

50376
1980
86

50376
1980
86

N° d'ordre : 813

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

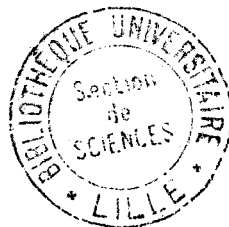
Spécialité : Biochimie

Option : Microbiologie

par

Roland Richard RAKOTOARISOA

ETUDE D'UN MUTANT ACIDO-RESISTANT DE RHIZOBIUM MELILOTI



Soutenue le 5 mars 1980 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :	MM. J. GUILLAUME	Président
	R. TAILLIEZ	Rapporteur
	C. BONNIER	
	J.C. DERIEUX	Examineurs
	J. KREMBEL	

A mes Parents,

*Qu'ils trouvent ici l'expression de ma
reconnaissance et de mon profond respect.*

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille sous la direction de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME. Nous tenons à le remercier tout particulièrement de nous avoir accueilli. Sa confiance et ses conseils judicieux nous ont permis la réalisation de ce travail. Nous lui exprimons toute notre gratitude et notre profond respect.

Nous remercions Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ pour l'amabilité avec laquelle il a bien voulu accepter d'être le rapporteur de cette thèse.

Que Monsieur le Recteur C. BONNIER de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Monsieur le Professeur J.C. DERIEUX et Monsieur le Professeur J. KREMBEL qui nous ont fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail trouvent ici l'expression de notre reconnaissance.

Nos remerciements s'adressent également à tous ceux, amis, collègues du Laboratoire et plus particulièrement à Madame P. LETOQUART, pour la sympathie et la gentillesse qu'ils nous ont toujours manifestés.

Enfin, nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à Madame ROUY qui à divers titres nous a apporté régulièrement son aide.

Table des Matières

	Pages
<u>AVANT PROPOS</u>	1
<u>GENERALITES</u>	2
I - La symbiose <u>Rhizobium</u> -légumineuses.....	2
A - Mécanisme symbiotique.....	3
B - Problème de la spécificité.....	3
II - Facteurs extrinsèques affectant la symbiose.....	5
A - Facteurs influençant la survie et la multiplication des <u>Rhizobium</u>	5
1° L'acidité.....	5
2° Autres facteurs.....	6
B - Facteurs affectant la nodulation.....	8
1° L'acidité.....	8
2° Autres facteurs.....	9
C - Facteurs influençant la fixation de l'azote.....	11
1° L'acidité.....	11
2° Autres facteurs.....	11
III - Conclusion.....	13
 <u>CHAPITRE 1 : OBTENTION DES MUTANTS</u>	15
. <u>Matériel et méthodes</u>	15
I - Souches bactériennes.....	15
II - Milieux de culture.....	15
A - Milieu complet : RC.....	15
B - Milieu minimum : R.....	16
C - Gélose blanche.....	16
III - Techniques de numération.....	17
A - Numération des cellules viables.....	17
B - Densité optique.....	17
IV - La mutagenèse.....	17
A - Mode d'action de la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG).....	18
B - Conditions optimales de la mutagenèse par NTG.....	18
C - Mode opératoire.....	18
V - Technique d'obtention de mutants résistant à la dihydrostreptomycine....	19

	Pages
. <u>Résultats et discussion</u>	21
I - Etude de la croissance bactérienne.....	21
A - La souche <u>Rhizobium meliloti</u> M ₉ S.....	21
1° Evolution de la croissance en fonction du pH sur milieu glucose	21
a) croissance.....	21
b) évolution du pH lors de la croissance.....	23
c) numération de cellules viables.....	23
d) discussion.....	24
2° Evolution de la croissance en fonction du pH sur milieu fructose	25
a) croissance.....	25
b) évolution du pH lors de la croissance.....	26
B - La souche <u>Rhizobium meliloti</u> 1-5	26
1° Evolution de la croissance en fonction du pH sur milieu glucose	26
a) croissance	26
b) évolution du pH lors de la croissance.....	28
2° Evolution de la croissance en fonction du pH sur milieu fructose.	29
C - Discussion.....	30
II - La mutagenèse.....	30
A - La souche <u>Rhizobium meliloti</u> M ₉ S.....	30
1° Etude de la souche mutée M ₉ Sm.....	30
a) obtention de M ₉ Sm.....	30
b) Comparaison des souches M ₉ S et M ₉ Sm.....	32
2° Etude de la souche mutée M ₉ Sm ₁ ^{Str}	34
a) obtention de M ₉ Sm ₁	34
b) comparaison des souches M ₉ Sm et M ₉ Sm ₁	34
c) résistance à la dihydrostreptomycine.....	37
d) détermination du pH limite de la croissance M ₉ Sm ₁ ^{Str}	37
e) mutagenèse de la souche M ₉ Sm ₁ ^{Str}	38
B - La souche <u>Rhizobium meliloti</u> 1-5 ^{Str}	40
. <u>Discussion et conclusion</u>	40

	Pages
<u>CHAPITRE 2 : LA SYMBIOSE</u>	42
. <u>Matériel et méthodes</u>	42
I - La luzerne.....	43
II - Les souches de <u>Rhizobium meliloti</u>	43
III - Les terres de BRETAGNE.....	43
IV - Les milieux.....	44
A - Milieu de NICOL et THORNTON.....	44
B - Milieu RN.....	45
V - Désinfection des graines et prégermination.....	45
A - Désinfection des graines.....	45
B - Prégermination.....	45
VI - Culture aseptique de la luzerne.....	46
VII - Détermination du poids sec de la plantule.....	46
VIII - Mesure de la fixation d'azote : dosage de l'éthylène provenant de la réduction de l'acétylène.....	47
A - Principe.....	47
B - Conditions expérimentales.....	48
C - Technique du dosage.....	48
D - Calcul de la quantité de C ₂ H ₄ (éthylène) produite (ΔQ).....	49
E - Détermination de K.....	49
. <u>Résultats et discussion</u>	50
I - Etude préliminaire des différentes souches.....	50
A - Milieu pH 7,2.....	50
B - Milieu pH 5,5.....	52
C - Discussion.....	53
II - Etude en fonction du pH sur milieu synthétique.....	54
A - La nodulation.....	55
B - Le rendement en matière sèche.....	56
C - Quantité d'éthylène produite.....	57
D - Discussion.....	58
III - Etude des milieux contenant de la terre acide de BRETAGNE.....	59
A - Suspension de terre de BRETAGNE en milieu de NICOL et THORNTON gélosé.....	59
1° Terre pH 5,9.....	60
2° Terre pH 4,9.....	61
B - Sable de FONTAINEBLEAU.....	62
IV - Terre de BRETAGNE pH 5,9.....	65
. <u>Discussion et conclusion</u>	67

	Pages
CHAPITRE 3 : ETUDE PHYSIOLOGIQUE DES SOUCHES DE RHIZOBIUM MELILOTI M_0S et M_0Sm_1 ^{Str}	68
. <u>Matériel et méthodes</u>	69
I - Milieux de culture.....	69
A - Milieu TY.....	69
B - Milieu RN_2^{2C} (RN^- 2 fois concentré en phosphate).....	69
C - Milieu R^{2C} (R 2 fois concentré en phosphate).....	69
II - Milieux de synthèse.....	70
A - Tampon phosphate.....	70
B - Mélange des acides aminés.....	70
1° Solution A.....	70
2° Solution B.....	70
3° Mélange d'acides aminés.....	70
III - Synthèse des macromolécules.....	71
A - Généralités.....	71
B - Synthèse des exopolyosides.....	71
1° Généralités.....	71
2° Synthèse et dosage d'exopolyosides.....	72
a) synthèse.....	72
b) dosage.....	72
C - Incorporation de la thymidine radioactive dans l'ADN.....	73
1° Marquage de l'ADN.....	73
2° Dosage.....	74
D - Synthèse des protéines.....	74
IV - Etude de la pénétration du fructose.....	75
. <u>Résultats et discussion</u>	76
I - Morphologie des souches.....	76
II - Etude du temps de génération.....	77
III - Croissance limite à forte inoculation.....	80
IV - Synthèse des macromolécules.....	81
A - Synthèse des exopolyosides.....	81
1° Synthèse.....	81
a) milieu de synthèse pH 7,2.....	82
b) milieu de synthèse pH 5,9.....	84
c) Discussion.....	85
2° Perméabilité au fructose.....	86
B - Incorporation de la leucine radioactive.....	87
C - Production d'ATP au cours de la croissance cellulaire.....	88
D - Incorporation de la thymidine dans l'ADN.....	90
1° Incorporation.....	90
2° Etude de l'influence de la 2'-déoxy-adénosine et de la thymidine sur la croissance.....	93
3° Etude comparative de la croissance.....	94

. Discussion et conclusion..... 97

CONCLUSION GENERALE..... 100

BIBLIOGRAPHIE.....

Avant-propos

AVANT PROPOS

:=:=:=:=:=

Un des grands problèmes de notre société est la transformation de l'azote de l'atmosphère en ammoniac et en composés azotés, tels que les acides aminés composants de base des protéines.

Pour construire les protéines qui sont essentielles à sa survie, l'homme utilise des acides aminés qu'il emprunte aux plantes et/ou aux protéines des animaux qu'il consomme et assimile, eux-mêmes ayant fabriqué ces constituants à partir des acides aminés des plantes seuls organismes supérieurs de la biosphère à pouvoir transformer à l'aide des bactéries, l'azote gazeux en substances azotées nutritives.

Actuellement, les recherches concernant la transformation de l'azote atmosphérique en azote ammoniacal, effectuées dans le domaine génétique, sont destinées à remplacer les procédés chimiques coûteux et compliqués utilisant catalyseurs et hautes pressions, pour synthétiser les engrais azotés.

Deux voies de recherche sont particulièrement intéressantes :

a - La production "in vitro" du site actif de l'enzyme nitrogénase, qui transforme, chez les bactéries vivant en symbiose avec les plantes et chez certaines bactéries ou algues indépendantes, l'azote de l'air en ammoniac.

b - Les modifications permettant d'accroître le rendement de certaines plantes légumineuses en agissant au niveau des gènes de bactéries symbiotiques fixatrices d'azote.

C'est dans cette deuxième voie que nous avons orienté notre travail. En effet, la fixation de l'azote par les légumineuses, grâce à la symbiose Rhizobium-Légumineuse présente un intérêt agronomique considérable, puisqu'elle apparaît comme un moyen très économique de maintenir ou d'accroître le stock d'azote du sol, voire même de permettre une suppression de l'utilisation des

engrais azotés dans les cultures et de produire à bon compte, des protéines alimentaires dont certaines régions, notamment les pays du Tiers Monde, ont un besoin croissant. De plus, la symbiose accroît la fertilité du sol grâce aux exsudats racinaires.

Cette fixation symbiotique dépend de plusieurs facteurs, entre autres :

- 1 - Facteurs influençant la croissance de la plante hôte.
- 2 - Conditions d'existence et de survie des Rhizobium dans le sol.
- 3 - Facteurs influençant l'infectivité (processus de la nodulation) de Rhizobium elle-même.
- 4 - Facteurs affectant la fixation symbiotique.

Cet effet favorable ne peut être obtenu qu'en présence d'une (ou plusieurs) souche(s) de Rhizobium hautement efficiente(s) à toutes les conditions de l'environnement, en particulier le pH du sol. Si une telle souche n'existe pas dans le sol considéré, il est nécessaire de l'introduire.

Notre travail a pour objectif la mise au point d'un mode d'inoculation de la luzerne (Medicago sativa) par une souche adaptée de Rhizobium meliloti, de façon à améliorer la culture de cette plante dans les sols acides, de Bretagne en particulier.

L'établissement de cette culture de luzerne est liée étroitement à la présence d'inocula (R. meliloti) ayant une grande affinité pour la plante-hôte dans ces sols acides. Cette dernière devient alors rapidement indépendante de l'azote du sol et produit des récoltes d'une meilleure qualité.

Un tel R. meliloti doit avoir les caractéristiques suivantes :

- 1 - Persistance dans le sol concerné.
- 2 - Aptitude à concurrencer les autres Rhizobium indigènes.
- 3 - Capacité à former rapidement des nodules.
- 4 - Efficacité symbiotique dans ces sols.

Avant d'exposer les résultats de nos travaux, nous présentons dans la partie : Généralités, une étude bibliographique des facteurs extrinsèques affectant la symbiose, tout en exposant très rapidement dans cette première partie, un aperçu général de la symbiose.

Généralités

I - LA SYMBIOSE RHIZOBIUM - LEGUMINEUSE

Des associations étroites peuvent s'établir au niveau des racines entre les micro-organismes et les plantes supérieures : ce sont les associations symbiotiques. Ces associations font intervenir des champignons (associations mycorrhiziennes), des bactéries (associations symbiotiques Rhizobium-Légumineuses) ou des micro-organismes non identifiés (associations symbiotiques avec des non légumineuses).

L'association symbiotique entre les plantes de la famille des légumineuses et les bactéries du genre Rhizobium conduit à la formation de nodules sur les racines des plantes, à l'intérieur desquels l'azote atmosphérique est transformé en azote organique grâce à la nitrogénase (5, 51), enzyme responsable de la réduction de l'azote atmosphérique (5) en azote ammoniacal ; ce dernier pouvant être métabolisé par la plante.

Cette association présente un intérêt bénéfique pour la plante hôte, qui utilise pour son propre compte l'azote atmosphérique fixé par Rhizobium ; de son côté, la bactérie trouve dans les nodules, un milieu nutritif favorable.

En plus de cette contribution à recycler l'azote moléculaire, perdu partiellement par dénitrification, cette symbiose est pratiquée dans l'agronomie pour enrichir le sol en matières organiques perdues par l'exploitation intensive des récoltes.

Par contre, tous les nodules ne fixent pas nécessairement l'azote ; ceux capables de le faire sont dits efficaces, alors que les nodules inefficaces ne sont doués d'aucun pouvoir fixateur.

Avant d'aborder les facteurs extrinsèques influençant la fixation symbiotique, il nous est nécessaire de rappeler brièvement les principales phases

de l'établissement de la symbiose entre le Rhizobium et les légumineuses, qui à présent sont bien connues et font l'objet de nombreuses revues (19, 28, 56).

A - MECANISME SYMBIOTIQUE

La première étape est la préinfection de la racine de la légumineuse. Elle se traduit par une multiplication des Rhizobium spécifiques dans la rhizosphère, et une déformation des poils absorbants. On a d'abord pensé que cette dernière était due soit à l'action de l'acide 3-indolyl-acétique (AIA) provenant de l'oxydation du tryptophane par le Rhizobium, soit à l'intervention chez la plante-hôte, de polygalacturonases induites par la présence des polysaccharides sécrétées par les Rhizobium (27, 57). Des études récentes ont montré qu'elle est due à l'action d'un (ou plusieurs) facteur(s) contenu(s) dans les filtrats cellulaires de Rhizobium (56, 100, 118, 119).

Les bactéries, dans un deuxième temps, pénètrent dans le tissu racinaire. Elles subissent plusieurs divisions et cheminent par la voie du "cordon infectieux" vers les cellules végétales tétraploïdes constituant le tissu nodulaire. Ces dernières se multiplient. C'est l'infection et la genèse du nodule (26, 80).

Les bactéries sont libérées en dehors du cordon d'infection où elles se différencient en bactéroïdes (46). Il est à noter que ces bactéries ne sont pas libérées directement dans le cytoplasme, mais sont enveloppées d'une membrane de séquestration d'origine végétale (31, 49). C'est au cours de cette phase que la leghémoglobine se forme et que l'azote moléculaire est fixé.

Un tel mécanisme nécessite une spécificité du Rhizobium vis-à-vis de la plante-hôte.

B - PROBLEME DE LA SPECIFICITE

Les Rhizobium appartiennent à la famille des rhizobiacées. Ils sont présents dans tous les sols (à l'exception des sols toxiques). Une souche de Rhizobium ne peut infecter et noduler indifféremment n'importe quel genre ou espèce de légumineuse. Un Rhizobium isolé de nodosités de luzerne est incapable de provoquer la nodulation sur une arachide et inversement.

La notion d'inoculation est fondée sur le caractère d'infectivité ou pouvoir de nodulation de la plante-hôte. Elle ne tient pas compte du caractère d'efficiencia ou aptitude à fixer l'azote.

BONNIER (8) montre que la spécificité d'hôte peut, dans certains cas, être liée à l'efficiencia. Ainsi, une souche efficiencia vis-à-vis de Medicago sativa présente une spécificité d'hôte plus étroite, plus stricte, qu'une souche non efficiencia pour la même plante-hôte.

: CROISSANCE	: GENRE	: ESPECES	: GROUPE D'INOCULATION
LENTE	RHIZOBIUM	: <u>R. japonicum</u>	: <u>Glycine</u> (Soja)
		: <u>R. lupini</u>	: <u>Lupinus</u>
		:	: <u>Ornithopus</u>
		: <u>R. "cowpea-group"</u>	: <u>Arachis</u> , <u>Lotus</u>
		: (groupe hétérogène)	: <u>Vigna</u>
RAPIDE	RHIZOBIUM	: <u>R. meliloti</u>	: <u>Medicago</u>
		:	: <u>Melilotus</u>
		:	: <u>Trigonella</u>
		: <u>R. phaseoli</u>	: <u>Phaseolus</u> (haricot)
		: <u>R. trifolii</u>	: <u>Trifolium</u> (trèfle)
		: <u>R. leguminosarum</u>	: <u>Pisum</u> , <u>Vicia</u>
		:	: <u>Cicer</u> , <u>Lens</u>

Tableau 1 : Classification des Rhizobium d'après VINCENT (108) suivant les groupes d'inoculation.

Toutefois, l'implantation de la culture des légumineuses ne dépend pas seulement de la plante-hôte, du Rhizobium, mais aussi des facteurs propres à

l'environnement. En effet, la présence d'une souche bactérienne efficace n'implique pas nécessairement qu'une légumineuse fixera l'azote atmosphérique. Les nodules peuvent même dans certains cas, ne pas se former. Les conditions du milieu ont une importance toute spéciale, car elles suffisent à expliquer la plus grande part des échecs observés dans la mise en application de nos connaissances sur la symbiose.

II - FACTEURS EXTRINSEQUES AFFECTANT LA SYMBIOSE

Un intérêt majeur pour les récoltes des légumineuses est leur capacité d'utiliser l'azote atmosphérique en relation symbiotique avec la bactérie Rhizobium. Pour compléter ce processus, la légumineuse doit être capable de pousser sur un large éventail de sols et dans des conditions climatiques diverses.

A - FACTEURS INFLUENCANT LA SURVIE ET LA MULTIPLICATION DES RHIZOBIUM

1 - L'acidité

L'effet désastreux du pH acide sur la culture des légumineuses est déjà connu depuis plusieurs années. En effet, l'activité de l'ion H^+ est un facteur majeur pour la survie et la croissance des Rhizobium dans le sol (91, 107). En 1967, CLOONAN et VINCENT (16) montrent que dans un sol basaltique rouge pH 5,2, seuls 4 600 Rhizobium sont retrouvés dans la rhizosphère des jeunes plantes de Dolichos lablab après 13 jours pour un inoculum initial de 140 000 germes par graine.

Plusieurs auteurs (82,88) ont étudié les effets du pH sur le nombre de Rhizobium et ont montré que ce dernier diminue au fur et à mesure que le pH du sol descend.

Les études d'adaptation de Rhizobium trifolii 16 et Rhizobium japonicum 205 faites par MENDEZ CASTRO et Coll. (69) montrent un ralentissement de la croissance chez les souches parentales et chez les souches adaptées lorsque l'acidité du milieu de culture augmente. Ce ralentissement est plus grand pour les souches parentales que pour celles adaptées aux pH acides.

Cependant, la sensibilité à l'acidité des Rhizobium est très variable : R. trifolii pour la culture de trèfle est moins sensible aux conditions acides que R. meliloti du groupe d'inoculation de la luzerne (43).

Cette sensibilité à la survie de R. meliloti est un facteur majeur

contribuant à la croissance de l'alfalfa (variété de luzerne) (88). Des efforts ont été faits dans la recherche de souches de Rhizobium ayant la capacité de survie en nombre important dans des conditions acides (54, 71).

2 - Autres facteurs.

Outre le facteur acidité, d'autres facteurs peuvent affecter plus ou moins la survie et la multiplication de Rhizobium.

Les effets du calcium semblent très difficiles à interpréter. En milieu liquide, le carbonate de calcium d'après NORRIS (79) a pour rôle de tamponner le milieu de culture et de neutraliser les produits acides synthétisés par les Rhizobium. Cet apport n'est indispensable que dans le cas des souches acidifiantes, mais non dans celui des souches alcalinisantes. Les exigences en calcium de Rhizobium sont faibles, comparativement à celles de la plante-hôte.

