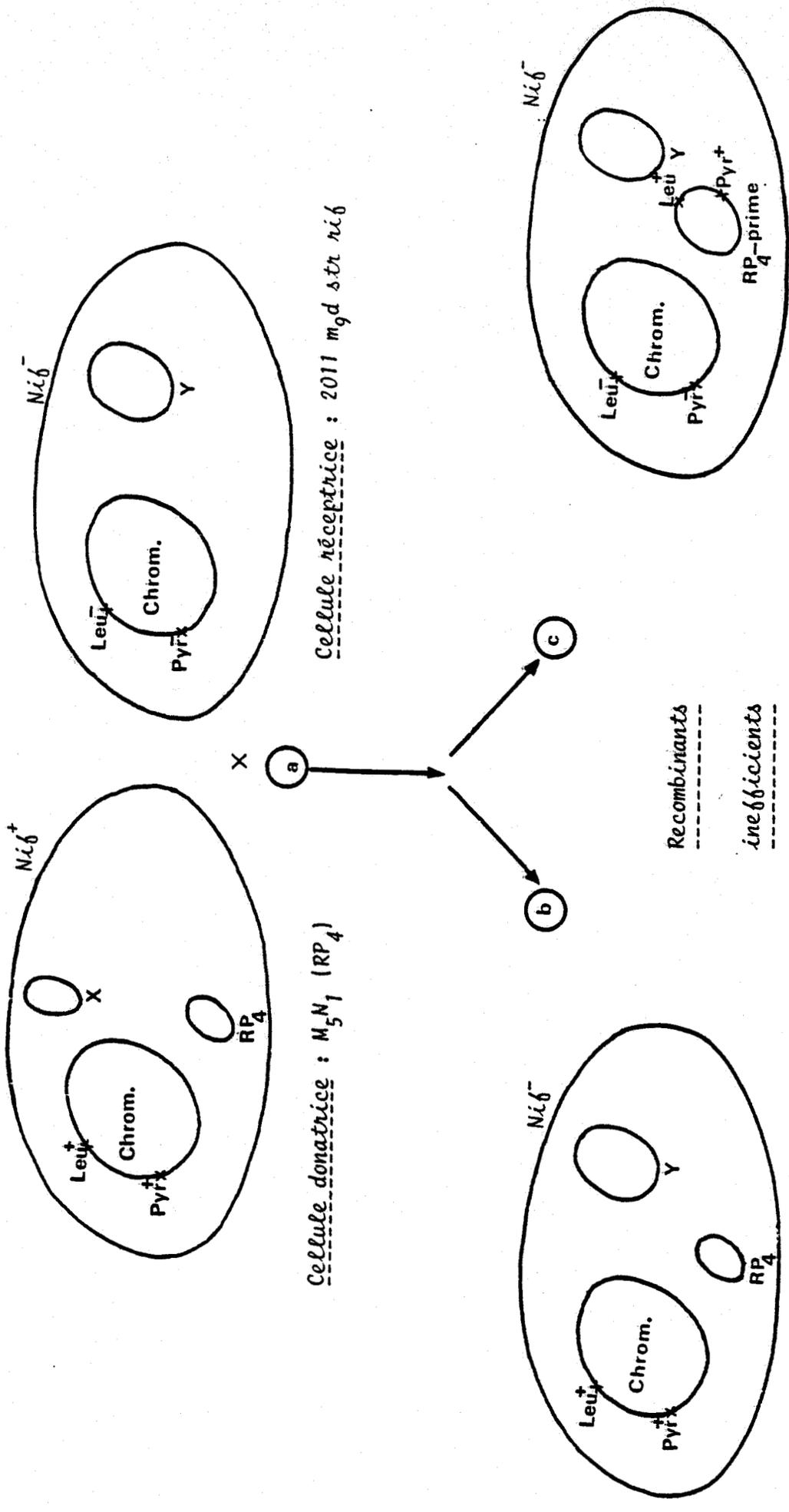
Le croisement 2011 (RP_4) x A_1 str rif (FIGURE 12 a) conduit à l'apparition de recombinants tous efficaces et tétracycline-sensibles. Ceci n'est pas dû à la formation de RP_4 -prime puisque ceux-ci sont tétracycline-sensibles (T_C^S) (cf. schéma FIGURE 11 c). Plusieurs interprétations peuvent être proposées :

a) Le plasmide RP_4 induit un transfert génétique de type Hfr et n'entre pas dans la cellule réceptrice (FIGURE 12 b) ; dans ce cas, les gènes Nif seraient localisés à proximité des gènes Ilv - Try - Arg. La faible fréquence observée (10^{-5}) serait due au fait que la souche réceptrice est différente de la souche donatrice et peut exercer une restriction sur les fragments transférés.