Les teneurs en calcium supérieures à celles requises pour la croissance, et dans une moindre mesure celles en magnésium favorisent plus, sous certaines conditions, la prolifération des Rhizobium dans la rhizosphère que le développement des nodules ou celui de la plante-hôte (59, 61, 62, 63, 76). L'étude du temps de génération de la souche R. trifolii 8 AL avec ou sans excès de manganèse est indépendante de l'efficacité, mais dépendante de la concentration en manganèse dans le milieu de culture (36).

Des auteurs ont étudié l'effet de certains ions métalliques sur la croissance de Rhizobium, ils ont montré qu'à pH 7, celle-ci diminue pour une concentration à la fois en cuivre et cobalt ou en zinc, plus faible que celle exigée. D'autre part, lorsque le pH diminue à 6,6, le phénomène s'accroît (116). Le même type d'interaction entre le zinc et le manganèse est décrit chez quelques espèces de Rhizobium (117). En cultivant huit souches de R. trifolii sur milieu contenant des concentrations élevées en manganèse, du cuivre et d'autres métaux lourds, SHERWOOD (99) observe des taux de croissance très différents.

Aussi, beaucoup de Rhizobium ont besoin de la biotine et de la thiamine

pour leur croissance (32, 109). Ces vitamines proviennent des exsudats racinaires d'une large variété de légumineuses (94). Autre facteur, la source de carbone influe sur la survie et la croissance de Rhizobium dans la rhizosphère. Les exigences en carbohydrates pour la croissance varient d'un groupe de Rhizobium à un autre (33, 109).

Les carbohydrates ainsi que les acides organiques, les amino-acides sont libérés par les racines et la composition de ces exsudats varie quantitativement et qualitativement (94, 95).

L'influence de la température sur la survie et la croissance de Rhizobium a été étudiée dans différents laboratoires (42, 92, 115). La sensibilité aux températures élevées varie considérablement suivant les espèces et les souches de Rhizobium. BONNIER (7) considère que les températures supérieures à 50°C sont souvent léthales. De plus, le lessivage par les pluies violentes est un facteur à ne pas négliger car il entraîne les Rhizobium en profondeur, loin des graines ou de la rhizosphère. Cet entraînement est d'autant plus important quand les semis ont lieu au début de la saison des pluies, surtout pour les sols peu argileux, donc plus filtrants.

En plus de ces facteurs physico-chimiques du sol s'ajoutent les facteurs biologiques. Le sol renferme de très nombreux micro-organismes qui peuvent avoir des effets inhibiteurs ou stimulateurs sur la croissance et la survie des Rhizobium. La compétition entre les Rhizobium efficients introduits et ceux non efficients autochtones, joue un rôle important. En effet, pour réussir l'inoculation avec les souches efficientes, il est nécessaire, dans certains cas, d'éliminer les souches autochtones peu ou pas efficientes par une stérilisation partielle du sol. De plus, les micro-organismes comme les Actinomycètes synthétisent des antibiotiques qui sont toxiques pour les Rhizobium (97, 111). Les champignons courants comme Aspergillus (89), Fusarium et les bactéries appartenant aux genres Bacillus et Streptomyces sp. peuvent être des antagonistes actifs (97, 114), bien que les Rhizobium diffèrent fortement dans leur sensibilité aux antibiotiques (10, 81).

Enfin, on sait depuis longtemps que les Rhizobium sont plus ou moins sensibles à l'action lytique des bactériophages appelés rhizobiophages (2). Actuellement, les recherches de génétique donnent un intérêt à l'étude de ces derniers pour la classification des Rhizobium (113).

B - FACTEURS AFFECTANT LA NODULATION.

1 - L'acidité.

L'acidité affecte la formation du nodule (le processus de pénétration du Rhizobium dans les tissus racinaires de la légumineuse) et leur nombre. En général, les légumineuses, à l'exception du lupin et des légumineuses tropicales, ne nodulent pas et ne se développent pas en sols acides. La valeur du pH limite pour la nodulation varie avec les espèces de plantes et de souches de Rhizobium utilisées (43, 70, 71).

JENSEN (44) observe que le pH 5,3-5,4 est minimum pour la formation de nodules de l'alfalfa (Medicago spp.) sur milieu gélosé, tandis que le pH critique pour le trèfle (Trifolium spp.) est de 4,2-4,5. De plus, ce même auteur montre que le passage du pH d'un sol de 5,0 à 7,4 augmente la nodulation de M. sativa (45). Ce résultat est confirmé par les travaux de ROBSON et LOWERAGAN (90) sur la culture de Medicago truncatula. MUNNS (76) montre qu'un pH de 4,8 ou plus est exigé pour obtenir la nodulation de l'alfalfa dans une solution nutritive, ainsi qu'une forte inoculation.

Le mécanisme d'inhibition d'un bas pH sur le processus de la nodulation est mal connu. La non-formation de nodules à bas pH est attribuée : soit à la non-survie ou à l'inhibition de la croissance de la bactérie (1, 72, 90) dont l'analyse a été développée auparavant, soit à la difficulté d'absorption du calcium par la plante (59), soit au processus de la nodulation elle-même. En effet, l'apparition de nodules est particulièrement inhibée par un bas pH (72, 76). MUNNS (72) montre que l'acidité réduit le nombre de nodules de M. sativa : au-dessous de pH 5,5 peu de nodules se forment. A pH inférieur à 4,5, la nodulation est totalement inhibée. Dans l'intervalle de pH 4,5-5,5, ni la croissance racinaire, ni le nombre de poils absorbants ne sont affectés. Les Rhizobium inoculés à forte concentration s'accumulent rapidement dans la rhizosphère par un processus indépendant du pH et subissent une faible multiplication. Des résultats comparables sont obtenus pour Pisum sativum (53). Le nombre faible de Rhizobium et l'inhibition de l'initiation du nodule sont probablement responsables de la pauvreté de nodulation au-dessous de pH 6,0 (88). MUNNS (75) attribue cette réduction au-dessous de pH 5,5 à la sensibilité à l'acidité de l'action de la trans-éliminase pectine dans les stades primitifs de l'infection racinaire par le Rhizobium. Enfin, les propriétés d'agglutination des lectines sont différemment affectées par le

bas pH (48). En effet, une fois que la courbure des poils absorbants est achevée, la fixation polaire de Rhizobium spécifiques : R. japonicum (85), R. leguminosarum (15), R. meliloti (20), R. trifolii (66), à la paroi du poil absorbant de la plante-hôte se fait avec les lectines, qui sont des protéines végétales spécifiques aux propriétés antigéniques. Cette sensibilité au pH renforce le concept de fixation par lectine.

2 - Autres facteurs.

Le rôle favorable du calcium sur la nodulation du trèfle et de l'alfalfa a été démontré sans équivoque par plusieurs auteurs (59, 76, 87, 88, 90) en milieu acide. L'augmentation de l'acidité élève la concentration en calcium exigée pour favoriser la formation adéquate de nodules. Ainsi, le chaulage des sols acides pour la production de légumineuses augmente le rendement, en améliorant la survie et la croissance du Rhizobium et en favorisant la formation de nodules par la chute de l'activité de l'ion hydrogène et l'apport du calcium. Les besoins en calcium de la nodulation sont nettement plus élevés que ceux de Rhizobium lui-même ou de la plante, et varient suivant les espèces de légumineuses considérées. MUNNS (71) en travaillant avec l'alfalfa (M. sativa L.) et le trèfle (Trifolium subterraneum L.) dans plusieurs sols acides (pH 5,0 - 6,0) montre que la meilleure réponse de l'alfalfa par chaulage peut être attribuée à une meilleure nodulation. Le trèfle n'est pas affecté par l'acidité du sol dans la gamme de pH étudiée. Une fois initié, le nodule peut se développer à des concentrations même plus faibles que celles exigées pour la croissance des plantes-hôtes.

LONERAGAN (58) montre que le calcium modifie la faculté d'absorption de Rhizobium par les racines de légumineuses. Toutes les lectines étudiées ont leurs exigences en calcium et en magnésium. Leur pleine activité d'agglutination est seulement réalisée quand elles sont liées à leurs propres ions métalliques (55).

Des travaux (6, 104) montrent que l'augmentation des teneurs salines diminue la nodulation du soja et de l'alfalfa. En effet, une relation existe entre la concentration saline, le complexe calcium, pH et quantité de Rhizobium présents dans les sols acides. ROBSON et LONERAGAN (90) montrent qu'à faible concentration de phosphate, de l'ordre de 128 mg par pot de terre (un pot contient 3000 grammes de terre) et en l'absence de carbonate de calcium, aucune plante (M. truncatula) ne nodule, pour un inoculum de 10^5 Rhizobium par graine ou moins et seulement la moitié des plantules de luzerne nodule

pour 10^7 Rhizobium par graine. De plus, à cette concentration de CaCO_3 , une diminution de l'inoculum diminue le pourcentage des plantes nodulées. La concentration de 2,7 grammes de CaCO_3 par pot permet d'avoir un maximum de plantes nodulées. Une forte concentration de phosphate, CaCO_3 et d'inoculum affecte la nodulation de la même manière qu'à faible concentration. Enfin, l'application de fortes concentrations en phosphate diminue le pourcentage des plantes nodulées, particulièrement à faible teneur de CaCO_3 .

Les concentrations toxiques de manganèse dans les sols acides sont plus étudiées pour leurs effets sur l'association Rhizobium-Légumineuse. Il a été montré qu'avec le trèfle (112), le soja (23) et la luzerne (23), l'augmentation des concentrations de manganèse (Mn) réduit le nombre de nodules. LOWE et HOLDING (60) montrent que Mn retarde l'apparition de nodules.

La présence de faibles quantités d'azote minéral est, en général, favorable ; des doses plus élevées, notamment s'il s'agit d'azote nitrique, exercent une action inhibitrice très nette sur la nodulation (107). L'inhibition par les doses élevées de nitrate a été expliquée, soit par la destruction catalytique de l'acide 3-indolyl acétique (IAA), contrôlant l'infection des poils absorbants (74, 106), soit par une modification du rapport de carbone et azote interne de la plante. En effet, dans cette dernière hypothèse, une réduction de l'inhibition, observée à la suite de l'augmentation de la teneur de la plante en hydrates de carbone obtenue soit par activation de la photosynthèse, soit par adjonction d'hydrate de carbone exogène, en est la preuve (101). La stimulation ou l'inhibition de la nodulation (84) par les doses faibles de nitrate dépend du matériel et des méthodes utilisées. MUNNS (73) montre que le maintien de nitrate aux concentrations 0,2 ou 0,5 mM réduit fortement le nombre des nodules de M. sativa dans la première récolte, mais légèrement ou pas dans toutes les autres récoltes.

La température, la lumière et l'humidité jouent un rôle important dans la nodulation (24). En effet, la température optimale de la nodulation est souvent inférieure à celle de croissance de la plante-hôte. De plus, un déficit hydrique ralentit la nodulation, ainsi que l'excès d'humidité.

De plus, les effets de l'acidité du sol sur la nodulation peuvent être compliqués par la présence d'une large population non infectieuse ou efficiente

de Rhizobium qui sont en compétition avec le Rhizobium inoculé (36).

Enfin, une augmentation du nombre de Rhizobium inoculé par graine élève le pourcentage des plantes nodulées pour M. sativa (71) et M. truncatula (90) poussant dans les sols acides.

C - FACTEURS INFLUENCANT LA FIXATION DE L'AZOTE

1 - L'acidité

Lorsque la plante est nodulée, la fixation d'azote elle-même est peu sensible au pH, car elle renferme un système efficace de régulation interne du pH (72, 101). En effet, l'acidité du sol affecte la fixation de l'azote par l'intermédiaire de la sensibilité de Rhizobium et du processus de la nodulation. Les résultats de RICE et Coll. (88) montrent que la fixation de l'azote par l'alfalfa est fortement affectée par les pH du sol inférieurs à 6,0. Cette fixation nettement réduite montrée par une réduction des rendements relatifs aux champs est attribuée à la pauvreté de la nodulation. D'après BURTON (12), il est possible que l'acidité du sol ait un effet défavorable sur la capacité de fixation de l'azote.

Des auteurs (86) montrent qu'en général, les valeurs de pH du sol comprises entre 6,5 et 7,5 sont considérées comme idéales pour la production maximale de l'alfalfa. SCHREVEN (98) observe que le nombre de nodules et l'efficacité de plusieurs souches dans la fixation de l'azote semblent être affectés quand les cultures sont maintenues de longues périodes à bas pH avant leur application aux racines des plantes-hôtes.

Ainsi, il est très difficile de déceler le rôle direct exact de l'acidité sur la fixation de l'azote, car, bien souvent l'acidité intervient indirectement par exemple en induisant une toxicité aluminique ou manganique, ou une carence en éléments indispensables tels que le molybdène.

2 - Autres facteurs

L'apport correct en calcium et en phosphore rend possible la fixation d'azote du trèfle aussi bien dans un sol à pH 5,0 que dans ceux dont le pH a été élevé à 7,0 - 7,5 par chaulage. Il est très difficile de déceler le rôle direct exact du calcium sur la fixation d'azote dans le nodule, car il agit non seulement sur la symbiose elle-même, mais sur la plante. Son effet est en outre compliqué par l'existence d'interactions complexes avec d'autres éléments. Plusieurs auteurs montrent que les réponses de l'alfalfa (39, 40,

64, 68, 87, 88) et du trèfle (4) par chaulage sont liées aux quantités utilisables par la plante en aluminium et en manganèse solubles dans les sols acides. Ces résultats soulignent l'importance du chaulage pour abaisser fortement la teneur en aluminium et en manganèse solubles toxiques en sol acide pour la culture de la luzerne et du trèfle. Les teneurs en manganèse présentes dans le sol acide étudié dans les travaux de RICE (87) ne sont pas considérées toxiques pour l'alfalfa(3). Les exigences des Légumineuses en phosphore sont relativement élevées. Sa carence provoque un effet défavorable pour la fixation d'azote comme pour la nodulation. ROBSON et LONERAGAN (90) montrent que l'apport du carbonate de calcium décroît fortement la croissance de la plante à une faible teneur en phosphate et affecte légèrement la croissance à haute concentration. En effet, à faible concentration de phosphate, de l'ordre de 128 mg par pot (un pot contient 3 kilogrammes de terre), le carbonate de calcium paraît induire la déficience en phosphore. A hautes teneurs en phosphate, le carbonate de calcium augmente probablement la croissance en élevant l'apport de l'azote par l'intermédiaire de l'amélioration de la nodulation. De plus, les effets des concentrations en calcium et en phosphore dans le substrat ont été étudiés (105). Les résultats montrent qu'en solution, l'apport d'une forte quantité de calcium diminue la toxicité du manganèse en réduisant l'absorption de ce dernier par la plante, tandis que l'application forte de phosphore intensifie la toxicité en augmentant la fixation. Dans le sol, la toxicité du manganèse peut être inhibée par des faibles applications de carbonate de calcium en réduisant la teneur en manganèse échangeable. L'apport d'une forte concentration de $\text{Ca} (\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ aggrave la toxicité en augmentant la fraction du manganèse échangeable du sol. La toxicité du manganèse, causée par l'apport du manganèse ou bien induite par une forte application de phosphore, peut être surmontée par une large application de calcium dans la solution de culture et en chaulant le sol.

Outre ces facteurs stimulants ou inhibiteurs de la fixation d'azote, d'autres éléments peuvent agir. Le soufre n'intervient pas dans la fixation elle-même, mais dans la synthèse des protéines à partir de l'azote fixé ou bien de l'azote combiné absorbé par les racines. Le cobalt, indispensable à la croissance des plantes et au développement du Rhizobium est plus important pour la fixation symbiotique. En effet, l'intensité de la fixation est fonction de la teneur en vitamines B_{12} et en leghémoglobine; pigment dont la synthèse exige du cobalt. De plus, l'azote combiné réduit la fixation

symbiotique d'azote, mais ne l'inhibe jamais complètement (83).

Enfin, la température et l'humidité affectent fortement la symbiose Rhizobium-Légumineuse (92). La température optimale pour la formation de nodules est semblable habituellement à celle de leur développement et par conséquent, à celle de la fixation de l'azote, qui sont inhibées par la chaleur et le froid (30). La température optimale de la fixation d'azote se situe souvent autour de 24°C. Il en résulte que les plantes qui reçoivent des doses élevées d'azote combiné sont moins affectées par des températures élevées ou basses, que les plantes dont le ravitaillement en azote dépend uniquement de la fixation symbiotique. L'humidité agit sur la fixation en même temps que sur la plante elle-même.

III - CONCLUSION

La symbiose Rhizobium-légumineuse dans les sols acides dépend de plusieurs facteurs, entre autres les facteurs extrinsèques qui agissent entre la plante-hôte et le Rhizobium. Outre les qualités nécessaires que doit avoir la plante-hôte pour cette fixation symbiotique et qui ne sont pas de notre compétence, la sélection des souches de Rhizobium est nécessaire dans une telle condition. La souche sélectionnée doit avoir une résistance aux facteurs chimiques (acidité, substances toxiques, produits fongicides), physiques (température élevée, dessication) ou biologiques (phages) existant dans les sols acides. Elle doit être infective, efficiente, stable au point de vue génétique, avoir une compétitivité meilleure par rapport aux Rhizobium autochtones et doit persister dans les sols acides.

Nos travaux personnels nous ont amenés :

1 - A isoler par mutagenèses un mutant ayant une meilleure tolérance aux pH acides.

2 - A étudier la fixation symbiotique de cette souche mutante de Rhizobium comparée à la souche sauvage et à une souche standard sur des milieux acides et des terres de Bretagne.

3 - Enfin, à effectuer une étude physiologique comparative des deux souches de Rhizobium sauvage et mutante.

Etant donné l'aspect très différent de ces trois points, nous avons exposé les matériels et méthodes, avant les résultats de chaque chapitre.

Chapitre 1

OBTENTION DES MUTANTS

MATERIEL ET METHODES

I - SOUCHES BACTERIENNE

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé deux souches sauvages de Rhizobium meliloti : M₉S (isolée au laboratoire) et 1-5, aimablement fournie par le Professeur BONNIER.

Les deux souches sont efficaces sur plantules aseptiques de luzerne (Medicago sativa). Ces souches sont conservées à la température de - 20°C, en suspension dans le milieu RC fructosé à 1 % additionné de glycérol à 20 % (ce dernier étant stérilisé 30 minutes à 105°C).

La souche 1-5 a été utilisée pour la comparer à la souche sauvage M₉S et à ses mutants après mutagenèse. De plus, elle est employée très fréquemment dans le monde entier pour sa capacité à résister à des valeurs très différentes de pH du sol et de sa faculté d'adaptation à différents types de sols.

II - MILIEUX DE CULTURE.

L'étude de la croissance de ces souches de R. meliloti a été réalisée dans le milieu riche (milieu complet RC). Nous avons utilisé le milieu minimum R pour faire la dilution.

A - Milieu complet : RC

Les bactéries sont inoculées dans le milieu RC de LAIRD (52) modifié par DELATTRE (21) :

K₂HPO₄ 1,0 g
MgSO₄, 7 H₂O 0,2 g
Extrait de levure (Difco) 1,0 g
Eau distillée q.s.p. 1 litre
pH 7,2 à 7,5.

Le pH est ajusté avec l'acide orthophosphorique (H_3PO_4) ou une solution de potasse (KOH).

Dans le cas du milieu solide correspondant (RCG) on ajoute 12 g par litre d'Agar Biomar ou Difco. Il est utilisé pour la numération et l'isolement des bactéries.

La stérilisation se fait à 120°C pendant 20 minutes. La source de carbone (fructose ou glucose) préparée séparément, est autoclavée à 105°C pendant 30 minutes et ensuite additionnée au milieu, à la concentration finale de 1 % avant l'utilisation.

B - Milieu minimum : R

K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4, 7 H_2O$	0,2 g
NH_4NO_3	0,5 g
Eau distillée.....	q.s.p. 1 litre
pH 7,2	

La stérilisation se fait à 120°C pendant 20 minutes.

Le milieu minimum R est utilisé comme milieu de dilution et aussi comme milieu de croissance, auquel le fructose est ajouté à la concentration finale de 1 %.

L'acide orthophosphorique (H_3PO_4) est utilisé pour ajuster à différents pH acides.

C - Gélose blanche

Elle est utilisée pour les numérations :

Agar Difco.....	7,5 g
Eau distillée.....	q.s.p. 1 litre

On répartit 4 ml par tube.

La stérilisation se fait à 120° C pendant 20 minutes.

III - TECHNIQUES DE NUMERATION.

A - Numération des cellules viables

Cette technique est basée sur l'utilisation de la double couche. Elle permet de connaître le nombre des cellules viables par ml d'une culture de Rhizobium ou d'une suspension cellulaire ayant ou non subi une mutagenèse.

Des prélèvements de la culture de Rhizobium pendant la croissance ou des parties aliquotes d'avant et d'après mutagenèse sont dilués dans le milieu de dilution R jusqu'à 10^{-6} . Dans un tube renfermant 4 ml de la gélose blanche en suspension (44°C), on ajoute 0,1 ml de la dilution de culture ou 0,1 ml d'aliquot de la mutagenèse.

Le tout est ensuite versé sur une couche de milieu RCG, contenant 1 % de fructose et dans certains cas de la dihydrostreptomycine (S.P.E.C.I.A.) à concentration finale de 400 µg/ml. L'incubation est réalisée à 30° C pendant 3 jours au minimum.

B - Densité optique

Pour suivre la croissance bactérienne, nous avons inoculé une partie aliquote d'une préculture de 24 ou 48 heures, suivant les souches, préalablement centrifugée, lavée dans le milieu R et reprise dans le milieu de culture.

La croissance est suivie par mesure de la densité optique à 600 nm, sous épaisseur d'un cm, au spectrophotomètre ZEISS type P.M.Q. II.

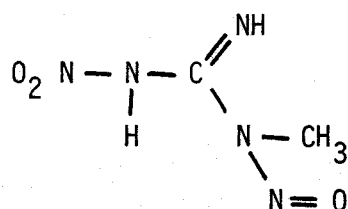
IV - LA MUTAGENESE.

La mutagenèse est un phénomène permettant d'avoir des mutants possédant des caractères différents de ceux de la souche mère.

Ces mutants, en plus de leur intérêt dans l'étude de la génétique du genre Rhizobium, peuvent être testés pour leurs propriétés symbiotiques et notamment, pour leur efficacité : qualité de l'association Rhizobium-légumineuse, aboutissant à la fixation d'azote atmosphérique.

Ainsi, nous avons effectué des mutagenèses à partir des souches de R. meliloti M₀S et 1-5, dans le but de les rendre plus résistantes au facteur acidité du milieu naturel.

Pour notre travail, nous avons utilisé la N-méthyl-N'-nitro-N-nitroso-soguanidine (NTG) comme agent mutagène, de formule chimique :



A - Mode d'action de la N-méthyl-N' nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)

Découverte par MANDELL et GREENBERG (65), son mode d'action moléculaire n'est pas encore bien connu, car il est difficile de distinguer l'effet mutagène de la NTG, de celui de ses produits de dégradation.

- Elle se décompose en acide nitreux et en N-méthyl-N' nitrosoguanidine à un pH inférieur à 5.

- A un pH supérieur à 5,5, elle est sous forme de diazométhane et nitro-urée.

Pour certains auteurs (14), le diazométhane est le principal agent de la mutagenèse, mais la NTG possède également une activité mutagène propre.

Par contre, l'acide nitreux attaque les bases possédant un groupement aminé et effectue une désamination oxydative. Ainsi, l'adénine est transformée en hypoxanthine et la cytosine en uracile. On assiste à une substitution A-T → G-C et inversement.

Le diazométhane est un agent qui peut réagir avec les acides nucléiques et leurs constituants. Son action sur le DNA s'exerce en méthylant les bases à différentes positions.

B - Conditions optimales de la mutagenèse par NTG

Des travaux antérieurs réalisés dans le laboratoire par NIEL (77) ont montré que le meilleur résultat était obtenu à la concentration finale de 750 µg/ml en NTG dans le tampon Tris-acide maléique pH 6,65.

C - Mode opératoire

Nous effectuons une culture de la souche R. meliloti sur milieu fructose de pH voisin de la neutralité. Lorsque celle-ci atteint une densité optique de l'ordre de 0,80 (soit $8 \cdot 10^8$ cellules par ml environ), nous en centrifugeons 10 ml. Le culot est repris dans 10 ml de milieu R et centrifugé une deuxième fois pour être repris dans 10 ml de tampon Tris-maléique pH 6,65.

Dans un pot à centrifugation stérile, on ajoute 15 mg de l'agent mutagène NTG, 10 ml de tampon Tris-maléique.

Ce tampon est composé :

- 9 ml de Tris (hydroxyméthyl amino-méthane) M
- 5 ml d'acide maléique M,
- on complète à 100 ml avec de l'eau bidistillée stérile.

Après avoir dissous la NTG en agitation à 30°C, on ajoute la culture bactérienne préalablement centrifugée, lavée et reprise dans le tampon Tris-maléique.

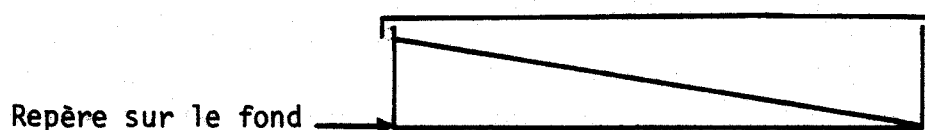
On laisse agir l'agent mutagène pendant 30 minutes, à 30°C en agitation. Les cellules sont ensuite lavées par centrifugation et remises en suspension dans du milieu R pour être numérées, afin de déterminer le taux de survivants et l'efficacité de la mutagenèse par comparaison avec les numérations avant l'action de la NTG.

Nous avons défini :

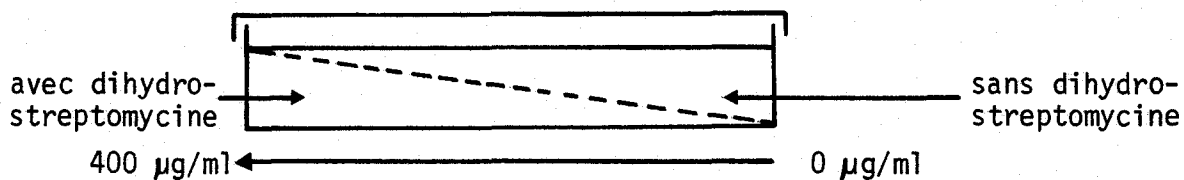
- a) Pourcentage de survivants = $\frac{\text{Nombre de cellules après mutagenèse}}{\text{Nombre de cellules avant mutagenèse}} \times 100$
- b) Fréquence des mutants spontanés = $\frac{\text{Nombre de cellules sans NTG à pH acide}}{\text{Nombre de cellules sans NTG à pH 7,2}}$
- c) Fréquence des mutants après mutagenèse = $\frac{\text{Nombre de cellules après NTG à pH acide}}{\text{Nombre de cellules après NTG à pH 7,2}}$
- d) Efficacité de la mutagenèse = $\frac{\text{Fréquence des mutants après mutagenèse}}{\text{Fréquence des mutants spontanés}}$

V - TECHNIQUE D'OBTENTION DU MUTANT RESISTANT A LA DIHYDROSTREPTOMYCINE.

1 - A 10 ml de milieu complet RCG fructosé, préalablement fondu et maintenu à 60°C, la dihydrostreptomycine est ajoutée à raison de 400 µg/ml. On coule dans une boîte de Pétri inclinée, afin d'obtenir après solidification, la figure suivante :



2 - Au moyen d'une pipette, on coule 10 ml de RCG fructosé sans dihydrostreptomycine ; on obtient ainsi un gradient de concentration allant de 0 à 400 $\mu\text{g/ml}$.



3 - Lorsque les quelques colonies résistantes se sont développées, on détermine approximativement la concentration à laquelle elles sont résistantes, et ceci suivant leur position.

4 - La concentration maximale en dihydrostreptomycine à laquelle chaque mutant est résistant se trouve ainsi déterminée et doit être confirmée en milieu liquide.

RESULTATS ET DISCUSSION

I - ETUDE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE

Nous avons réalisé une préculture de la souche R. meliloti M₉S ou 1-5 sur milieu RC glucosé ou fructosé 1 %, de pH 7,2. A une densité optique de 0,80 environ, les cellules sont centrifugées à 4 500 g, lavées dans le milieu R, centrifugées une deuxième fois et reprises suivant les études que l'on fait dans 100 ml du milieu RC glucosé ou fructosé 1 % à différents pH.

Les cultures sont faites à la température de 30°C et en agitation rotative constante, permettant d'obtenir une oxygénation convenable du milieu.

L'inoculum de départ correspond environ à 5.10^7 cellules par ml.

La croissance a été contrôlée par mesure régulière de la densité optique à 600 nm, par l'évolution du pH et par le nombre des cellules viables dans chaque milieu de culture dans certains cas.

A - LA SOUCHE RHIZOBIUM MELILOTI M₉S

1 - Evolution de la croissance en fonction du pH sur milieu glucosé

a - Croissance

La figure 1 montre trois groupes de courbes de croissance :

- pour les pH 7,6 et 6,65, la croissance est sensiblement identique ; la phase de latence est très brève ;
- pour les pH entre 6,15 et 5,35, la croissance est nettement ralentie ; de plus, la phase de latence est allongée pour les pH 5,65 et 5,35 ;
- à pH 4,4, malgré l'inoculum de départ important et la composition du milieu, il n'y a plus de croissance ; les cellules meurent ; le milieu de culture devient clair ; l'observation au microscope optique nous montre une lyse bactérienne.

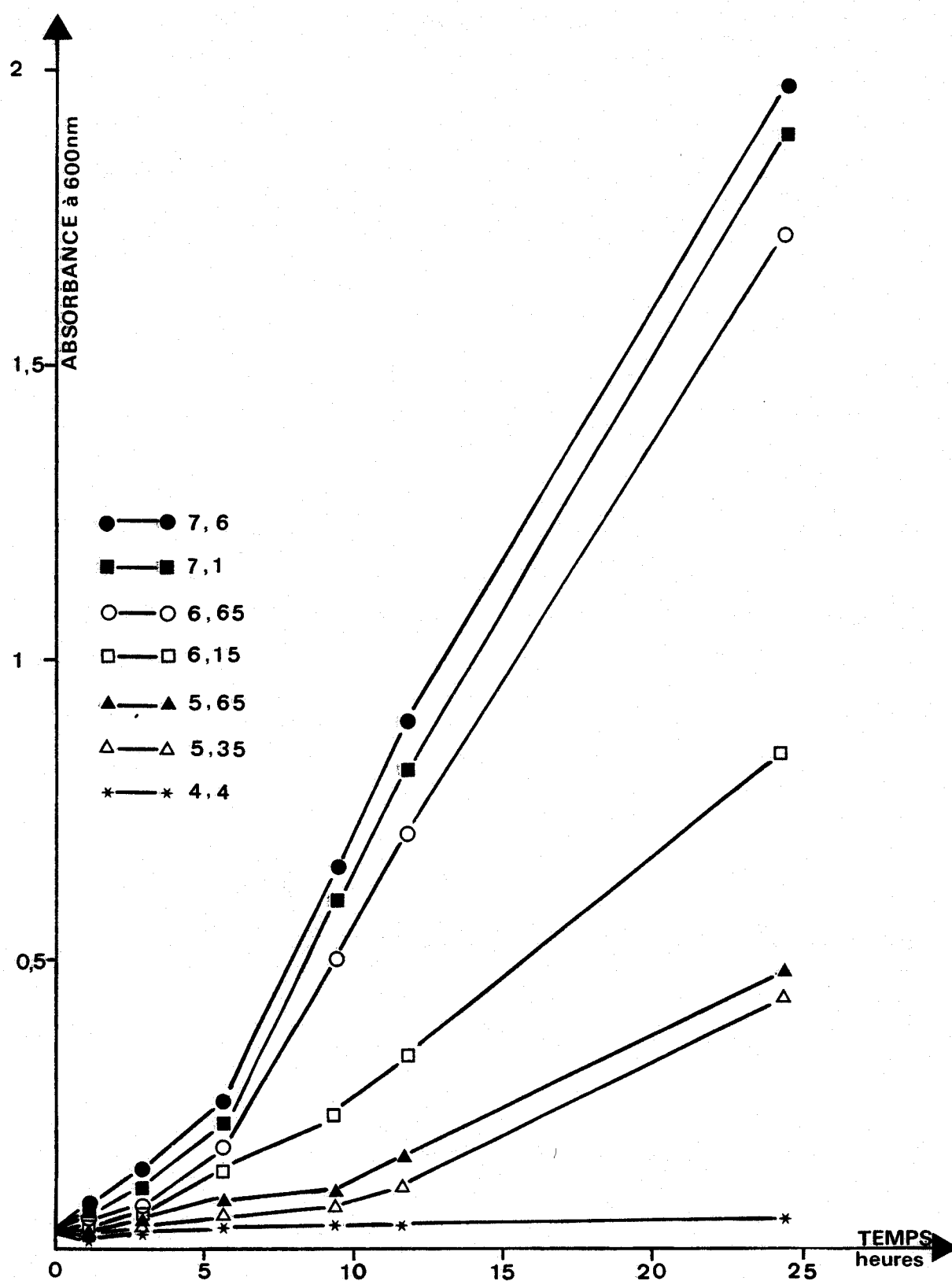


Fig. 1 : Croissance de *Rhizobium meliloti* M₉S sur RC glucosé à 1 % à différents pH.

b - Evolution du pH lors de la croissance

En suivant l'évolution du pH lors des cultures de la souche M₉S, nous nous apercevons que dans tous les cas, l'utilisation du glucose comme substrat carboné s'accompagne d'une forte baisse du pH (tableau 2). Le pH de chaque culture est compris entre 4 et 5. Cette zone de pH pourrait être néfaste pour toutes activités enzymatiques de la bactérie.

Temps en h.								
pH init. du mi- lieu de culture	7,6	7,1	6,65	6,15	5,65	5,35	4,4	
24	6,7	6,6	6,1	4,8	4,6	4,5	4,4	
72	4,9	5	5	4,8	4,3	4,15	4,3	

Tableau 2 : Evolution du pH des cultures de Rhizobium meliloti M₉S sur RC glucosé 1 % (à différents pH initiaux).

c - Numération des cellules viables

La détermination du nombre de cellules viables après 72 heures (tableau 3) sur milieu RC glucosé 1 % à différents pH nous confirme le résultat de la figure 1.

pH initial du milieu de culture	7,6	7,1	6,65	6,15	5,65	5,35	4,4
Nombre de cellules viables au temps T = 0 (bactéries par ml)	$6,4 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^7$
Nombre de cellules viables au temps T = 72 heures (bactéries par ml)	$2 \cdot 10^9$	$2,3 \cdot 10^9$	$2,2 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^5$

Tableau 3 : Numération de cellules viables de Rhizobium meliloti M₉S après 72 heures de culture sur milieu RC glucosé 1 % à différents pH.

- de pH 7,6 à pH 6,15, nous trouvons un nombre à peu près constant de cellules ; nous notons une bonne croissance bactérienne pour un même inoculum de départ ;
- aux pH 5,65 et 5,35, nous constatons un ralentissement de la croissance ;
- à pH 4,4, nous n'avons pas de croissance, mais une lyse bactérienne.

d - Discussion

Dans cette étude, le travail sur milieu glucosé montre que la souche M₉S se développe mal à bas pH. Cependant, on sait que la plupart des Rhizobium meliloti dont M₉S, acidifient le milieu glucosé et il se pourrait que cet abaissement supplémentaire de pH soit particulièrement défavorable.

En effet, HORNEZ a montré que cette chute de pH est due à la libération dans le milieu de culture d'acide 2-céto-gluconique (38) dont la quantité accumulée varie en fonction de la concentration en glucose dans le milieu d'incubation (37).

Des travaux antérieurs (36) chez Rhizobium trifolii : groupe capable d'infecter le trèfle, ont montré la production de pyruvate, d'acétate, propionate, isobutyrate et butyrate dans le milieu après 21 jours de culture.

DUDMAN et HEIDELBERGER (25) montrent que les ions pyruvate sont des constituants importants des polysaccharides de Rhizobium et il est possible que la sécrétion de pyruvate soit associée avec la symbiose.

La production de pyruvate et de butyrate (110) par Rhizobium avait été établie quoiqu'une attention n'est faite pour relier ces résultats à l'efficacité symbiotique.

KATZNELSON (47) signale la production par Rhizobium leguminosarum, Rhizobium meliloti, Rhizobium phaseoli et Rhizobium trifolii de pyruvate et de trioses phosphates à partir de glucose-6-phosphate et de gluconate-6-phosphate en présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate (NADP⁺).

Ainsi, le glucose est dégradé rapidement par les cellules. Ceci provoque une baisse de pH importante amenant à une acidification du milieu extracellulaire qui peut être incompatible avec la survie des Rhizobium, la symbiose et les plantes.

2 - Evolution de la croissance en fonction du pH sur milieu fructosé.

a - Croissance

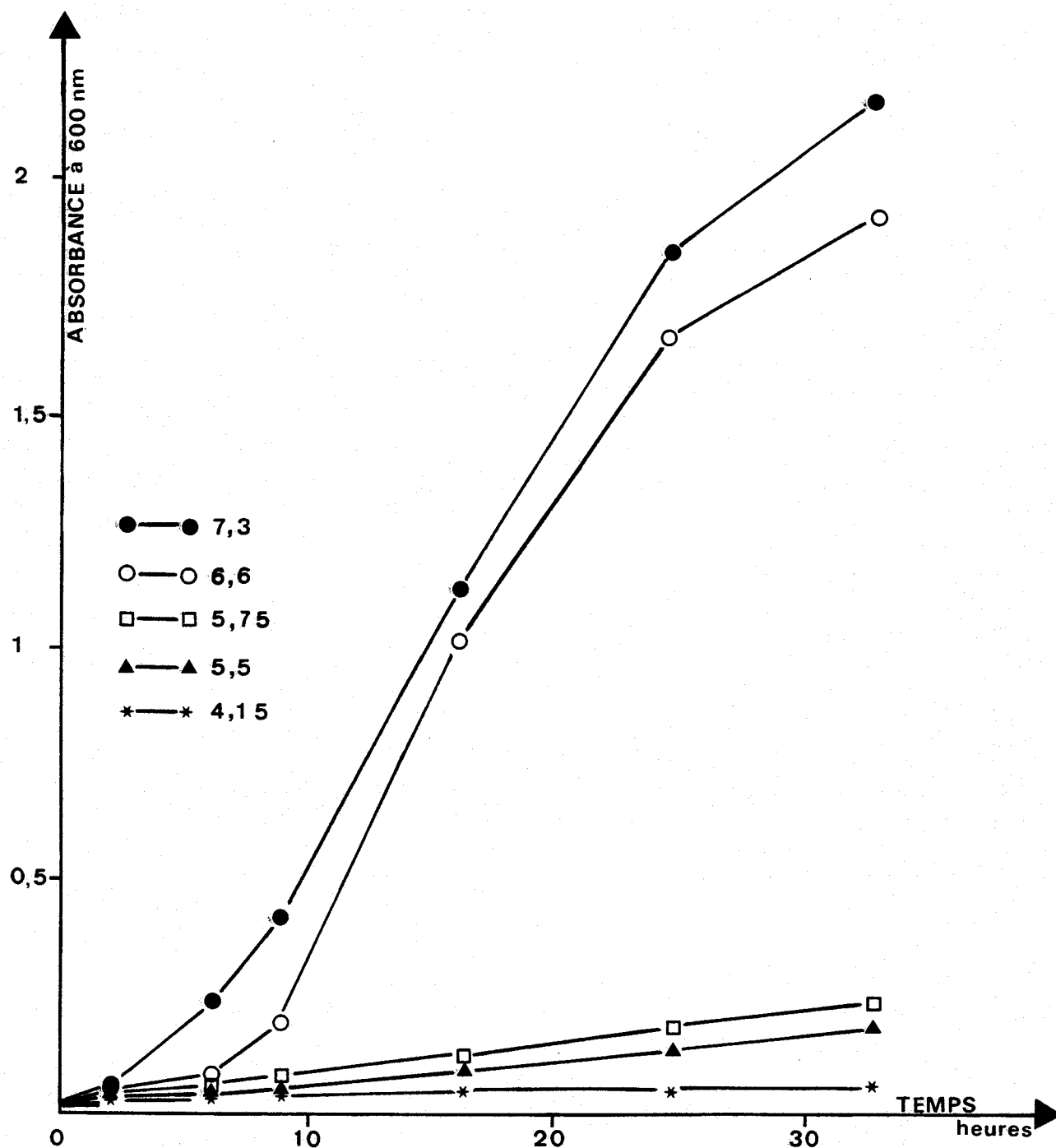


Fig. 2 : Croissance de *Rhizobium meliloti* M₉S sur RC fructosé 1 % à différents pH initiaux.

- malgré une légère différence, on peut considérer que la croissance est pratiquement identique sur le substrat carboné (fructose 1 %) pour les pH compris entre 7,3 et 6,6 ; en effet, pour un inoculum de départ correspondant à une densité optique de 0,01, on observe un temps de latence très court, de l'ordre de 1 à 3 heures ;

- aux pH acides 5,75 et 5,5, nous observons un très net ralentissement de la croissance avec un temps de latence très long ;

- à pH 4,1 aucune croissance n'a été observée ; il est probable que la concentration en ions H^+ empêche le développement de la bactérie (fig. 2).

b - Evolution du pH lors de la croissance

	pH initial du milieu de culture	7,3	6,6	5,75	5,5	4,15
Temps en heures						
8,75	7,3	6,65	5,7	5,5	4,15	
25,75	7,15	6,6	5,6	5,4	4,2	
34	7,25	6,5	5,5	5,45	4,15	

Tableau 4 : Evolution du pH lors des cultures de Rhizobium meliloti M₉S sur RC fructosé 1 % à différents pH.