b) Le plasmide Y mobilise le fragment portant les gènes *ilv*, *try* et *arg*, les gènes *Nif* se situant à proximité de ceux-ci ou sur le plasmide Y (dans ce cas, le plasmide Y est conjugatif) (FIGURE 12 c).

c) Les plasmides RP_4 et Y ont fusionné (donnant un plasmide co-intégré) et ont mobilisé les gènes étudiés (FIGURE 12 d). La formation d'un plasmide RP_4 -Y (ou RP_4 -Y-prime) dans la cellule est exclue puisque les clones sont tétracycline-sensibles. Il ne peut y avoir que transfert polarisé. Si le plasmide Y porte les gènes *Nif*, il passe dans tous les cas (puisque tous les recombinants sont efficaces). Cette dernière hypothèse est très peu vraisemblable puisque le plasmide RP_4 n'est pas transféré.

En conclusion, il est démontré dans ce travail que les gènes *Nif* sont transférables par conjugaison chez *Rhizobium meliloti* ; cependant, nous n'avons pas été en mesure de déterminer leur localisation au niveau du matériel génétique de la cellule ; nos résultats devraient être complétés par une étude ultérieure de biologie moléculaire et de clonage des gènes portés par les plasmides indigènes des souches employées dans nos croisements, afin de préciser les modalités du transfert des gènes *Nif* chez *Rhizobium meliloti*.



2011 mgd str rif Leu⁺ Pyr⁺ (RP₄)

2011 mgd rif Leu⁺ Pyr⁺ RP₄-prime

On ne sait pas si le plasmide X de la souche M₅N₁ (RP₄) est entré dans la bactérie réceptrice, si c'était le cas, il ne porterait pas les gènes Nif.

Chrom. = Chromosome

FIGURE 11 : DIFFÉRENTES HYPOTHÈSES RELATIVES AU RÉSULTAT DU CROISEMENT M₅N₁ (RP₄) X 2011 M₀D RIF.