Le tableau 4 montre que l'utilisation du fructose comme substrat carboné s'accompagne d'un maintien des pH aux environs de leurs valeurs initiales.

B - LA SOUCHE RHIZOBIUM MELILOTI 1-5^{Str} (mutant résistant à la dihydrostreptomycine)

1 - Evolution de la croissance en fonction du pH sur milieu glucosé.

a - Croissance

- La figure 3 nous montre le même phénomène observé auparavant, à savoir un meilleur développement aux pH compris entre 7,5 et 6,45.

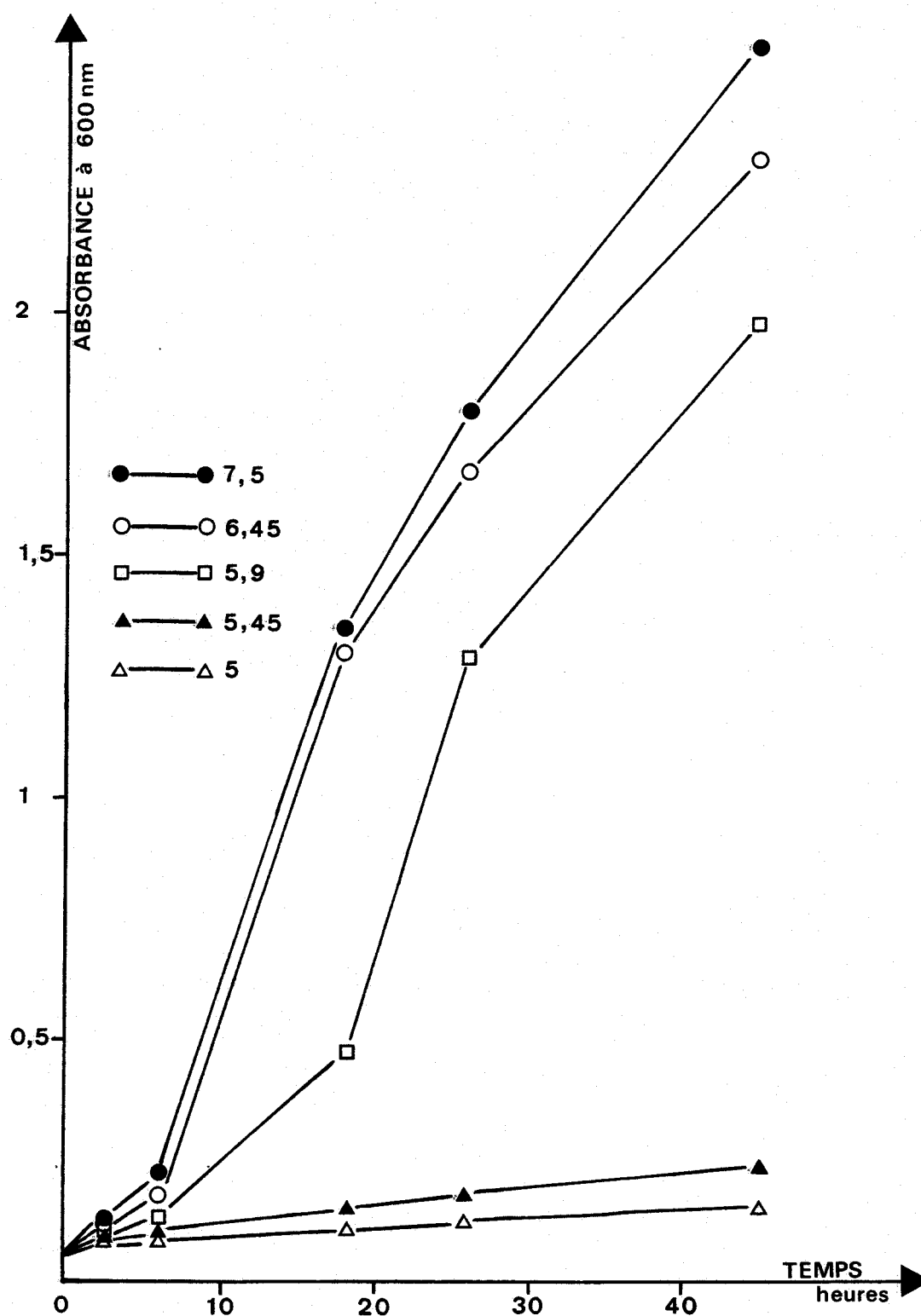


Fig. 3 : Croissance de Rhizobium meliloti 1-5^{Str} sur RC glucosé 1 % contenant 400 µg/ml de dihydrostreptomycine.



- A pH 5,9, l'acidité du milieu affecte la croissance de la bactérie par un ralentissement d'expression des gènes qui codent pour les enzymes du métabolisme de la croissance.

- Nous notons une légère croissance bactérienne à pH 5,45. Par contre, à pH 5, il n'y a plus de développement, les cellules sont lysées. En effet, la forte teneur en ions H^+ inhibe et même détruit toute l'activité bactérienne.

b - Evolution du pH lors de la croissance

Temps en heures	pH initial du milieu de cult.	5	5,45	5,9	6,45	7,5
6		4,9	5,45	5,85	6,35	7,55
17		5	5,45	5,75	6,25	7,25
24,5		5	5,4	5,6	6,3	7,25
67		4,95	5,4	5,3	6,35	7,2
90		4,95	5,3	5,1	6,2	7,1

Tableau 5 : Evolution du pH lors des cultures de Rhizobium meliloti 1-5^{Str} sur RC glucosé 1 % contenant 400 µg/ml de dihydrostreptomycine.

Malgré l'emploi du substrat carboné glucose, nous assistons avec la souche 1-5^{Str} à une très légère acidification du milieu de culture au cours de la croissance, quel que soit le pH initial du milieu.

Une expérience a été faite avec la souche 1-5 non mutée, sur le milieu RC glucosé sans dihydrostreptomycine, et a confirmé ce résultat.

Ainsi, la souche R. meliloti 1-5, par son catabolisme, libère très peu de produits acides. Ce comportement est très différent de celui de la souche

R. meliloti M₉ S qui libère des produits acides lors de sa croissance sur milieu ayant le glucose comme substrat carboné.

2 - Evolution de la croissance en fonction du pH sur milieu fructosé.

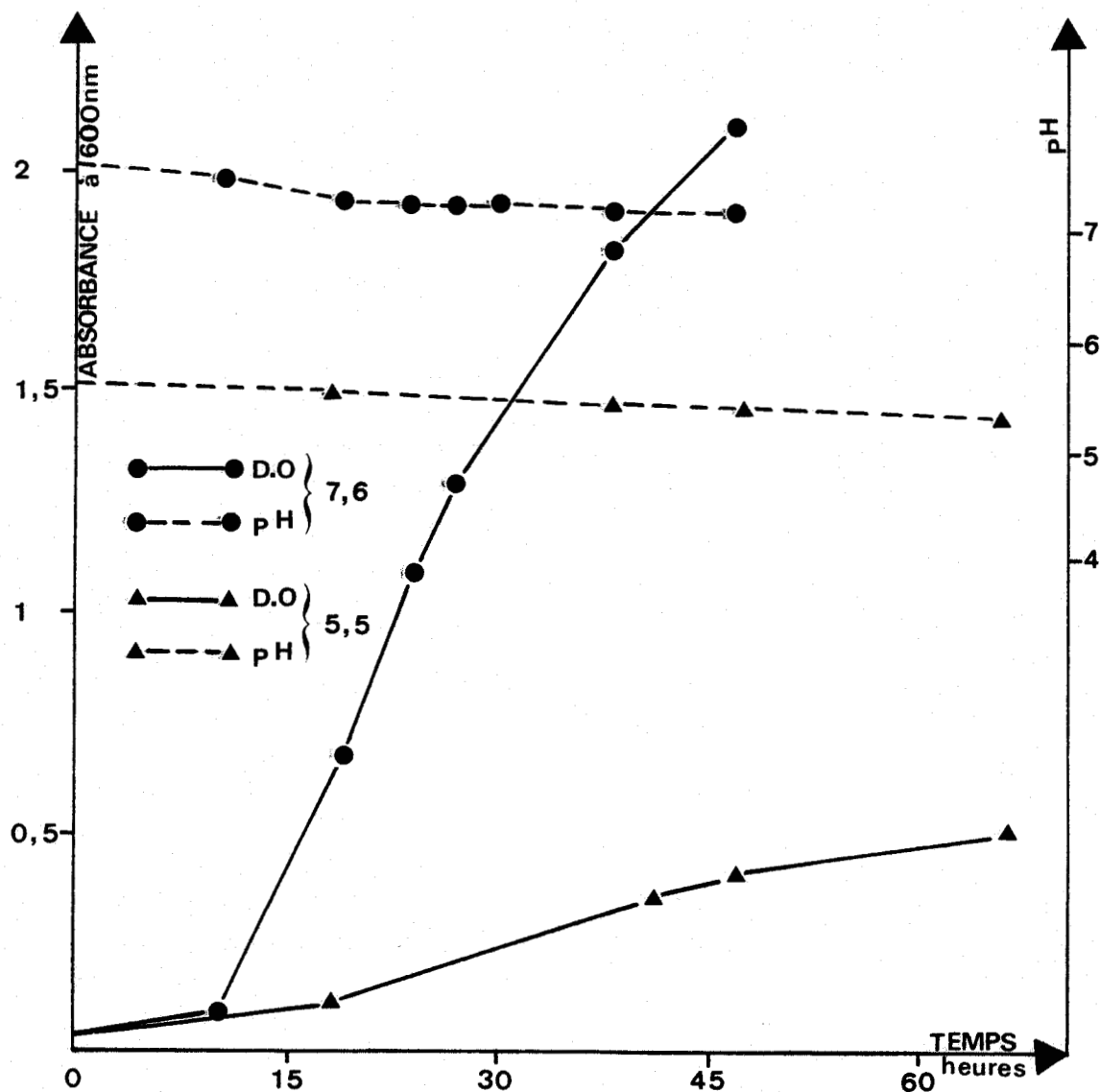


Fig. 4 : Evolution de la croissance et du pH lors des cultures de souche de Rhizobium meliloti 1-5^{Str} sur milieu RC fructose 1 %, contenant 400 µg/ml de dihydrostreptomycine.

L'utilisation de fructose s'accompagne d'une variation négligeable du pH pour la souche 1-5^{Str}, quel que soit le pH initial du milieu de culture. Ce phénomène a été déjà mis en évidence pour la souche M₉S.

C - DISCUSSION

Il apparaît donc à la suite de ces études de la croissance sur ces deux substrats carbonés : fructose et glucose, que :

1 - La croissance des deux souches Rhizobium meliloti M₉S et 1-5^{Str} sur milieu RC fructosé, quels que soient les pH du départ, ne s'accompagne pas d'acidification. En effet, des travaux antérieurs dans le laboratoire (37) montrent qu'une partie de ce substrat est dégradée en dioxyde de carbone et en eau, le reste étant dirigé vers des voies de biosynthèse. En fin de culture, on observe un développement bactérien et une viscosité importants pour les pH voisins de la neutralité.

2 - Dans le cas du glucose comme substrat carboné, pour la même concentration, nous constatons une très nette acidification du milieu lors de la croissance de la souche R. meliloti M₉S due à une libération des composés acides. Par contre, avec la souche 1-5^{Str}, cette baisse de pH se fait très lentement au cours du temps.

3 - De plus, nous avons constaté que la vitesse de croissance est légèrement plus rapide en présence de glucose qu'en présence de fructose. Cette différence peut être due à des inoculum ne comportant pas un nombre initial identique de cellules.

Afin d'éviter toute variation du pH de nos milieux due au catabolisme de culture, il nous a paru intéressant dans la suite de nos travaux, de travailler avec le fructose comme substrat carboné, de façon à supprimer la formation des produits acides amenant un abaissement brutal du pH préjudiciable à la croissance et à la mutagenèse.

II - LA MUTAGENESE

A - LA SOUCHE RHIZOBIUM MELILOTI M₉S

1 - Etude de la souche mutée M₉Sm

a - Obtention de M₉Sm

La mutagenèse a été faite à partir de deux cultures de M₉S sur milieu RC fructosé 1 % (pH 7,2 et pH 6). L'agent mutagène est la NTG à concentration finale de 750 µg/ml.

Nous avons obtenu :

	: Culture sur RC fructo- : sé 1 % - pH 7,2	: Culture sur RC fructo- : sé 1 % - pH 6
: Pourcentage de survie	: 0,2 %	: 0,39 %
: pH du milieu gélosé : de la sélection	: 5,55	: 5,55
: Fréquence des mutants : spontanés	: $0,24 \cdot 10^{-3}$	: $1,41 \cdot 10^{-3}$
: Fréquence des mutants : après mutagenèse	: $0,218 \cdot 10^{-1}$	: $1,11 \cdot 10^{-1}$
: Efficacité de la : mutagenèse	: 87,2	: 78,7

2

Tableau 6 : Résultats de la mutagenèse de la souche Rhizobium meliloti M₉S.

Le tableau 6 nous montre que dans les deux cas de cultures, le pourcentage des survivants est très faible, de l'ordre de 3%. Par contre, le résultat est meilleur si la mutagenèse est faite à partir d'une culture sur RC fructosé 1 % pH 6. En effet, il est possible que cette différence soit due au fait que ce pH est voisin de celui du tampon Tris-acide et de celui du milieu gélosé de la sélection. Il semble qu'il se fasse déjà une première sélection par adaptation. Signalons, dans les deux cas, que la mutagenèse a multiplié par 100 le nombre des résistants au pH acide (voir l'efficacité).

Nous avons donc repris un clone dit M₉Sm pour le conserver dans un tube contenant du RC fructosé pH 5,5 et en milieu liquide glycérolé.

Le but de notre travail est d'obtenir des souches capables de se développer à un pH le plus bas possible, de façon à éliminer le problème du pH acide du sol de Bretagne, et de pouvoir s'adapter dans les meilleures conditions

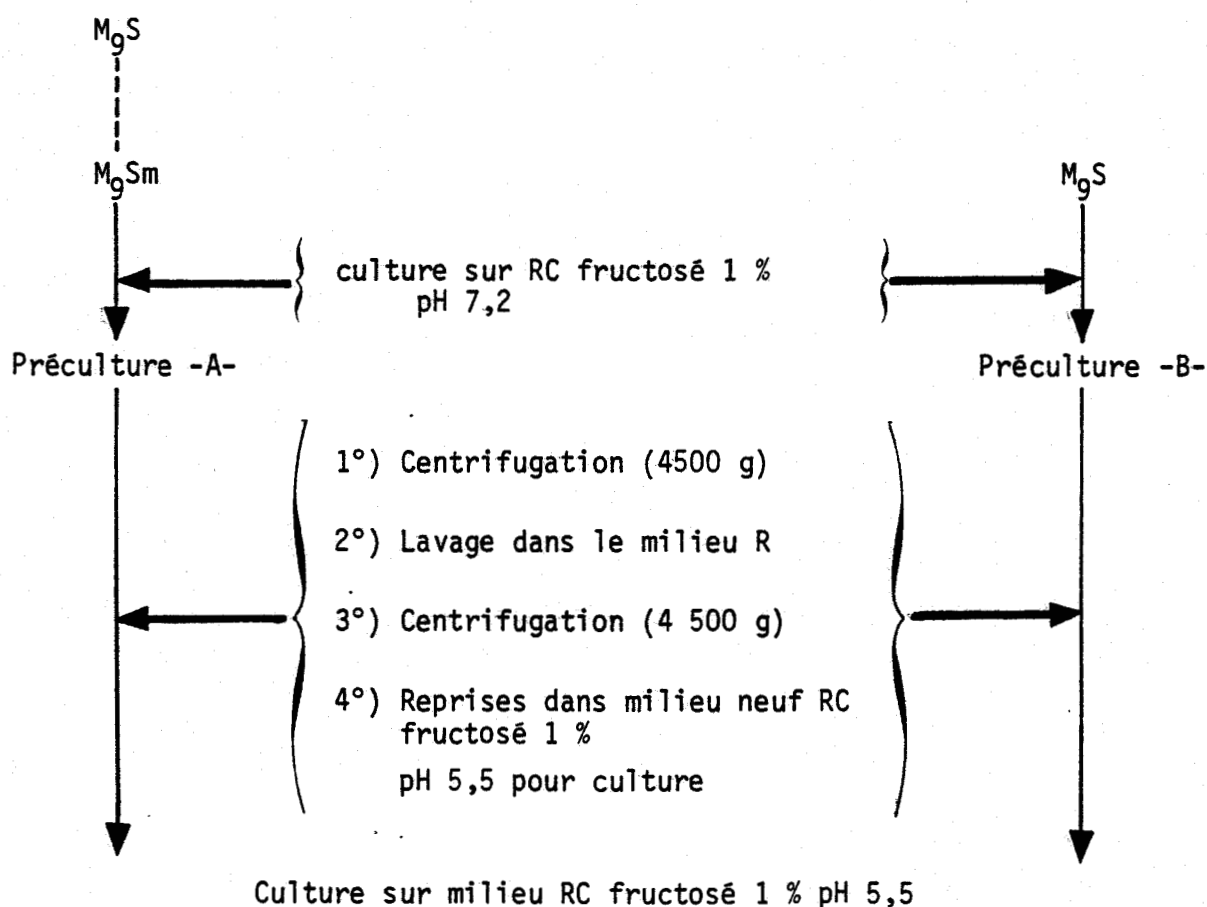
dans ces rhizosphères pour entrer en symbiose avec la luzerne.

Il nous a donc paru intéressant d'approfondir le problème, en tentant de comparer les deux souches.

b - Comparaison des souches M_9S et M_9Sm

Il s'agit ici de voir si la souche obtenue M_9Sm est différente de la souche sauvage (M_9S) de départ et si elle est capable de se développer à un pH plus bas que cette dernière.

Pour réaliser cette expérience, nous avons procédé de la façon suivante :



Notons que l'inoculum de départ dans les deux cas a une densité optique de l'ordre de 0,05 correspondant environ à $5 \cdot 10^7$ cellules par ml.

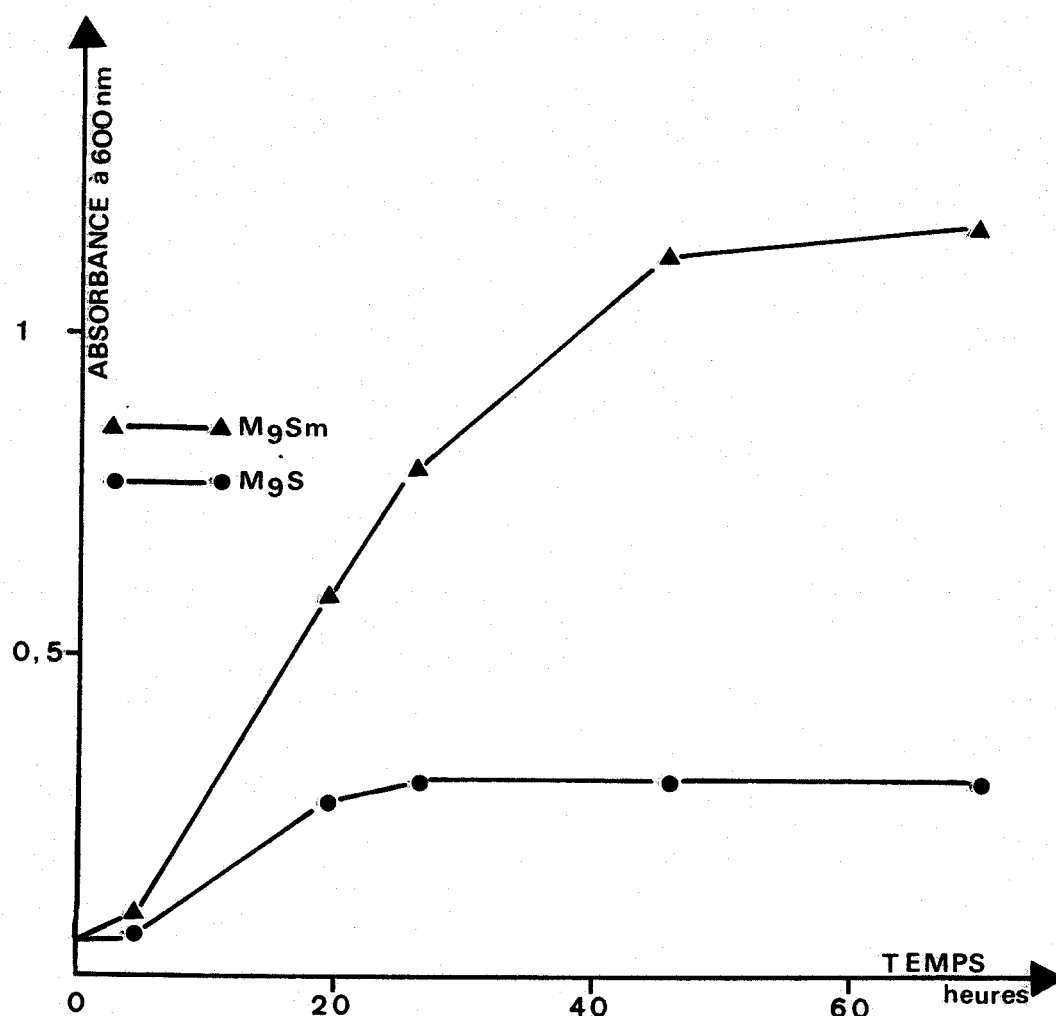


Fig. 5 : Evolution de la croissance des souches M₉S et M₉Sm sur milieu RC fructosé 1 % pH 5,5.

D'après la figure 5, il semble évident qu'il s'agit alors d'un mutant et non d'une souche adaptative. En effet, le temps de génération de la souche M₉Sm est meilleur que celui de la souche sauvage et de plus, la croissance est plus importante sur le milieu RC fructosé 1 % pH 5,5. Notons au passage que l'allure de la courbe de croissance de M₉S sur milieu fructosé pH 5,5 est à peu près identique à celle trouvée auparavant (voir la figure 2).

Ce résultat nous a encouragé à effectuer une autre mutagenèse.



2 - Etude de la souche mutée $M_9Sm_1^{Str}$

a - Obtention de M_9Sm_1

A partir de la souche M_9Sm isolée de la première mutagenèse de la souche sauvage *R. meliloti* M_9S , nous avons effectué une deuxième mutagenèse par la NTG. Cette opération aura pour but, si possible, d'améliorer la tolérance en acidité de la souche.

Après les 30 minutes d'action de la NTG, les cellules sont centrifugées, lavées deux fois dans le milieu R, centrifugées et reprises dans des milieux liquides RC fructosé à différents pH inférieurs à 5,5. L'inoculum de départ est très grand, de l'ordre de 10^8 cellules par ml de façon à avoir si possible, un maximum de développement en cas d'existence des mutants.

Notons que la condition de la mutagenèse est différente de la précédente. En effet, l'isolement sur milieu solide précédé d'un enrichissement en milieu liquide pourrait rendre difficile l'obtention des mutants "plus acides".

b - Comparaison des souches M_9Sm et M_9Sm_1

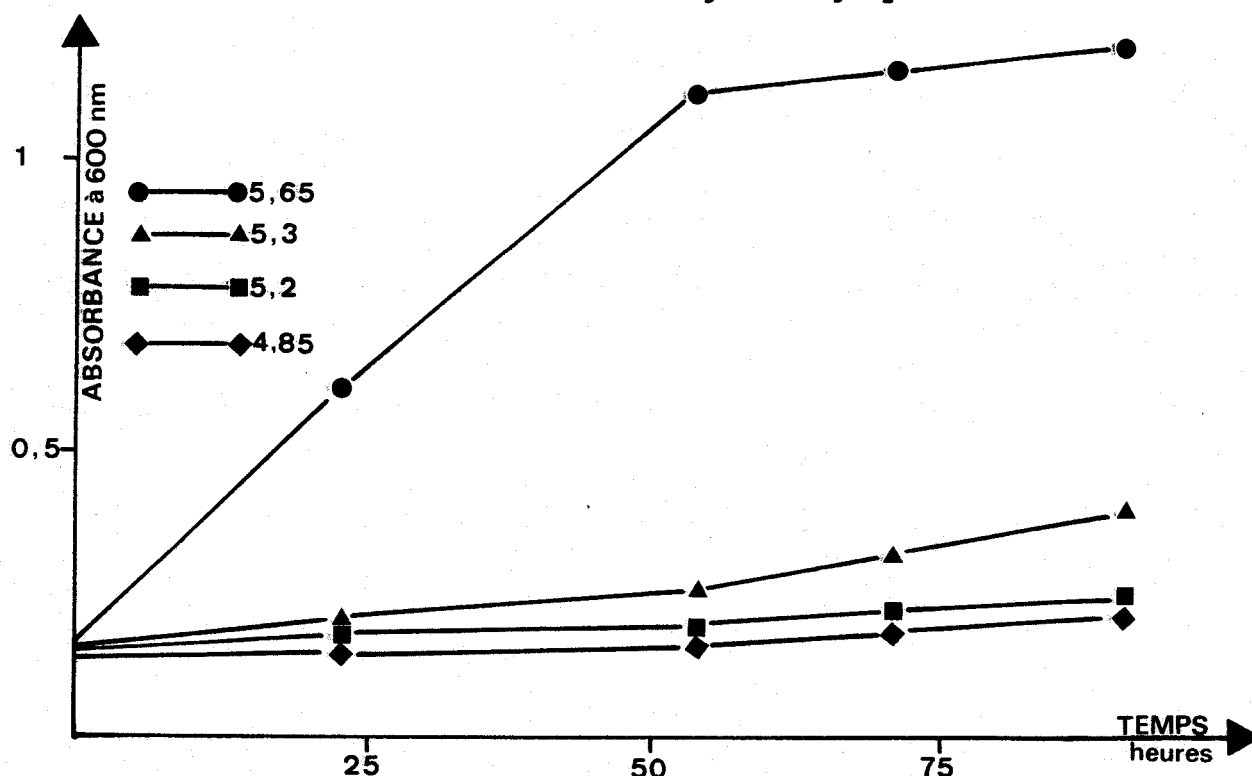


Fig. 6 : Evolution de la croissance de M_9Sm sur RC fructosé 1 % à différents pH acides.

Le témoin non traité par la NTG a été fait à partir de la souche M_9Sm dans les mêmes conditions que le produit de la mutagenèse.

Le résultat de la figure 6 montre :

- A pH 5,6, nous assistons à une croissance bactérienne. Ce phénomène a été déjà constaté auparavant (voir la figure 5).
- A pH 5,35, nous remarquons une très légère augmentation de la densité optique. La bactérie éprouve donc une très grande difficulté à effectuer son métabolisme de croissance.
- Aux pH 5,2 et 4,85, la croissance est nulle. Les cellules semblent être lysées.

Sur la figure 7, on constate que malgré un inoculum de départ important, la croissance est lente durant les premières vingt-quatre heures pour les pH 5,6 et 5,35. Ce phénomène pourrait être interprété par une adaptation de certains clones à l'acidité du milieu. Les autres cellules non résistantes périssent. La phase exponentielle se situe entre 25 et 60 heures. Notons dans le cas de pH 5,2 une légère croissance de la souche soumise à la NTG.

La souche ainsi obtenue après isolement sur RCG fructosé 1 % pH 5,2 est nommée M_9Sm_1 .

Néanmoins, il peut y avoir une variation de pH due à la lyse des cellules. Il serait donc nécessaire de vérifier le pH limite exact de la croissance de cette nouvelle souche M_9Sm_1 , tout en partant d'un faible inoculum.

Cependant, avant de faire cette expérience, il nous semble utile de rendre M_9Sm_1 résistante à la dihydrostreptomycine.

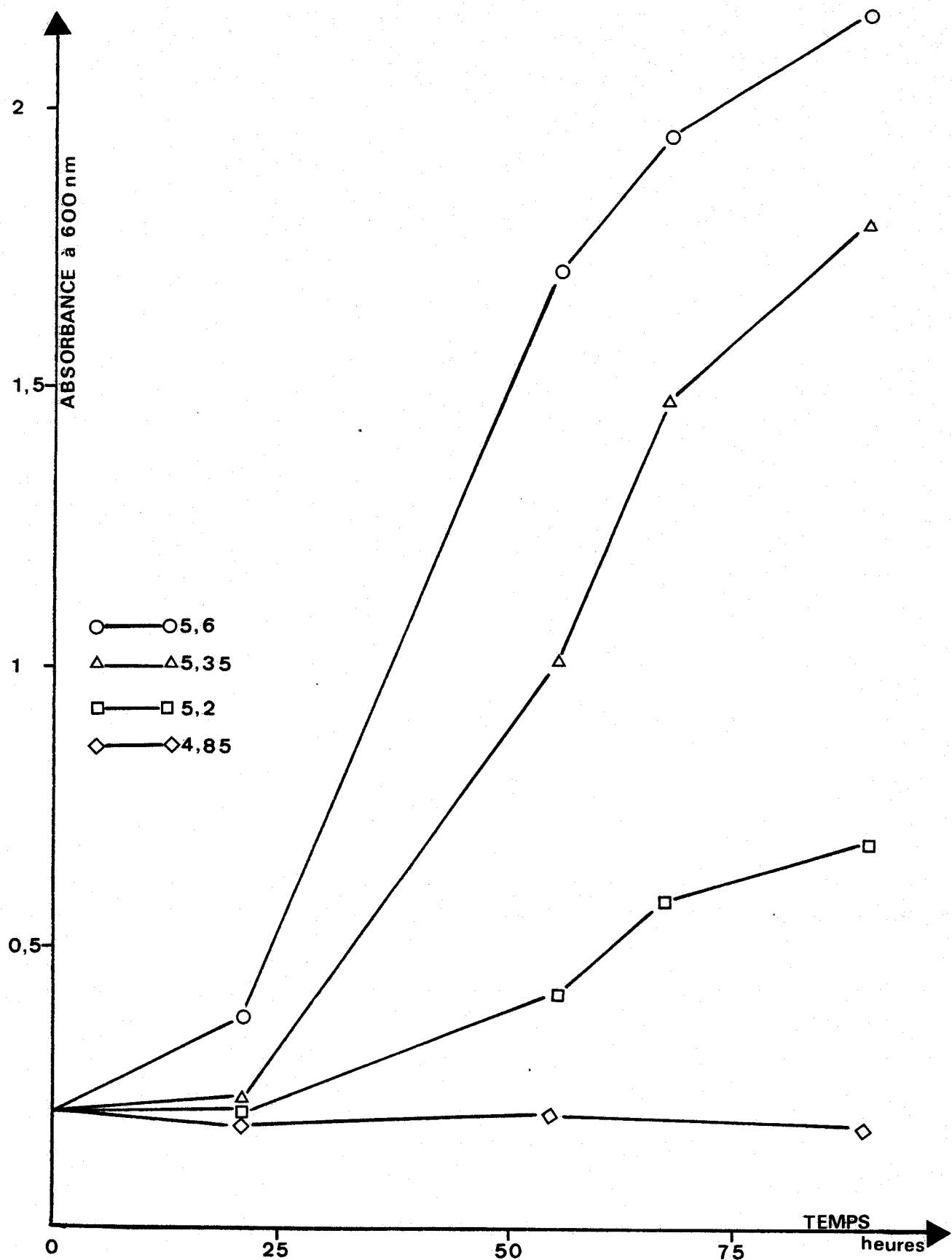


Fig. 7 : Evolution de la croissance de la souche $M_9 Sm_1$ sur RC fructosé 1 % à différents pH acides.



c - Résistance à la dihydrostreptomycine.

Les souches M₉Sm et 1-5 en plus de M₉Sm₁ sont rendues résistantes à la dihydrostreptomycine.

Ceci présente deux avantages :

- éviter les contaminations par d'autres bactéries.
- pouvoir repérer les souches dans la terre à l'aide de ce marqueur génétique (9, 41).

Ainsi les souches M₉Sm, M₉Sm₁ et 1-5 résistantes ont été obtenues à la concentration de 400 µg/ml.

d - Détermination du pH limite de la croissance de M₉Sm₁^{Str}

La souche M₉Sm₁^{Str} est cultivée sur milieu RC fructosé. A densité optique égale à 0,84, les cellules sont récupérées par centrifugation, lavées deux fois et remises en suspension dans un même volume minimum R. Des volumes variables de cette suspension bactérienne sont inoculés dans 10 ml de milieu RC fructosé à différents pH contenant de la dihydrostreptomycine.

Après 48 heures de culture, les résultats sont rapportés dans le tableau 7.

pH initial du milieu de culture	5,6	5,35	5,1	4,95
Volume d'inoculum (en ml)				
0,1	+	+	-	-
0,2	+	+	-	-
0,5	+	+	-	-
1,0	+	+	±	-

Tableau 7 : Détermination du pH limite de la souche M₉Sm₁^{Str} sur milieu RC fructosé 1 % contenant 400 µg/ml de dihydrostreptomycine en fonction du volume d'inoculum.

Légende :

- + Culture dense
- ± Culture peu différente de l'inoculum
- Pas de croissance.

Il apparaît que le pH limite de la croissance de la souche $M_9Sm_1^{Str}$ se situe entre 5,35 et 5,1 pour un inoculum variant de 0,1 à 1 ml.

e - Mutagenèse de la souche $M_9Sm_1^{Str}$

Nous avons de nouveau essayé d'améliorer la résistance aux pH acides de $M_9Sm_1^{Str}$ en effectuant une mutagenèse.

Avant et après mutagenèse, des numérations sur des milieux RCG fructosés contenant 400 $\mu\text{g/ml}$ de dihydrostreptomycine ont été effectuées aux pH suivants : 4,95 ; 5,1 ; 5,45 ; et 5,65.

Signalons que la culture du départ pour effectuer la mutagenèse est faite dans du milieu RC fructosé contenant de la dihydrostreptomycine pH 5,65.

+-----+				
: Culture sur RC fructosé 1 % contenant :				
: 400 µg/ml de dihydrostreptomycine pH 5,65 :				
+-----+				
: Pourcentage des	:	2,35 %		:
: survivants	:			:
+-----+				
: pH du milieu gélosé,	:	5,45	:	5,1
: de la sélection	:		:	4,95
+-----+				
: Fréquence des mutants	:	0,76	:	0
: spontanés	:		:	0
+-----+				
: Fréquence des mutants	:	0,57	:	0
: après mutagenèse	:		:	0
+-----+				
: Efficacité de la	:	0,77	:	0
: mutagenèse	:		:	0
:	:		:	

Tableau 8 : Résultats de la mutagenèse de la souche $M_9Sm_1^{Str}$.

Les déterminations ont été réalisées sur trois milieux de pH différents.

D'après le tableau 8, nous constatons qu'aucun clone n'a pu être repéré sur les pH 5,1 et 4,95.

Par contre, le pourcentage des survivants est fort supérieur à celui que l'on trouve pour la première mutagenèse de la souche R. meliloti M_9S . Il est multiplié environ par 10. Il semble donc y avoir une nette amélioration à la résistance acide.

B - LA SOUCHE RHIZOBIUM MELILOTI 1-5^{Str}

Nous avons fait également une mutagenèse dans les mêmes conditions que celles des souches M₉S et M₉Sm₁^{Str} pour le Rhizobium meliloti 1-5^{Str}. Elle a été effectuée à partir d'une culture sur milieu RC fructosé 1 % contenant 400 µg/ml de dihydrostreptomycine pH 5,65 de densité optique 0,94.

Le pourcentage de survivants ainsi obtenu est de 0,16. Par ailleurs, aucun clone ne se développe sur milieu de sélection RCG fructosé contenant de la dihydrostreptomycine à pH 5,1 et 5,45 avant et après action de la NTG. Comme il n'a pas été possible d'obtenir des colonies résistantes à pH acide, nous n'avons pas poursuivi les essais de la mutagenèse.

DISCUSSION ET CONCLUSION.

Dans les essais décrits dans ce chapitre, nous avons utilisé deux souches sauvages efficaces M_9S et $1-5^{Str}$ dont la différence fondamentale réside dans le fait que la première acidifie fortement le milieu en dégradant le glucose et la plupart des sucres, alors que la $1-5^{Str}$ ne forme pas de produits acides dans ces conditions.

Nous avons constaté que seul le pH initial du milieu de culture avait un effet sur la croissance de ces souches. L'acidification due à la dégradation du glucose ne semble pas jouer un rôle important puisque l'une et l'autre souche présentent la même sensibilité aux pH acides. De plus, des expériences ont été faites avec la souche $M_9Sm_1^{Str}$ et ont montré que cette dernière acidifie sur le milieu glucosé aussi bien que la souche mère M_9S .

Il a été possible d'obtenir des mutants acido-tolérants à partir de la souche M_9S , alors que cela a toujours été impossible pour la souche $1-5^{Str}$.

Cette difficulté d'obtenir un mutant de la $1-5^{Str}$ n'est pas liée à un caractère particulier de cette souche à résister à la mutagenèse (par exemple système de réparation). En effet, on obtient des mutants résistants à la dihydrostreptomycine, aussi bien à partir de la $1-5$ que de la M_9S .

La souche $1-5$ est souvent utilisée en agronomie pour infecter des graines destinées à germer dans des sols acides. On pouvait penser que la résistance de cette souche dans les sols acides était due au fait qu'elle ne faisait pas baisser davantage le pH de la rhizosphère déjà acide. Dans l'incapacité où nous sommes de connaître exactement la mutation ayant rendu la souche M_9S plus résistante aux pH acides, il ne nous est pas possible d'expliquer ce fait.

Ainsi, vu le caractère de la souche $1-5$, il s'avère que la faculté d'adaptation aux différentes conditions de la rhizosphère dépend de la bactérie et diffère d'une souche de Rhizobium meliloti à une autre.

Toutefois, l'un des faits saillants de cette étude demeure l'obtention par mutagenèses successives de la souche $M_9Sm_1^{Str}$ capable de se développer jusqu'à 5,35 à partir d'un inoculum de l'ordre de 10^7 cellules par ml. Cette souche est résistante à la dihydrostreptomycine qui est un marqueur génétique : celui-ci permet d'une part de la repérer dans le sol, et d'autre part d'éliminer les contaminations éventuelles.

Grâce à sa faculté à se développer à pH plus acide, nous envisagerons dans l'étape suivante d'étudier le comportement symbiotique de cette souche $M_9Sm_1^{Str}$ par rapport à la souche Rhizobium meliloti M_9S et surtout par rapport à $1-5^{Str}$ du fait de son utilisation pour la culture de luzerne.

Chapitre 2

LA SYMBIOSE

La présence dans le sol des souches efficaces de R. meliloti ayant une capacité élevée de fixer symbiotiquement l'azote avec la luzerne est un des facteurs qui influencent directement l'établissement de cette culture. En effet, la luzerne devient alors rapidement indépendante de l'azote du sol et le rendement en matière sèche est meilleur.

L'amélioration des inoculants de la luzerne est basée sur la sélection de Rhizobium ayant les caractéristiques suivantes :

- 1° L'efficacité symbiotique dans toutes les conditions d'habitat avec la luzerne,
- 2° La facilité de nodulation,
- 3° Une concurrence meilleure vis-à-vis des autres Rhizobium indigènes,
- 4° La survie et le développement meilleurs dans les sols concernés.

Vu les comportements différents des souches M_9S , $M_9Sm_1^{Str}$ et $1-5^{Str}$, nous étudierons dans ce chapitre leurs propriétés symbiotiques vis-à-vis de la terre de BRETAGNE et des conditions d'habitat analogues à cette dernière avec la plante hôte (luzerne) dans le cadre d'un programme d'amélioration des inoculants pour cette légumineuse notamment :

- a) l'infectivité (capacité de nodulation) ;
- b) l'efficacité (capacité de fixer l'azote atmosphérique) :
 - 1° Mesure du poids sec de la plante,
 - 2° Fixation symbiotique de l'azote par le test de la réduction d'acétylène par la nitrogénase en chromatographie en phase gazeuse.

La souche R. meliloti $1-5^{Str}$ est utilisée dans un but comparatif vis-à-vis de la souche sauvage M_9S et surtout du mutant $M_9Sm_1^{Str}$.

MATERIEL ET METHODES.

I - LA LUZERNE : *Medicago sativa*, variété Magali.

II - LES SOUCHES DE RHIZOBIUM MELILOTI.

- M₉S
- M₉Sm₁Str
- 1-5Str

III - LES TERRES DE BRETAGNE.

Deux sortes de terres bretonnes ont été étudiées : l'une de pH 4,9 et l'autre de pH 5,9. Ces terres sont équilibrées au point de vue granulométrie avec une légère dominante limoneuse. Des études sur la matière organique ont montré leur pauvreté en éléments fertilisants et certains oligoéléments.

Plus particulièrement, une analyse sur terre de pH 4,9 a été faite et a donné les résultats suivants : (complément du bulletin N° 3235. Station I.N.R.A. Quimper 1978).

- Analyse granulométrique :

argile.....	17,1 % (moyen)
limon fin.....	26,6 % (moyen)
limon grossier.....	38,8 % (assez élevé)
sable fin.....	10,8 % (normal)
sable grossier.....	6,7 % (faible)

- Analyse chimique :

Terre fine.....	97,5 %	(très bon)
pH.....	5,0	(très acide)
Matière organique.....	4,0 %	(bon)
Acide phosphorique assimilable.....	295 mg/kg	(bien pourvu)
Potasse assimilable.....	180 mg/kg	(faible)
Magnésie assimilable.....	200 mg/kg	(riche)
Cuivre assimilable.....	2,9 mg/kg	(bon)
Zinc assimilable.....	14,1 mg/kg	(très bon)
Calcium échangeable.....	2,2 %	

Ainsi, la proportion de terre fine est très bonne, le pH fortement acide. Ce sol est bien pourvu en matière organique, acide phosphorique, manganèse, cuivre et zinc assimilable. Par contre, les teneurs en potasse et en calcium sont faibles.