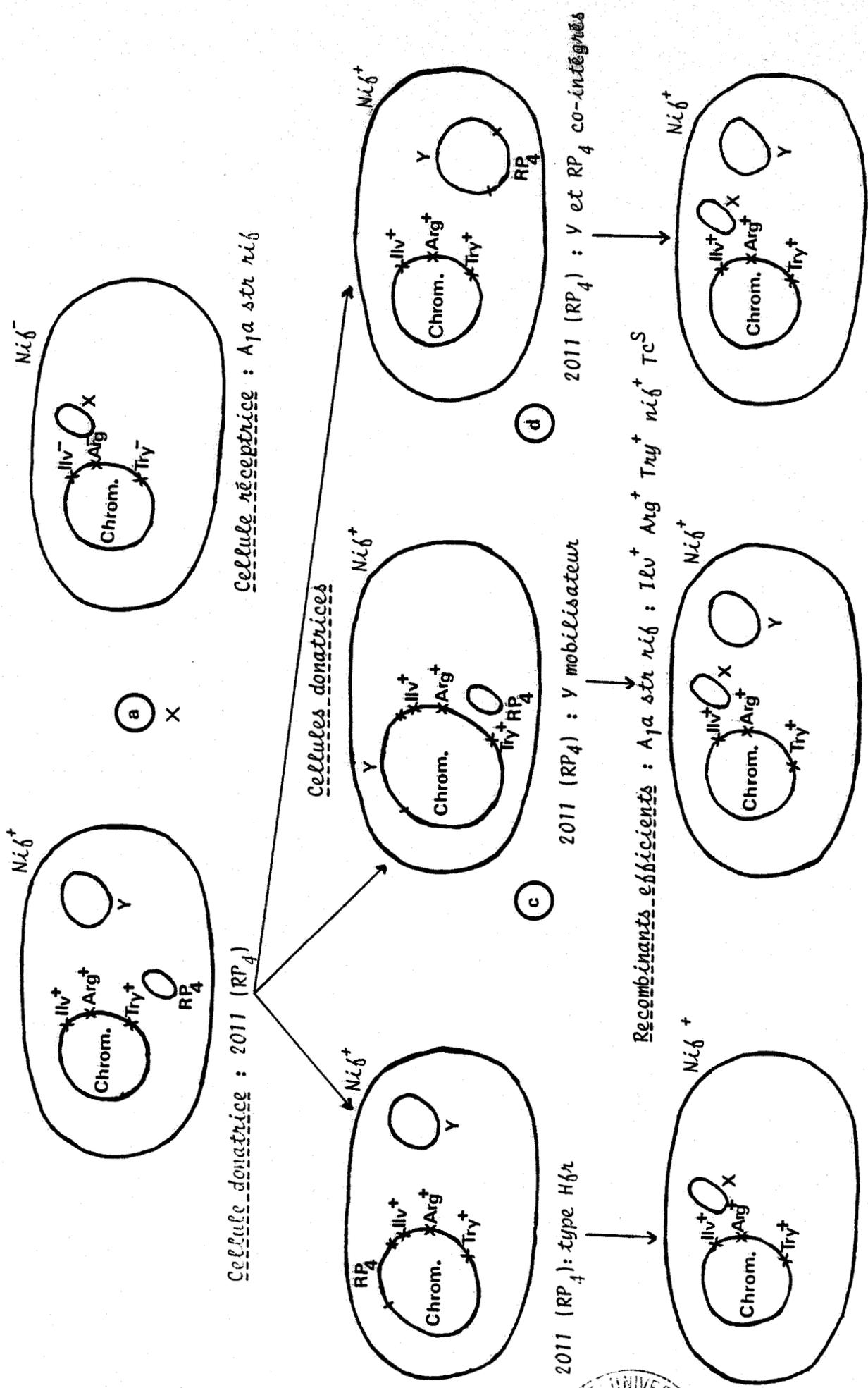


FIGURE 12 : DIFFÉRENTES HYPOTHÈSES RELATIVES AU RÉSULTAT DU CROISEMENT 2011 (RP₄) X A_{1A} STR RIF

- (1) POSTGATE J. 1976. La fixation biologique de l'azote. La Recherche, 7 : 335-347.
- (2) PLUCHET R. 1978. Manger, vivre autrement. J. de défense et d'information des consommateurs de soins médicaux, 7 : 8-9.
- (3) LIPMAN J.C. and CONYBEARE A.B. 1936. Bull. N. J. Agric. Exp. sta. 607.
- (4) BRETH S.A. 1975. The return of Medic. Relevé du CIMMYT Today, 3 : 1-16.
- (5) LORKIEWICZ Z. and MELKE A. 1970. Infectiveness of the histidine-dependent mutant of Rhizobium trifolii. Acta Microbiol. Polon., ser A, 2 : 75-77.
- (6) BERINGER J.E., JOHNSTON A.W.B. and WELLS B. 1977. The isolation of conditional ineffective mutants of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol., 98 : 339.
- (7) MAIER R.J. and BRILL W.J. 1976. Ineffective and non-nodulating mutant strains of Rhizobium japonicum. J. Bacteriol., 127 : 763.
- (8) CUTTING J.A. and SCHULMAN H.M. 1971. The biogenesis of leghemoglobin. The determinant in the Rhizobium legume symbiosis for leghemoglobin specificity. Biochim. Biophys. Acta, 229 : 58-62.
- (9) LORKIEWICZ Z., RUSSA R. and URBANIK T. 1978. Nitrogen fixation by Rhizobium in pure cultures. Acta Microbiol. Polon., 27 : 5-9.
- (10) KANESHIROT T., CROWELL C.D. and HANKARAN R.F. 1978. Acetylene reduction activity in free-living cultures of Rhizobia. Int. J. Syst. Bacteriol, 28 : 27-31.
- (11) KEISTER D.L. 1975. Acetylene reduction by pure cultures of Rhizobia. J. Bacteriol., 123 : 1265-1268.
- (12) JANSEN VAN RENSBURG H., STRLJDOM B.W. and RABIE C.J. 1968. Nature of the genetic determinant of infectiveness in strains of Rhizobium japonicum. South African Journal of Agriculture Science, 11 : 623-626.