IV - LES MILIEUX.

A - Milieu de NICOL et THORNTON (78).

K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2 g
Na Cl.....	0,1 g
Fe PO_4	1 g
$Ca_3 (PO_4)_2$	2 g
Fe Cl_3	1 ml d'une solution concentrée à 10g/litre
Eau de conduite.....	q.s.p. 1 litre.

Le pH est ajusté à la valeur voulue par une solution de H_3PO_4 (acide orthophosphorique) ou de K OH (potasse).

Pour le milieu gélosé, on ajoute 15 g/litre d'agar Biomar ou 12 g/litre d'agar Difco.

La stérilisation se fait à 120° C pendant 20 minutes. Les tubes contenant 12 ml du milieu sont maintenus inclinés après stérilisation jusqu'à prise en masse.

B - Milieu RN⁻

En plus du milieu classique RC fructosé pour la culture des R. meliloti, nous avons utilisé le milieu RN⁻ (milieu R dépourvu d'azote) pour le lavage des cellules avant l'inoculation de composition suivante :

MgSO ₄ , 7 H ₂ O.....	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Eau distillée.....	q.s.p. 1 litre

pH = 7,2

La stérilisation se fait à 120° C pendant 20 minutes.

V - DESINFECTION DES GRAINES ET PREGERMINATION.

A - Désinfection des graines.

Les graines sont réparties dans une boîte de Petri contenant une goutte d'agent mouillant (détergent, Teepol) et environ 20 ml de chlorure mercurique (HgCl₂) à 5 ‰.

Après 5 minutes d'agitation, le désinfectant est éliminé par plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile.

B - Prégermination.

Les graines, préalablement stérilisées, sont déposées sur milieu riche RCG coulé en boîtes de Pétri afin de contrôler la stérilité et la germination.

La prégermination dure 2 à 4 jours à la température de 30° C selon les graines jusqu'à l'apparition des radicules de 1 à 2 centimètres de longueur.

VI - CULTURE ASEPTIQUE DE LA LUZERNE.

Elle s'effectue dans des tubes 20 x 200 renfermant le milieu dépourvu d'azote (milieu de NICOL et THORNTON), dans ce même milieu additionné des deux terres acides de BRETAGNE, dans des pots contenant du sable de FONTAINEBLEAU additionné de terre ou dans la terre acide pH 5,9 de BRETAGNE.

A l'aide d'une öse, les jeunes plantules prégermées d'une longueur de 1 à 2 centimètres sont transplantées à raison d'une plantule par tube sur le milieu solide gélosé de NICOL et THORNTON. Dès l'apparition des racines secondaires, les bactéries préalablement centrifugées, lavées par du milieu RN^- et reprises dans le milieu de NICOL et THORNTON liquide sont ajoutées.

Dans le cas du milieu solide contenant du sable, l'inoculum est préparé avec des bactéries en suspension dans de l'eau stérile. Pour la terre acide pH 5,9, les graines sont mises stérilement dans les pots et les bactéries sont ajoutées de la même façon que dans le cas du sable.

L'incubation s'effectue dans la serre avec 16 heures d'éclairement et 8 heures d'obscurité. La température est de 20 à 25° C et l'humidité est de 80 %.

VII - DETERMINATION DU POIDS SEC DE LA PLANTULE.

Selon la durée de culture (1,2 ou 3 mois), quelques plantules, lavées préalablement avec l'eau distillée, sont mises dans une capsule sèche de poids connu. Elle est placée à l'étuve à 100° C pendant 24 heures. Ensuite, des pesées sont effectuées pour avoir le poids sec correspondant.

Pour chaque détermination de poids sec, nous avons pris la moyenne de 6 plantules.

VIII - MESURE DE LA FIXATION D'AZOTE : DOSAGE DE L'ETHYLENE PROVENANT DE LA REDUCTION DE L'ACETYLENE.

La mesure de la fixation d'azote biologique dans les sols, les plantes et l'eau revêt un intérêt considérable mais très difficile à réaliser.

En effet, les modifications variées de la méthode de digestion KJELDAHL donnent des grosses erreurs dans les manipulations analytiques. L'utilisation ^{15}N (11) paraît être idéale par sa sensibilité mais le procédé est très coûteux. La méthode à ^{13}N (13) est inutilisable pour les essais de routine.

L'utilisation de la réduction de l'acétylène a été employée pour mesurer l'azote fixé. La base d'une telle méthode fut rendue possible lorsque DILWORTH (22) et SCHOLLHORN et Coll. (96) montrèrent que l'acétylène est réduit par le système nitrogénase chez Clostridium pasteurianum.

A - Principe.

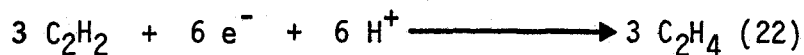
La nitrogénase est l'enzyme qui catalyse la fixation d'azote ou la réduction assimilatrice d'azote.

La réaction peut être schématisée de la façon suivante :



Cette enzyme a la particularité d'être très peu spécifique quant au substrat : elle peut transférer des électrons non seulement à N_2 mais aussi à NH_3 , N_2O , C_2H_2 , HCN , CH_3CN , H_3O^+ , et leurs homologues.

La réduction de l'acétylène se fait suivant la réaction :



Elle correspond au transfert de deux électrons par molécule d'éthylène formée, alors qu'il faut six électrons pour réduire une molécule d'azote. La fixation d'une molécule se fait donc dans les mêmes conditions que la formation de trois molécules d'éthylène à partir d'acétylène. C'est sur cette analogie qu'est fondée l'emploi de la méthode à l'acétylène (35).

Le principe d'une telle méthode est donc simple : il suffit d'enfermer l'échantillon étudié dans une enceinte étanche, d'introduire de l'acétylène et de mesurer la production d'éthylène.

Soulignons qu'un des principaux désavantages de la méthode est que le substrat acétylène est hautement explosif. De plus, l'échantillon commercial contient toujours des traces d'éthylène.

B - Conditions expérimentales.

Cette opération est réalisée sur un chromatographe INTERSMAT I.G.C. 112 F.L. La colonne en acier inoxydable, de 2 mètres de longueur et de 0,31 centimètre de diamètre, est remplie de sphérosil X OB 075. Le détecteur est à ionisation en flamme. L'azote est utilisé comme gaz vecteur. Les températures du four, d'injection et de détecteur, sont respectivement 50° C, 70° C et 115° C.

* Remarque :

Le matériel de la colonne utilisée varie d'un auteur à un autre. On peut utiliser l'alumine (50), le porapak (102), l'éthyl N, N' diméthylloxamide sur fibrick (35), le porapak M (93)....

Comme gaz vecteur, on peut aussi utiliser l'hélium.

C - Technique du dosage.

Dans un flacon de 140 ml contenant 6 plantules de luzerne et fermé hermétiquement, on injecte à travers le bouchon de caoutchouc 10 % (V/V) d'acétylène et un volume de propane (témoin interne) de façon à avoir approximativement 1,27 μ moles. On prélève 0,5 ml pour le dosage.

Les mesures d'acétylène réduit sont effectuées après 7 à 24 heures d'incubation à 30° C.

Les résultats sont comparés après 7 heures.

D - Calcul de la quantité de C_2H_4 (éthylène) produite (ΔQ).

$$Q = C \times K \times \frac{H_1}{H_2}$$

Tel que : Q = Nombre de moles de C_2H_4 produites

C = Nombre de moles de C_3H_8 injectées

K = Coefficient de proportionnalité défini auparavant

H_1 = Hauteur de pic C_2H_4 pour le prélèvement

H_2 = Hauteur de pic C_3H_8

$$\Delta Q = Q_7 - Q_0$$

Tel que : Q_7 = Nombre de moles de C_2H_4 produites au temps $T = 7$ heures

Q_0 = Nombre de moles de C_2H_4 produites au temps $T = 0$ heure.

E - Détermination de K .

(Coefficient de proportionnalité établi à partir d'un mélange en proportions égales (V/V) de C_3H_8 et C_2H_4 dans l'air).

$$K = \frac{\text{Hauteur de pic } C_3H_8 \text{ (propane)}}{\text{Hauteur de pic } C_2H_4 \text{ (éthylène)}}$$

Dans notre expérience $K = 1,5$.

RESULTATS ET DISCUSSION.

I - ETUDE PRELIMINAIRE DES DIFFERENTES SOUCHES.

Des essais sur milieu de NICOL et THORNTON gélosé incliné soit à pH 7,2, soit à pH 5,5 sont réalisés avec différentes souches de R. meliloti : M_9S , $M_9Sm_1^{Str}$ et $1-5^{Str}$. Pour chaque condition opératoire, la souche est testée sur 6 plantes. Les plantules sont inoculées avec environ $1,5 \cdot 10^7$ cellules par ml.

La fixation symbiotique est étudiée en suivant :

- 1° l'évolution du nombre de nodules par plante pendant 45 jours,
- 2° la moyenne du poids sec après 45 jours de culture,
- 3° la fixation d'azote (test de réduction de l'acétylène) par plante après 45 jours.

Cette expérience permet de voir le comportement symbiotique de ces différentes souches pour les deux pH.

A - Milieu pH 7,2.

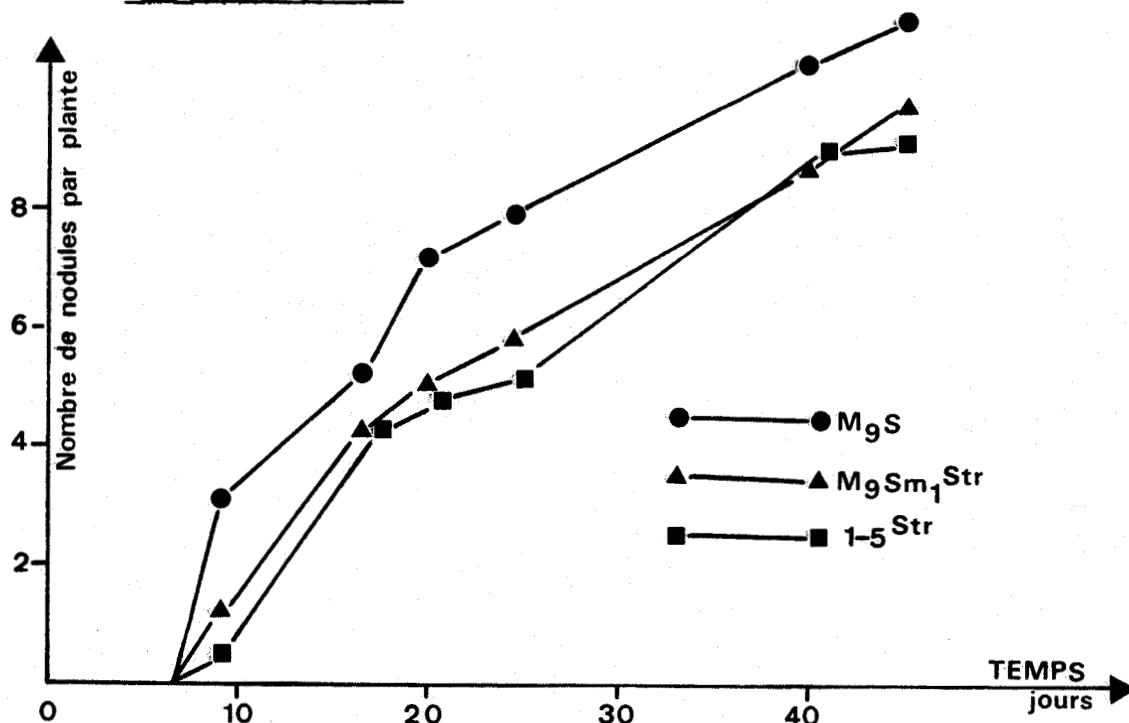


Figure 8 : Nodulation sur milieu de NICOL et THORNTON gélosé pH 7,2 des différentes souches de Rhizobium meliloti : M_9S , $M_9Sm_1^{Str}$ et $1-5^{Str}$.

La figure 8 montre que la souche R. meliloti M₉S a une capacité d'infectivité meilleure que M₉Sm₁^{Str} et 1-5^{Str}. Elle se traduit par un tracé de l'évolution du nombre de nodules par plante supérieur aux deux autres souches qui sont presque identiques.

Les premiers nodules apparaissent environ 7 jours après inoculation.

	Témoin non inoculé	M ₉ S	M ₉ Sm ₁ ^{Str}	1-5 ^{Str}
: Nombre de plantes	: 6	: 6	: 6	: 6
: Nombre de nodules après 45 jours de culture	: 0	: 72	: 62	: 57
: Pourcentage de plantes nodulées	: 0 %	: 100 %	: 100 %	: 100 %
: Poids sec des plantes (mg par plante)	: 9,8	: 14,66	: 12,40	: 18,33
: ΔQ : quantité d'éthylène produite (n moles par plante et par heure)	: 2,43	: 49,35	: 40,6	: 82,84

Tableau 9 : Efficacité symbiotique des différentes souches de Rhizobium meliloti au bout de 45 jours de culture dans le milieu de NICOL et THORNTON gélosé pH 7,2.

D'après le tableau 9, les trois souches M₉S, M₉Sm₁^{Str} et 1-5^{Str} sont efficaces et font noduler la luzerne à 100 % à pH 7,2.

Par contre, la souche 1-5^{Str} malgré sa capacité d'infectivité légèrement inférieure aux deux autres souches, présente une efficacité symbiotique qui se traduit par une augmentation de poids sec par plante de l'ordre de 25 % et une quantité d'éthylène produite par plante et par heure nettement supérieure. Donc il n'existe pas de relation entre l'efficacité symbiotique et le nombre de nodules.

B - Milieu pH 5,5.

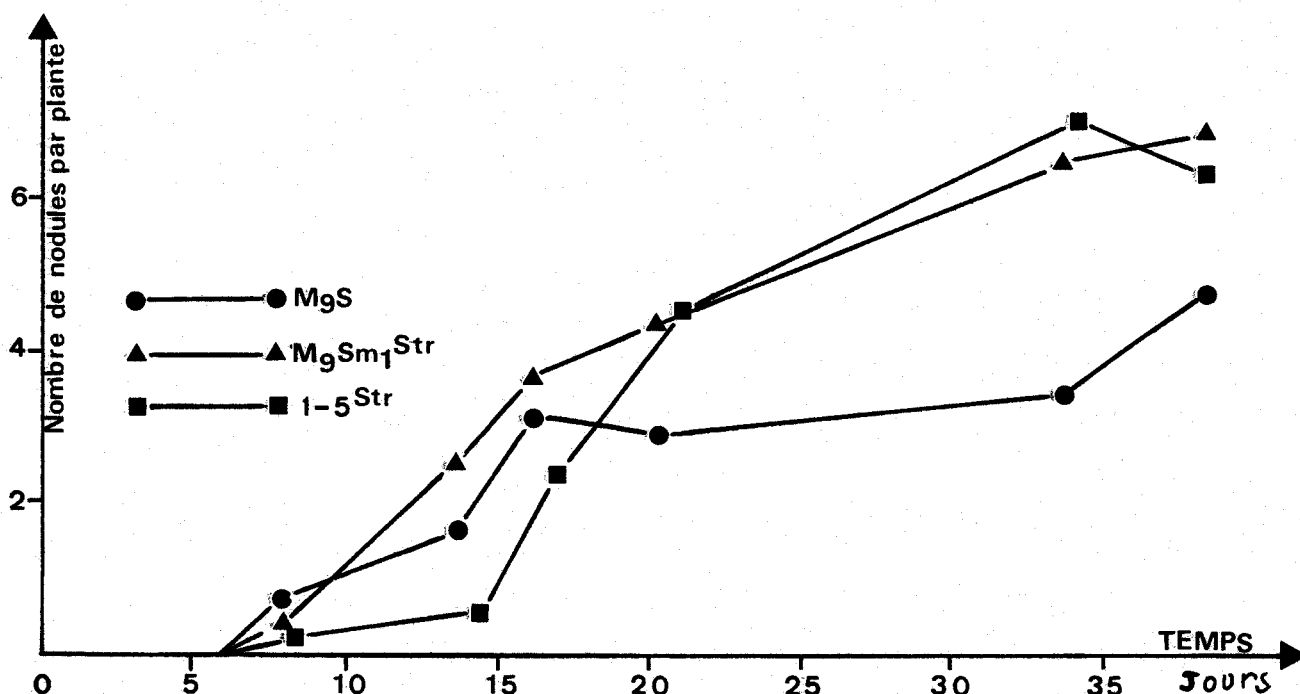


Figure 9 : Nodulation sur milieu de NICOL et THORNTON gélosé pH 5,5 des différentes souches *Rhizobium meliloti* M₉S, M₉Sm₁^{Str} et 1-5^{Str}.

A pH 5,5, les deux souches M₉Sm₁^{Str} et 1-5^{Str} présentent un pouvoir d'infectivité meilleur que celui de la souche M₉S, ainsi que leur capacité à former rapidement des nodules au cours du temps.

D'autre part, pour ce même pH, nous assistons à une réduction de nombre de nodules par plante par rapport au pH 7,2. En effet, les nombres de nodules par plante après 45 jours de culture aseptique pour les souches M₉S, M₉Sm₁^{Str} et 1-5^{Str} sont respectivement à pH 7,2 : 12 ; 10,33 et 9,5 et à pH 5,5 : 4,66 ; 6,83 et 6,33.

	Témoïn non inoculé	M ₉ S	M ₉ Sm ₁ ^{Str}	1-5 ^{Str}
: Nombre de plantes	: 6	: 6	: 6	: 6
: Nombre de nodules au : bout de 45 jours	: 0	: 28	: 41	: 38
: Pourcentage de plantes nodulées	: 0 %	: 66,66 %	: 100 %	: 100 %
: Poids sec (mg par plante)	: 9,2	: 13,86	: 17,73	: 14,4
: ΔQ : Quantité d'éthylène pro- : duite (n moles par plante et par : heure)	: 1,66	: 40,36	: 57,0	: 44,5

Tableau 10 : Efficacité symbiotique des différentes souches de Rhizobium meliloti au bout de 45 jours de culture dans le milieu de NICOL et THORNTON gélosé pH 5,5.

D'après les résultats montrés sur le tableau 10, malgré le pH acide du support, nous constatons une efficacité symbiotique meilleure pour les souches M₉Sm₁^{Str} et 1-5^{Str} par rapport à M₉S. Elle se traduit par un poids sec et une quantité d'éthylène produite après 45 jours de culture nettement supérieurs.

Signalons enfin que l'infectivité n'est pas totale à pH 5,5 pour la souche M₉S.

C - Discussion.

Il apparaît donc à la suite de cette expérimentation que :

D'une part, l'infectivité (aptitude à former les nodules) est fonction du pH du milieu de culture utilisé pour la croissance de la luzerne. Ainsi, l'acidité réduit la nodulation pendant la durée de l'expérience, mais ne retarde pas l'apparition du premier nodule. Moins de nodules apparaissent à pH 5,5 qu'à pH 7,2.

D'autre part, le comportement des souches selon leur efficacité est variable. En effet, l'assimilation de l'azote dans les plantes en symbiose avec les Rhizobium est très différente. Ainsi, la souche $M_9Sm_1^{Str}$, issue de la souche sauvage M_9S ayant subi une série de mutagenèses par la nitrosoguanidine à raison de 750 $\mu g/ml$ et sélectionnée sur milieu riche solide pH acide, a une efficacité bien meilleure que la souche M_9S à pH 5,5. Ceci se traduit par un rendement en matière sèche et une réduction d'acétylène meilleurs.

Enfin, nous avons vu dans les chapitres précédents que la souche $M_9Sm_1^{Str}$ peut se développer à pH acide, même si le temps de génération est très long. Malgré cette croissance faible et l'acidité du milieu de culture, nous constatons que la souche ne perd pas son infectivité et qu'elle est efficiente tant à pH acide qu'à pH voisin de la neutralité.

Le fait qu'il y ait une relation entre l'efficacité symbiotique et l'acidité du milieu nous amène à approfondir le problème en tentant de voir les comportements de ces trois souches à différents pH acides.

II - ETUDE EN FONCTION DU pH SUR MILIEU SYNTHETIQUE.

Dans cette expérience, nous avons étudié l'effet de l'acidité du milieu sur la fixation symbiotique chez les trois souches de R. meliloti M_9S , $M_9Sm_1^{Str}$ et 1-5^{Str} sous un environnement contrôlé avec la même variété de la luzerne. Le pH du milieu de NICOL et THORNTON gélosé varie de 4,9 à 6,6. Nous avons contrôlé après 32 jours de culture, la nodulation, le rendement en matière sèche par mesure de poids sec par plante et la quantité d'éthylène produite.

L'essai comprend 6 plantules par pH et par souche. L'inoculum est environ de $1,5 \cdot 10^8$ bactéries par ml.

A - La nodulation.

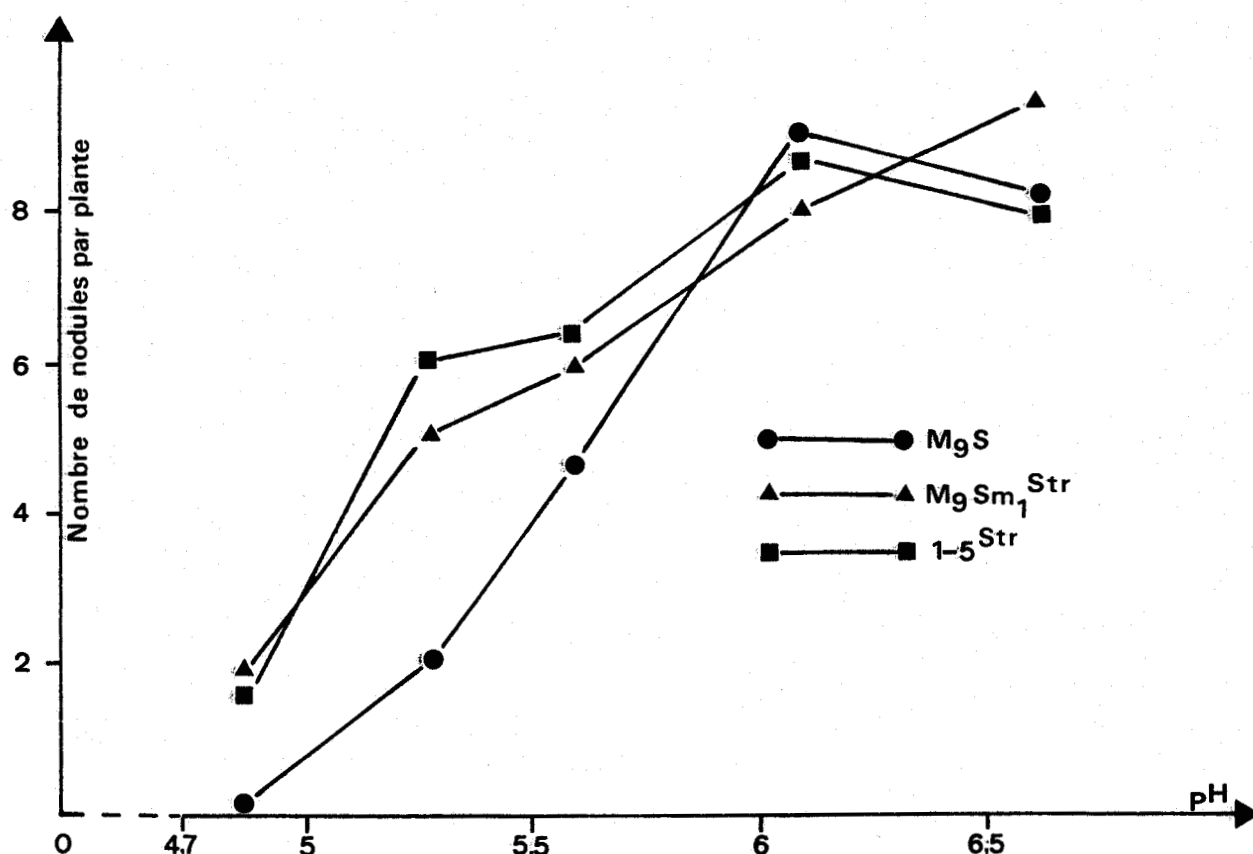


Figure 10 : Effet du pH sur la nodulation de la luzerne après 32 jours de culture.

La figure 10 montre que :

- D'une part, l'infectivité augmente nettement lorsque le pH croît de 4,95 à 6 et devient presque constante pour les pH 6,1 et 6,6.
- D'autre part, aux pH 4,95 ; 5,3 et 5,6 la nodulation semble nettement meilleure pour les souches de *R. meliloti* M₉Sm₁^{Str} et 1-5^{Str} que celle de M₉S. Elle se manifeste par un écart très significatif du nombre de nodules par plante.
- De plus, malgré l'acidité du milieu, les nodules apparaissent toujours 5 à 10 jours après l'inoculation. Ainsi, l'acidité ne retarde pas l'apparition des premiers nodules mais influe sur le nombre de nodules.

- Enfin, il est intéressant de signaler que la nodulation ne se fait pas à 100 % pour les trois souches à pH faible. Elle est respectivement aux pH 4,95 et 5,3 de 0 % et 33,3 % pour la souche M_9S , 66 % et 83,33 % pour $M_9Sm_1^{Str}$ et 50 % pour $1-5^{Str}$ à pH 4,95.

B - Le rendement en matière sèche.

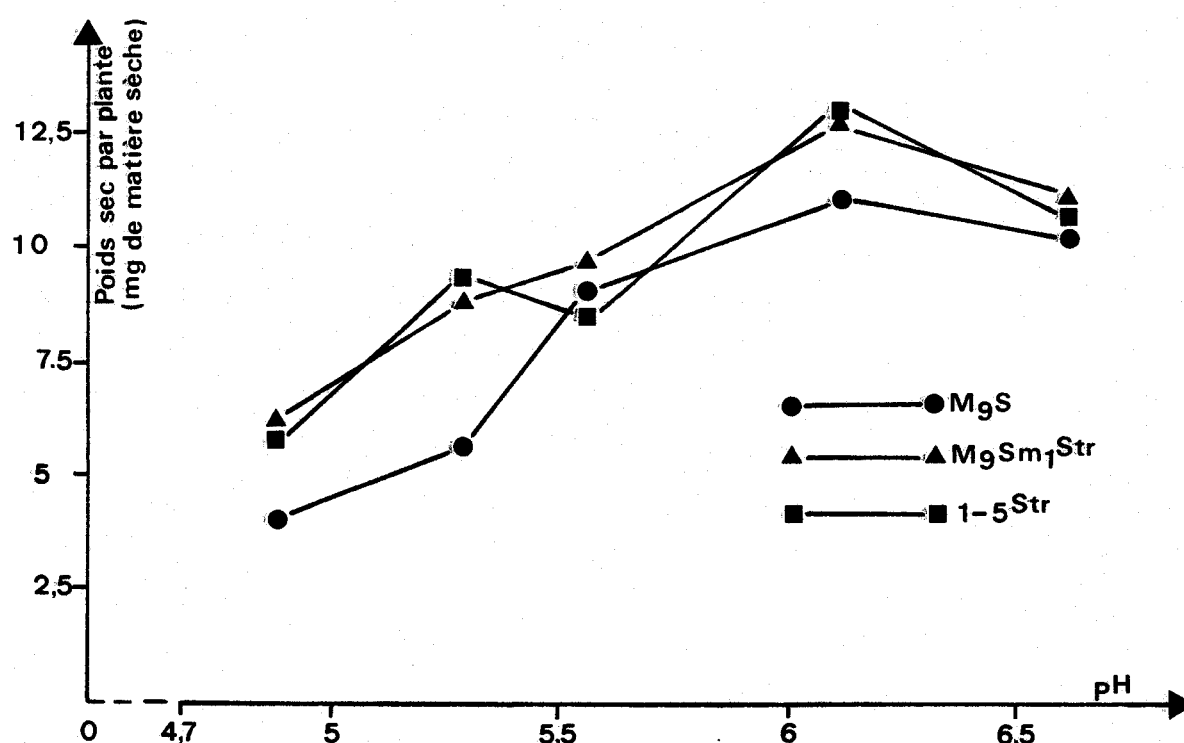


Figure 11 : Effet du pH sur le rendement en matière sèche de la luzerne après 32 jours de culture.

La relation qui existe entre le rendement en matière sèche et le pH du milieu de culture est résumée dans la figure 11. Le poids sec est utilisé comme mesure indirecte de la fixation d'azote des souches de R. meliloti M_9S , $M_9Sm_1^{Str}$ et $1-5^{Str}$. Nous constatons en effet que le rendement en matière sèche est meilleur à pH supérieur à 6,1 pour les trois souches. Par ailleurs, les souches $M_9Sm_1^{Str}$ et $1-5^{Str}$ prennent l'avantage sur M_9S aux pH 4,95 et 5,3.

C - Quantité d'éthylène produite.

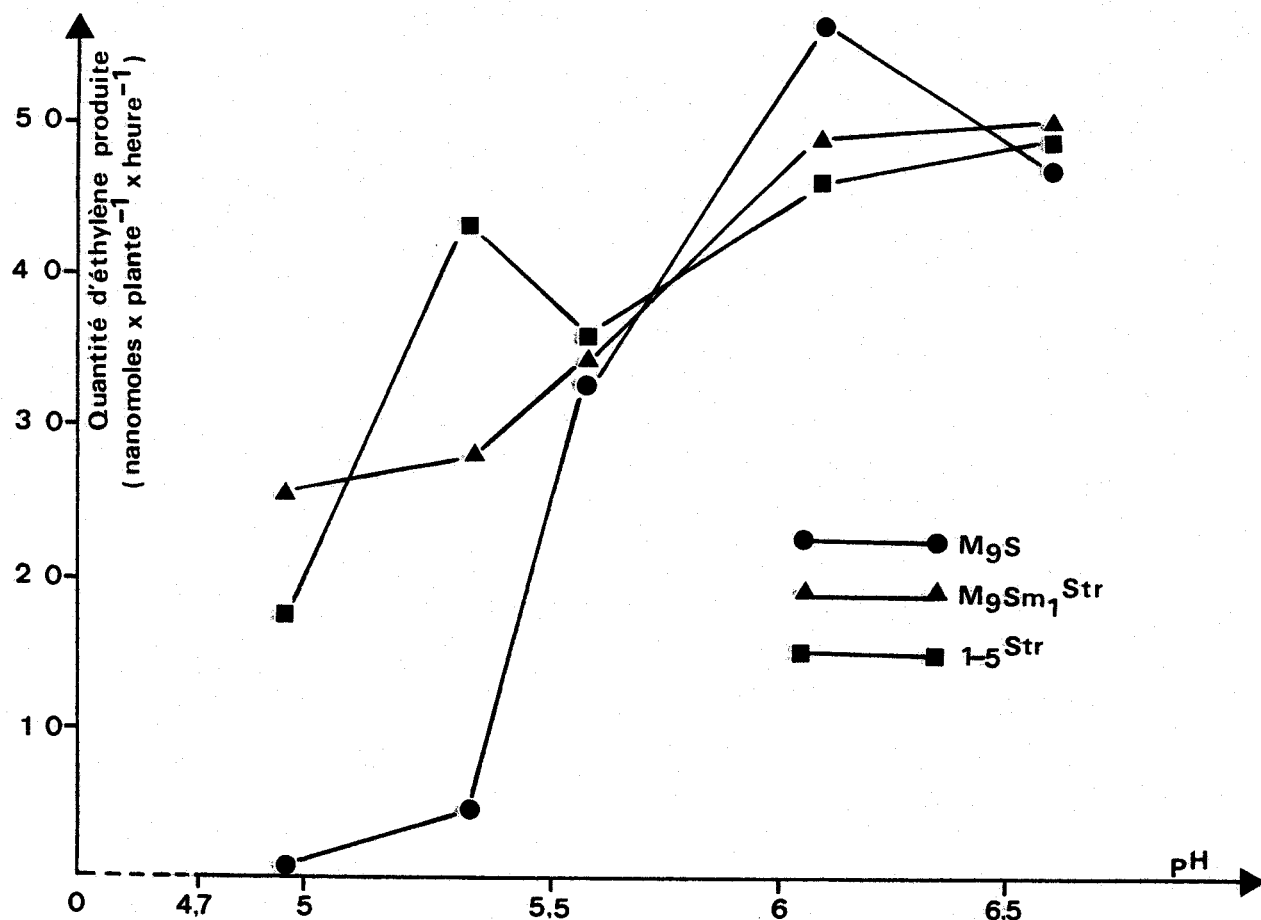


Figure 12 : Effet du pH sur la quantité d'éthylène produite de la luzerne après 32 jours de culture.

La figure 12 montre que, effectivement l'acidité influence l'efficacité symbiotique des trois souches étudiées. Elle reflète les résultats obtenus sur les figures 10 et 11. En effet, la symbiose est meilleure pour M₉Sm₁^{Str} et 1-5^{Str} que M₉S aux pH 4,95 et 5,3.

De plus, la fixation symbiotique augmente avec le pH jusqu'à pH 6 et devient alors presque constante aux pH 6,1 et 6,6.

D - Discussion.

Les résultats obtenus lors de ces expériences nous amènent à conclure que :

La fixation d'azote est fortement affectée par le pH du milieu. Lorsque le pH est inférieur à 6,1, le rendement en matière sèche, la nodulation et la quantité d'éthylène produite sont réduits fortement. Aux pH inférieurs à 4,95 l'acidité inhibe la nodulation. Cette variation de l'efficacité peut être directement attribuée au faible taux d'infection des racines quand le pH est inférieur à 6,0, les pH supérieurs à 6 ont très peu d'effet sur la culture de luzerne.

En effet, plusieurs auteurs montraient que l'acidité influence la nodulation soit en limitant la survie et la multiplication de Rhizobium (2, 72, 90), soit en interférant avec le processus de la nodulation (72). Ainsi, l'activité d'ion H^+ est un facteur majeur empêchant la survie et la croissance du Rhizobium (107) et de la luzerne dans le milieu.

De plus, l'efficacité symbiotique varie d'une souche de Rhizobium à une autre selon son adaptation au pH du milieu. La nodulation apparaît en vagues successives selon l'activité physiologique de la plantule (67). Ainsi, certaines souches n'auraient pas autant d'aptitude à croître dans la rhizosphère de la luzerne et à former rapidement les nodules, alors que d'autres auraient la capacité à former rapidement les nodules malgré le pH acide du milieu. Tel est le cas des souches Rhizobium meliloti $M_9Sm_1^{Str}$ et $1-5^{Str}$ par rapport à M_9S aux pH 4,95 ; 5,3 et 5,6. Les Rhizobium, aux stades précoces de la symbiose, se comportent en "parasites" ; ils sont alors en compétition avec la plante pour l'azote et les autres substances métaboliques de la plante. La rapidité à laquelle une souche forme des nodules et élabore la nitrogénase pour la fixation de l'azote sera reflétée par une reprise rapide de la croissance de la luzerne.

Enfin, nous aurions pu essayer de mettre en évidence les corrélations possibles entre la taille, le nombre de nodules et l'efficacité des souches. En fait, MARTINEZ (67) a déjà mentionné le manque de corrélation entre l'état des nodules chez la luzerne et l'efficacité des souches de Rhizobium meliloti, l'appréciation de l'état des nodules étant trop subjective pour être quantifiable.

Signalons qu'aucune relation ne semble exister entre le nombre des nodules par plante et la quantité d'éthylène produite ou le poids sec de la plante. Par contre, les plantes ayant des nodules roses (probablement dus à la présence de leghémoglobine) réduisent plus fortement l'acétylène que les nodules incolores.

Ces résultats semblent intéressants pour l'étude de l'amélioration de la luzerne en terre acide de BRETAGNE. Ainsi, dans la suite de notre travail nous avons utilisé les deux terres acides de BRETAGNE à savoir pH 4,9 et 5,9.

III - ETUDE SUR DES MILIEUX CONTENANT DE LA TERRE ACIDE DE BRETAGNE.

A - Suspension de terre de BRETAGNE en milieu de NICOL et THORNTON gélosé.

A 50 grammes de terres de BRETAGNE de pH 4,9 et 5,9, on ajoute 50 ml de milieu de NICOL et THORNTON liquide.

Le mélange contenant la terre de pH 5,9 est gélosé à 15 g/litre, tandis que celui contenant la terre de pH 4,9 nécessite une concentration d'agar de 25 g/litre du fait de la non-solidification due à l'acidité. Les milieux sont répartis à raison de 12 ml par tube (20 x 200 ml).

Après stérilisation à 120° C pendant 20 minutes de façon à éliminer les Rhizobium indigènes présents dans les terres, les tubes sont maintenus inclinés jusqu'à prise en masse.

Nous avons essayé de suivre la nodulation de la luzerne pendant 44 jours pour les souches $M_9Sm_1^{Str}$ et $1-5^{Str}$. L'inoculation se fait avec environ 3.10^7 cellules par ml.

1° Terre pH 5,9.

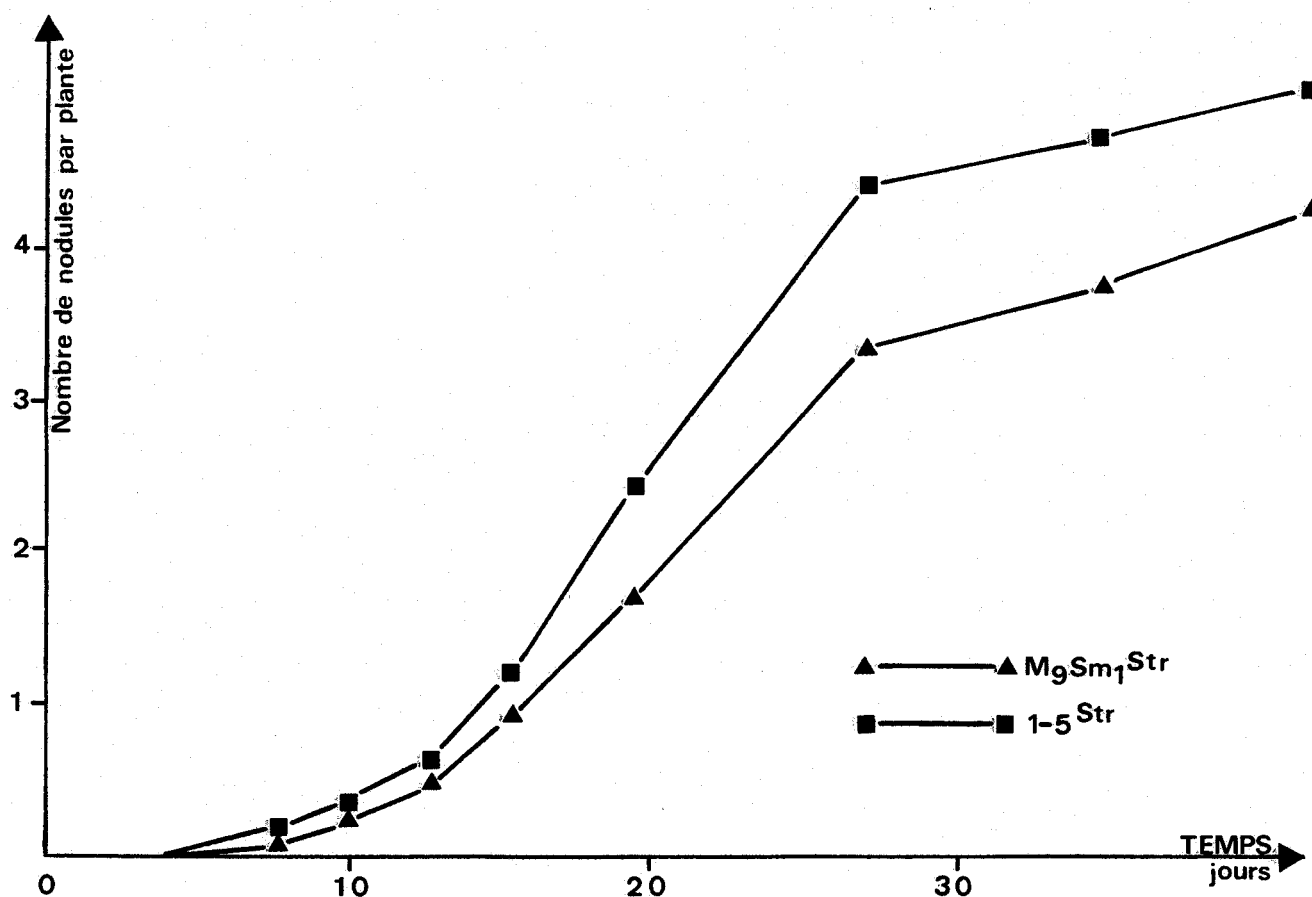


Figure 13 : Nodulation sur milieu (NICOL et THORNTON additionné de terre pH 5,9) gélosé des Rhizobium meliloti M₉Sm₁^{Str} et 1-5^{Str}.

D'après la figure 13, la nodulation à pH 5,9 est meilleure avec la souche 1-5^{Str} qu'avec M₉Sm₁^{Str}. Ce résultat a été déjà constaté lors de la culture de la luzerne dans le milieu NICOL et THORNTON gélosé seul.

Par contre, dans ce dernier milieu, la nodulation est nettement meilleure qu'en additionnant la terre de pH 5,9. Ce phénomène pourrait amener à suggérer l'existence des facteurs autres que l'acidité affectant la nodulation.