- (13) KLECZKOWSKA J. 1965. Mutations in symbiotic effectiveness in Rhizobium trifolii caused by transforming DNA and other agents. J. Gen. Microbiol., 40 : 377-383.
- (14) SHERRER A. 1970. Etude des propriétés symbiotiques de certains mutants auxotrophes de Rhizobium meliloti. Faculté des sciences d'Orsay, D.E.A. d'Amélioration des Plantes.
- (15) SCHERRER A. and DENARIE J. 1971. Symbiotic properties of some auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti and of their prototrophic revertants. Plant and soil, special volume : 39-45.
- (16) SCHWINGHAMER E.A. 1968. Loss of effectiveness infectivity in mutants of Rhizobium resistant to metabolic inhibitors. Can. J. Microbiol., 14 : 355-367.
- (17) GUPTA B.M. et KLECZKOWSKA J. 1962. A study of some mutations in strain of Rhizobium trifolii. J. Gen. Microbiol., 27 : 473-476.
- (18) BERINGER J.E., JOHNSTON A.W.B. and WELL B. 1977. The isolation of conditional ineffective mutants of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol., 98 : 339-343.
- (19) DENARIE J. 1969. Une mutation provoquant l'auxotrophie pour l'adénine et la perte du pouvoir fixateur d'azote chez Rhizobium meliloti. Compt. Rend. Acad. Sci., 269 : 2464.
- (20) HENDRY G.S. and JORDAN D.C. 1969. Ineffectiveness of viomycin-resistant mutants of Rhizobium meliloti. Can. J. Microbiol., 15 : 671-675.
- (21) DENARIE J., TRUCHET G. et BERGERON B. 1976. Effects of some mutations on symbiotic properties of Rhizobium. Dans Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants, édité par P.S. NUTMAN. Cambridge University Press, 47-61.
- (22) SCHWINGHAMER E.A. 1964. Association between antibiotic resistance and effectiveness in mutant strains of Rhizobium spp. Can. J. Microbiol., 10 : 221-233.

- (23) ABDEL-WAHAB S.M., RIFAAT OKM., AHMED K.A. and HAMDI Y.A. 1976. Resistance to antibiotics in Rhizobium trifolii and its relation to nitrogen fixation. ZbI : Bakt-Abt. II, 131 : 170-178.
- (24) SCHWINGHAMER E.A. 1967. Effectiveness of Rhizobium as modified by mutation for resistance to antibiotics. Antonie V. Leeuwenhoek, 33 : 121-136.
- (25) BALASSA G. 1963. Genetic transformation of Rhizobium. Bacteriological Reviews, 27 : 228-241.
- (26) BALASSA R. 1960. Transformation of a strain of Rhizobiul lupini. Nature, 188 : 246-247.
- (27) BALASSA R. and GABOR M. 1961. Transformation in nodule bacteria. Mikrobiologiya, 30 : 396-400.
- (28) BALASSA R. and GABOR M. 1965. Transformation of streptomycin markers in rough strains of Rhizobium lupini. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 11 : 330-337.
- (29) MARECKOVA H. 1969. Transformation in Rhizobium japonicum. Archiv. Mikrobiol., 68 : 113-115.
- (30) ZELAZNA-KOWALSKA I. and LORKIEWICZ 1971. Transformation in Rhizobium trifolii : VI. Correlation between streptomycin resistance and infectiveness in Rhizobium trifolii. Acta. Microbiol. Polon., 3 : 11-20.
- (31) ELLIS J., KALZ G.C. and DONCASTER J.J. 1962. Transformation in Rhizobium trifolii. Can. J. Microbiol., 8 : 835-840.
- (32) RAINA J.L. and MODI. 1972. Deoxyribonucleate binding and transformation in Rhizobium japonicum. J. Bacteriol., 111 : 356-360.
- (33) DANDEKA D.M., VASAVADA H.R. and MODI 1978. Partial purification of a competence factor from Rhizobium japonicum. Arch. Microbiol., 118 : 253-256.

- (34) KOWALSKI M. 1966. Transduction in Rhizobium meliloti. Microbiol. genetics Bulletin, 25 : 9-10.
- (35) KOWALSKI M. 1968. Transduction of streptomycin resistance by Rhizobium meliloti phages. Microbiol. genetics Bulletin, 29 : 16.
- (36) KOWALSKI M. 1971. Transduction in Rhizobium meliloti. Plant and soil, special volume : 63-66.
- (37) KOWALSKI M. and DENARIE J. 1972. Transduction d'un gène contrôlant l'expression de la fixation de l'azote chez Rhizobium meliloti. Compt. Rend. Acad. Sci., 275 : 141-144.
- (38) HEUMANN W. 1968. Conjugation in star-forming Rhizobium lupini. Molec. Gen. Genet., 102 : 132-144.
- (39) HEUMANN W., PÜHLER A. and WAGNER E. 1971. The two transfer regions of the Rhizobium lupini conjugation. I. Fertility factor elimination and one way transfer. Molec. Gen. Genet., 113 : 308-315.
- (40) HEUMANN W., MAYER F. and PÜHLER A. 1971. Conjugation in star-forming bacteria. First international symposium. Genetics of Industrial Microorganisms, Prague.
- (41) HEUMANN W., PÜHLER A. and WAGNER E. 1973. The two transfer regions of the Rhizobium lupini conjugation. II Genetic characterization of the transferred chromosomal segments. Molec. Gen. Genet., 126 : 267-274.
- (42) HEUMANN W. and SPRINGER R. 1977. Formation of merodiploid clones by conjugation in Rhizobium lupini. Molec. Gen. Genet., 150 : 73-79.
- (43) MEADE H.M. and SIGNER E.R. 1977. Genetic mapping of Rhizobium meliloti. Proc. Nat. Acad. Sci., 74 : 2076-2078.
- (44) KONDOROSI A., KISS G.B., FORRAI T., VINCZE E. and BANFALVI Z. 1977. Circular linkage map of Rhizobium meliloti chromosome. Nature, Vol. 268, 525-527.

- (45) JULLIOT J.S. and BOISTARD P. 1979. Use of RP4-Prime plasmids constructed in vitro to promote a polarized transfer of the chromosome in Escherichia coli and Rhizobium meliloti. Molec. gen. Genet., 173 : 289-298.
- (46) BERINGER J.E., HOGGAN S.A. and JOHNSTON A.W.B. 1978. Linkage mapping in Rhizobium leguminosarum by means of R-plasmid-mediated conjugation. J. Gen. Microbiol., 104 : 201-208.
- (47) DIXON R.A. and POSTGATE J.R. 1971. Transfer of nitrogen-fixation genes by conjugation in Klebsiella pneumoniae. Nature, 234 : 47-48.
- (48) DIXON R.A. and POSTGATE J.R. 1972. Genetic transfer of nitrogen fixation from Klebsiella pneumoniae to Escherichia coli. Nature, 237 : 102-103.
- (49) STANLEY J. and DUNICAN L.K. 1979. Intergeneric mobilization of Rhizobium Nif genes to Agrobacterium and Klebsiella. Molec. gen. Genet., 174 : 211-220.
- (50) MAIER R.J., BISHOP P.E. and BRILL W.J. 1978. Transfer from Rhizobium japonicum to Azotobacter vinelandii of genes required for nodulation. J. Bacteriology, 134 : 1199-1201.
- (51) PAGE W.J. 1978. Transformation of Azotobacter vinelandii strains unable to fix nitrogen with Rhizobium spp DNA. Canad. J. Microbiol., 24 : 282-288.
- (52) DUNICAN L.K., TIERNEY A.B. 1974. Genetic transfer of nitrogen fixation from Rhizobium trifolii to Klebsiella aerogenes. Biochemical and Biophysical research communications, 57 : 62-72.
- (53) DUNICAN L.K., O'GARA F. and TIERNEY A.B. 1976. Plasmid control of effectiveness in Rhizobium : transfer of nitrogen-fixing genes on a plasmid from Rhizobium trifolii to Klebsiella aerogenes. Dans: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants, édité par P.S. NUTMAN. Cambridge University Press, 77-90.
- (54) JOHNSTON A.W.B. and BERINGER J.E. 1977. Chromosomal recombination between Rhizobium species. Nature, 267 : 611.

- (55) JOHNSTON A.W.B., BEYNON J.L., BUCHANAN-WOLLASTON A.V., SETCHELL S.M., HIRSCH P.R. and BERINGER J.E. 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of Rhizobium. *Nature*, 276 : 634-636.
- (56) KLEIN G.E., JEMISON R.A. and MATTHYSSE A.G. 1975. Physical evidence of a plasmid in Rhizobium japonicum. *Experientia*, 31 : 532-533.
- (57) NUTI M.P., LEDEBOER A.M., LEPIDI A.A. and SCHILPEROORT R.A. 1977. Large plasmids in different Rhizobium species. *J. Gen. Microbiol.*, 100 : 241-248.
- (58) BECHET M. 1979. Recherches sur l'acide désoxyribonucléique de Rhizobium meliloti. Thèse de 3e cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- (59) HIGASHI S. 1967. Transfer of clover infectivity of Rhizobium trifolii to Rhizobium phaseoli as mediated by an episomic factor. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 13 : 391-403.
- (60) ZURKOWSKI W., HOFFMAN M. and LORKIEWICZ Z. 1973. Effect of acriflavine and sodium dodecyl sulphate on infectiveness of Rhizobium trifolii. *Acta Microbiol. Polon.*, 5 : 55-60.
- (61) JOHNSTON A.W.B., SETCHELL S.M. and BERINGER J.E. 1978. Interspecific crosses between Rhizobium leguminosarum and Rhizobium meliloti. Formation of haploid recombinants and of R.-primes. *J. Gen. Microbiol.*, 104 : 209-218.
- (62) BONNIER C. et BRAKEL J. 1969. Lutte biologique contre la faim. Presses agronomiques de Gembloux, ASBL ed. Duculot S.A. : 102-105.
- (63) COURTOIS B. 1975. Etude des polyosides de Rhizobium. Thèse de 3e cycle. Université des Sciences et Techniques de Lille.
- (64) LEDERBERG J. and LEDERBERG E.M. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.*, 63 : 399-406.
- (65) KOCH B. and EVANS H.J. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. *Plant Physiol.*, 41 : 1748-1750.

- (66) KOCH B., EVANS H.J. and RUSSEL S. 1967. Reduction of acetylene and nitrogen gas by breis and cell-free extracts of soybean root nodules. *Plant Physiol.*, 42 : 466-468.
- (67) STEWART W.D.P., FITZGERALD G.P. and BORRIS R.H. 1967. In situ studies on N_2 fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 58 : 2071-2078.
- (68) HARDY L.W.F., HOLSTEN R.D., JACKSON E.K. and BURNS R.C. 1968. The acetylene ethylene assay for N_2 fixation : Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43 : 1185-1207.
- (69) SCHWINGHAMER E.A., EVANS H.T. and DAWSON M.D. 1970. Evaluation of effectiveness in mutant strains of Rhizobium by acetylene reduction relative to other criteria of N_2 fixation. *Plant and Soil*, 33 : 192-212.
- (70) POSTGATE J. 1971. The acetylene test for nitrogenase. Appendix 2. Dans the chemistry and biochemistry of nitrogen fixation. Plenum press : 311-315.
- (71) SCHWINGHAMER E.A. 1969. Mutation to auxotrophy and prototrophy as related to symbiotic effectiveness in Rhizobium leguminosarum and Rhizobium trifolii *Can. J. Microbiol.*, 15 : 611-622.
- (72) HUBBEL D.H. et ELKAN G.M. 1967. Correlation of physiological characteristics with nodulating ability in Rhizobium japonicum. *Can J. Microbiol.*, 13 : 235-245.
- (73) NUTMAN P.S. 1969. Genetics of symbiosis and nitrogen fixation in legumes. *Proc. Roy. Soc.*, 172 : 417-437.
- (74) NUTMAN P.S. 1948. *Ann. Bot.*, 12 : 81.
- (75) NUTMAN P.S. 1952. *Proc. Roy. Soc. B.*, 139 : 170.
- (76) DELMAERE F. 1979. Etude des transferts génétiques chez Rhizobium meliloti au moyen du plasmide RP_4 . Thèse de 3e cycle. Université des Sciences et Techniques de Lille.

- (77) SCHWINGHAMER E.A. 1970. Requirement for riboflavin for effective symbiosis on clover by an auxotrophic mutant strain of Rhizobium trifolii. Austr. J. Biol. Sci., 23 : 1187-1196.
- (78) TRUCHET G. et DENARIE J. 1973. Ultrastructure et activité réductrice d'acétylène des nodosités de luzerne (Medicago sativa L.) induites par des souches de Rhizobium meliloti auxotrophes pour la leucine. Compt. Rend. Acad. Sci., 277 : 925-928.
- (79) BECHET M. et GUILLAUME J.B. 1978. Mise en évidence d'ADN extrachromosomique chez Rhizobium meliloti. Can. J. Microbiol., 24 : 960-966.
- (80) SPITZBARTH M., PÜHLER A. and HEUMANN W. 1979. Characterization of plasmids isolated from Rhizobium meliloti. Arch. Microbiol., 121 : 1-7.