Ainsi, nous avons dosé la quantité d'azote présent dans cette terre par la méthode de KJELDAHL. Nous avons trouvé les résultats suivants :

: Dosage d'azote total :	NH ₃ :	NO ₃ ⁻ :
:(méthode de KJELDAHL) :	ammoniaque :	Nitrate :
----- (g/kg de terre) -----	----- (g/kg de terre) -----	----- (g/kg de terre) -----
: 2,576 :	0,34 :	0,41 :
: :	: :	: :

Tableau 11 : Quantité d'azote (en grammes par kg de terre) dans la terre de pH 5,9 de la BRETAGNE.

Nous constatons une haute concentration de nitrate 0,41 g/kg, soit 6,5 mM NO₃⁻. Cette teneur pourrait affecter la formation des nodules. En effet, MUNNS (73) montre que les concentrations de l'ordre de 0,2 ou 0,5 mM réduisent fortement le nombre de nodules. RAGGIO et RAGGIO'S (84) suggèrent que le nitrate inhibe à haute concentration mais stimule à la concentration de l'ordre de 1 mM ou moins la formation des nodules.

2° Terre pH 4,9.

L'étude menée sur cette terre est négative. La luzerne se développe très difficilement. Après un mois de culture, elle reste au stade de "feuille trilobée". Nous n'avons pas pu effectuer l'inoculation à cause de cet état rachitique des plantules.

Les dosages de différentes quantités d'azote sur cette terre sont montrés par le tableau ci-dessous :

: Dosage d'azote total :	NH ₃ :	NO ₃ ⁻ :
: méthode de KJELDAHL :	ammoniaque :	nitrate :
----- (g/kg de terre) -----	----- (g/kg de terre) -----	----- (g/kg de terre) -----
: 1,6 :	0,204 :	1,48 :
: :	: :	: :

Tableau 12 : Quantité d'azote (en grammes par kg de terre) dans la terre pH 4,9 de la BRETAGNE.

Bien souvent, les légumineuses répondent favorablement à des apports de phosphore et de potasse. La quantité de potasse assimilable de 180 mg/kg semble être faible pour le développement de la luzerne. De plus, la quantité de nitrate 1,48 g/kg de terre correspondant à 2,3 m M est très néfaste à la nodulation.

B - Sable de FONTAINEBLEAU.

Pour chacune des deux terres acides de BRETAGNE (de pH 5,9 et 4,9) nous avons ajouté du sable de FONTAINEBLEAU suivant le rapport : sable : 2 ; terre : 1. Ce sable a la particularité d'avoir été traité par l'acide.

Des vases tronconiques en terre cuite de 13 cm de diamètre sont remplis de ce mélange. Des tubes en verre sans fond sont placés dans le milieu et sont bouchés au coton. On met du sable paraffiné en surface. L'ensemble est enveloppé pendant l'autoclave (120° C pendant 20 minutes) par du papier d'aluminium

Chaque pot a reçu 300 grammes de sable ou terre-sable (1/2) ; 9 traitements ont été faits de la façon suivante :

- Support sable :

T₁ : témoin non inoculé

T₂ : inoculation par la souche M₉Sm₁^{Str}

T₃ : inoculation par la souche 1-5^{Str}

- Support sable-terre pH 5,9 (2/1) :

T₄ : témoin non inoculé

T₅ : inoculation par la souche M₉Sm₁^{Str}

T₆ : inoculation par la souche 1-5^{Str}

- Support sable-terre pH 4,9 (2/1) :

T₇ : témoin non inoculé

T₈ : inoculation par la souche M₉Sm₁^{Str}

T₉ : inoculation par la souche 1-5^{Str}.

Les graines après avoir été stérilisées par Hg Cl₂ sont mises en culture directement. L'inoculation se fait après 8 jours de développement de la graine et à raison d'environ 10⁸ bactéries par plantule (Figure 14).

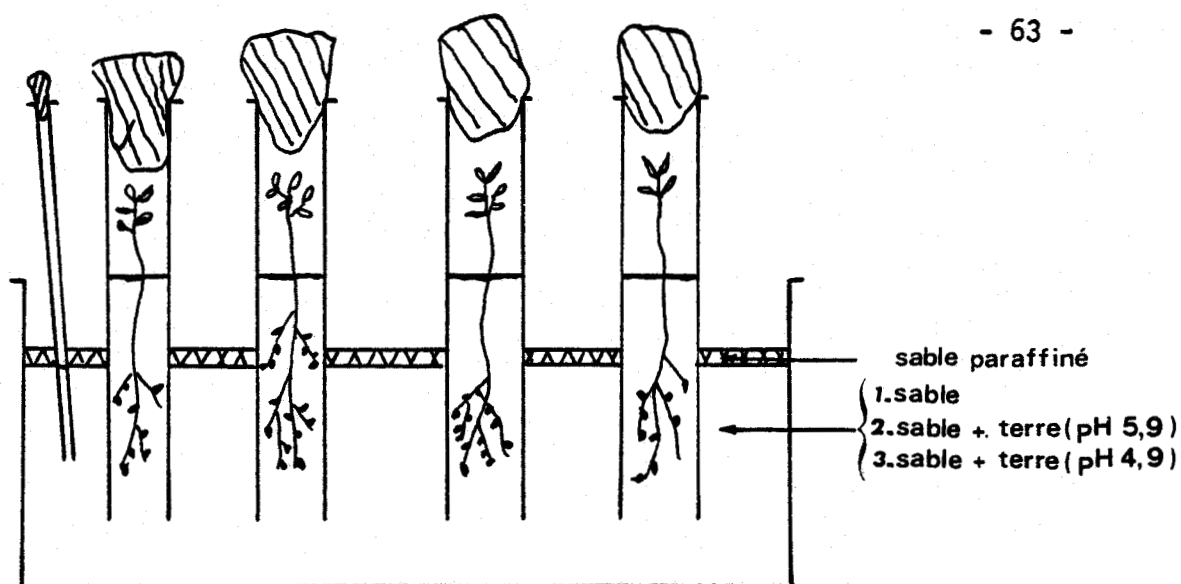


Figure 14

Nous avons utilisé ce support sableux dans le but de récupérer facilement les plantules de façon à compter le nombre des nodules et surtout d'évaluer l'efficacité symbiotique des inocula par la mesure de la réduction d'acétylène en chromatographie en phase gazeuse après deux mois de développement de la luzerne.

D'après le tableau 13 (P. 64) nous constatons que :

D'une part, l'efficacité symbiotique est meilleure sur le sable seul que sur le sable supplémenté avec des terres acides de BRETAGNE. Celle-ci se traduit par une réduction d'acétylène nettement supérieure.

D'autre part, nous assistons à une nodulation maximale des plantes ; le rendement en matière sèche et la réduction d'acétylène sont nettement supérieurs aux valeurs trouvées pour le témoin non inoculé.

Il est certain qu'il existe des facteurs autres que l'acidité qui inhibent la fixation d'azote dans les terres de pH 5,9 et 4,9. En effet, dans ces dernières après 90 jours de culture aseptique de luzerne, les rendements en matière sèche sont de l'ordre de 1,03 à 1,8 fois supérieurs à leurs témoins non inoculés respectifs, alors que dans le cas de sable seul, ce rapport est de 3,5 à 3,75.

	Sable	Sable - terre pH 5,9	Sable - Terre pH 4,9
Témoin non inoculé : M_{9Sm_1} Str: 1-5Str :		Témoin non inoculé : M_{9Sm_1} Str: 1-5Str :	Témoin non inoculé : M_{9Sm_1} Str: 1-5Str :
Nombre de plantes :	4 : 10 : 6 :	6 : 10 : 6 :	5 : 9 : 7 :
Nombre de nodules après 90 jours :	0 : 43 : 34 :	0 : 82 : 61 :	0 : 4 : 5 :
Pourcentage des plantes nodulées :	0 % : 100 % : 100 % :	0 % : 100 % : 100 % :	0 % : 33,33 % : 42,85 % :
Poids sec (mg par plante) :	1,95 : 6,9 : 7,3 :	6,55 : 7,79 : 6,76 :	2,14 : 3,8 : 3,57 :
ΔQ : Quantité d'éthylène produite (n moles/plt/heure) :	0,067 : 6,4 : 6,65 :	0,073 : 2,8 : 2,1 :	0,013 : 0,625 : 0,504 :
Taille des nodules :	0 : moyen : moyen :	0 : petite : petite :	0 : petite : petite :
:	:	:	:

Tableau 13 : Efficacité symbiotique des souches de Rhizobium meliloti M_{9Sm_1} Str et 1-5Str au bout de 90 jours de culture dans les milieux : sable, sable-terre pH 5,9 (2/1) et sable-terre pH 4,9 (2/1).



Un de ces facteurs limitant la fixation serait probablement la présence d'azote combiné dans ces terres de BRETAGNE. La luzerne possède dans les racines et les parties aériennes une nitratre-réductase. La quantité de nitratre présente dans ces types de sol semble inhiber la fixation (tableaux 11 et 12). Ainsi une certaine partie de l'azote fixé provient de l'action de la nitrogénase, le reste étant assimilé à partir des terres par la voie de la nitratre réductase. La faible différence des rendements en matière sèche du témoin non inoculé et la terre en est la preuve.

En outre, nous constatons une différence très nette entre la taille des nodules des trois types de milieu de culture : les nodules obtenus en présence de la terre sont plus petits que ceux observés sur le sable seul. La différence pourrait être due encore à la présence d'autres facteurs que l'acidité dans les deux types de sol.

Sur un même support, il ne semble pas y avoir de grande différence entre les deux souches $M_9Sm_1^{Str}$ et $1-5^{Str}$ au point de vue l'efficacité fixatrice.

Par contre, dans le cas de terre de pH 4,9, on note peu de différence entre les plantules inoculées et les témoins non infectés.

IV - TERRE DE BRETAGNE pH 5,9.

Des cultures de luzerne (Medicago sativa) ont été effectuées directement sur terre de pH 5,9.

Avant l'utilisation, les pots contenant 200 grammes de la terre de pH 5,9 ont été stérilisés à 120° C pendant 60 minutes. L'ensemencement des graines et l'inoculation bactérienne se font stérilement. Un témoin terre (non inoculé et non stérilisé) préparé avec des graines de luzerne stériles a été fait de façon à mettre en évidence les éventuels Rhizobium indigènes existant dans ce type de terre.

Après 35 jours de culture, un certain nombre de plantules sont récupérées pour mesurer leur efficacité symbiotique en dosant la réduction d'acétylène par chromatographie en phase gazeuse.

L'inoculation ($1,8 \cdot 10^8$ bactéries par gramme de terre) se fait à partir des R. meliloti M_9S , $M_9Sm_1^{Str}$ et $1-5^{Str}$.

Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant :

	Témoin non inoculé (terre stérile)		Témoin non inoculé (terre non stérile)		M_9S	$M_9Sm_1^{Str}$	$1-5^{Str}$
: Nombre de plantes	: 6	: 6	: 6	: 6	: 6	: 6	: 6
: Nombre de nodules au bout de 35 jours	: 0	: 16	: 15	: 27	: 16	:	:
: Poids sec (mg par plante)	: 8,49	: 10,11	: 11,43	: 12,33	: 11,55	:	:
: ΔQ : quantité d'éthylène produite (n moles par plante et par heure)	: 0,6	: 18,58	: 24,83	: 48,12	: 31,83	:	:

Tableau 14 : Efficacité symbiotique des souches de Rhizobium meliloti M_9S , $M_9Sm_1^{Str}$ et $1-5^{Str}$ au bout de 35 jours de culture dans la terre de pH 5,9 de BRETAGNE.

D'après le tableau 14, la souche $M_9Sm_1^{Str}$ apparaît être le meilleur inoculum de la terre de pH 5,9 de BRETAGNE. Ce résultat confirme celui du mélange sable-terre de pH 5,9 (2/1) trouvé auparavant. En effet, la souche $M_9Sm_1^{Str}$ présente une capacité fixatrice d'azote (test de réduction d'acétylène) supérieure à celles des souches M_9S et $1-5^{Str}$ et semble avoir un pouvoir d'infectivité légèrement supérieur ou identique à celui de la souche $1-5^{Str}$ sur cette terre de pH 5,9.

Dans ce type de sol, nous avons constaté la présence des Rhizobium indigènes ayant un pouvoir de nodulation et une activité fixatrice d'azote non négligeables. De plus la présence de nitrate, malgré l'apport d'inocula $M_9Sm_1^{Str}$ ou $1-5^{Str}$ améliore faiblement le rendement en matière sèche et nettement la fixation symbiotique par rapport au témoin non inoculé non stérile.

DISCUSSION ET CONCLUSION.

L'acidité est un paramètre important de la fixation symbiotique et de la nodulation ; elle ne retarde pas l'apparition des nodules. Elle agit sur la nodulation soit en limitant la survie et la multiplication des Rhizobium, soit sur le processus de la nodulation lui-même ; elle peut aussi intervenir en diminuant l'absorption ou l'adsorption du calcium par la luzerne. En effet, nous avons vu dans le chapitre précédent que les bactéries se divisent plus vite quand le pH du milieu de culture augmente. Il existe d'autres facteurs agissant sur la nodulation : par exemple une forte concentration en nitrate réduit ou inhibe la nodulation dans le cas de la terre de BRETAGNE de pH 5,9.

L'apport extérieur d'inoculum favorise la fixation symbiotique en sol acide. Il permet un meilleur rendement en matière sèche jusqu'à une certaine valeur de pH limite. Par contre, dans les sols très acides (la terre de BRETAGNE de pH 4,9) le chaulage est obligatoire. Bien qu'en général le Rhizobium soit plus sensible à l'acidité que la plante hôte, cette dernière dans ce cas est affectée.

Cette plus grande sensibilité de Rhizobium à l'acidité pourrait avoir des implications pratiques importantes. Pour favoriser la culture de la luzerne sur les sols modérément acides, les effets de l'acidité sur la croissance de la bactérie doivent être supprimés soit par application de carbonate de calcium ou par utilisation des souches de Rhizobium meliloti plus acidotolérantes.

Chapitre 3

ETUDE PHYSIOLOGIQUE DES SOUCHES DE RHIZOBIUM MELILOTI M₉S ET M₉S_{m1}^{str}

Nous avons vu précédemment que les deux souches de Rhizobium meliloti M₉S (sauvage) et M₉Sm₁^{Str} (mutant) se comportent différemment en fonction du pH du milieu.

Cette propriété est due soit à une mutation pléiotrophe, pouvant concerner par exemple les systèmes de perméabilité aux ions de façon à modifier le pH intracellulaire, soit à une mutation simple rendant acido-résistante une enzyme normalement sensible et qui limite la croissance de la bactérie.

D'où la recherche des différences entre la souche sauvage (M₉S) et son mutant (M₉Sm₁^{Str}) afin de tenter de déterminer les raisons de la résistance aux pH acides.

Dans ce travail, nous avons été obligés de chercher au hasard parmi les grandes fonctions de la cellule, celles qui ont pu être modifiées chez le mutant. Ainsi, nous avons étudié :

- 1° l'expression principale de la cellule : la croissance correspondant à la division cellulaire chez les micro-organismes.
- 2° la biosynthèse de macromolécules.
- 3° la pénétration d'un sucre particulièrement important : le fructose.

MATERIEL ET METHODES.

I - MILIEUX DE CULTURE.

En plus des milieux RC et R, nous avons utilisé les milieux suivants.

A - Milieu TY.

Tryptone.....	5 g
Extrait de levure.....	3 g
Ca Cl ₂ (6 H ₂ O).....	1,3 g
Eau distillée.....	q.s.p. 1 litre

pH = 7,2

La stérilisation se fait à 120° C pendant 20 minutes.

Le cas échéant nous avons ajouté de la dihydrostreptomycine à la concentration finale de 400 µg/ml.

B - Milieu RN^{-2c} (RN⁻ 2 fois concentré en phosphate).

K ₂ H PO ₄	1 g
Mg SO ₄ (7 H ₂ O).....	0,2 g
Eau bidistillée.....	q.s.p. 1 litre

On ajuste aux pH voulus par une solution d'acide orthophosphorique (H₃PO₄).

La stérilisation se fait à 120° C pendant 20 minutes.

C - Milieu minimum R^{2c} (R 2 fois concentré en phosphate).

K ₂ H PO ₄	1 g
Mg SO ₄ (7 H ₂ O).....	0,2 g
NH ₄ NO ₃	0,5 g
Eau distillée.....	q.s.p. 1 litre

pH 7,2

La stérilisation se fait à 120° C pendant 20 minutes.

II - MILIEUX DE SYNTHÈSE.

A - Tampon phosphate.

On prépare un tampon phosphate 0,2 M pH 7,2 pour la chromatographie sur colonne de Séphadex G 25. L'azoture de sodium est ajouté à la concentration finale de 0,02 %.

B - Mélange des acides aminés.

1° Solution A.

Dans une fiole jaugée de 50 ml, on met :

- 75 mg de chacun des acides aminés suivants : alanine arginine, glycocholate, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, ornithine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine et valine.
- on complète à 50 ml avec de l'eau distillée.
- La concentration de chaque acide aminé est de 1500 µg/ml.

2° Solution B.

La cystéine, le tryptophane, l'acide aspartique, l'acide glutamique et la tyrosine sont préparées séparément à la concentration de 15000 µg/ml.

Pour ces acides aminés, la dissolution se fait soit en ajoutant une goutte de solution de potasse (K OH) soit par chauffage.

La stérilisation de ces solutions se fait à 105° C pendant 30 minutes.

3° Mélange d'acides aminés.

A 10 ml de solution A on ajoute 1 ml chaque solution d'acide aminé de la solution B. On obtient alors 15 ml de mélange d'acides aminés de concentration 1000 µg/ml. On dilue ensuite au dixième pour avoir une concentration de 100 µg/ml.

III - SYNTHÈSE DES MACROMOLÉCULES.

A - GÉNÉRALITÉS.

Les cellules vivantes utilisent l'énergie chimique de l'ATP (adénosine triphosphate) pour réaliser le travail chimique qui consiste à effectuer la biosynthèse des composants cellulaires à partir de précurseurs.

La biosynthèse est programmée génétiquement. Les grosses macromolécules de la cellule, telles que protéines, polysides..., sont faites à partir des précurseurs simples par des séquences de réactions enzymatiques.

B - SYNTHÈSE DES EXOPOLYSIDES.

1 - Généralités.

Les exopolysides sont des longues chaînes de molécules de sucres liés par des liaisons glycosidiques, leurs poids moléculaires peuvent atteindre 10 millions.

Les bactéries d'espèce Rhizobium meliloti, en milieu complet ou en milieu de non prolifération, produisent des exopolysides en quantités variables selon les substrats carbonés (17). En effet, la synthèse est moins bonne sur milieu glucosé que fructosé (17). D'après COURTOIS et Coll. (18), ces exopolysides sont composés essentiellement d'oses neutres tels que glucose et galactose. Par contre, la croissance de la souche de Rhizobium est indépendante de la synthèse des exopolysides.

Des auteurs attribuent à ces molécules un rôle éventuel dans la symbiose en intervenant soit dans la protection de la souche de Rhizobium dans le sol (103), soit dans le mécanisme d'infection (34) (codage de la bactérie et des racines des légumineuses) et d'être ainsi le support de la spécificité légumineuse-Rhizobium (25). De plus, ils pourraient constituer une réserve d'énergie lors de l'état bactéroïde.

Il est difficile actuellement de préciser le rôle exact des exopolysides, en particulier au niveau de la spécificité et de l'efficacité.

2 - Synthèse et dosage d'exopolyosides (17).

a. - Synthèse.

Les cellules après culture sur milieu RC fructosé sont centrifugées à 4500 g pendant 10 minutes. Le culot, remis en suspension dans du tampon de non-prolifération 2 fois concentré en phosphate ($\text{RN}^{-2\text{C}}$) de pH 5,9 ou 7,2, est lavé par une nouvelle centrifugation puis repris dans le même tampon.

Pour 1 ml de synthèse d'exopolyoside, nous opérons de la façon suivante :
A 0,2 ml de cette suspension bactérienne, nous ajoutons 0,5 ml de $\text{RN}^{-2\text{C}}$ de pH correspondant, 0,05 ml d'une solution de fructose à 2 %, 0,05 ml de fructose radio-actif (D-fructose ^{14}C , U ; C.E.A., activité spécifique : 238 m Ci/mM) soit une concentration finale d'environ 10^6 cpm/ml et 0,2 ml d'eau distillée.

La synthèse se fait en tube de 16 x 160 dans un bain-marie à 30° C sous agitation rotative.

b. - Dosage.

A différents temps, on ajoute à 0,5 ml de milieu de synthèse, 2 ml de $\text{RN}^{-2\text{C}}$ de pH 5,9 ou 7,2. On centrifuge dans des pots coniques à 34 000 g sur une centrifugeuse SORVALL RC-2 réfrigérée à 4° C.

1° 2 ml du surnageant 2,5 ml sont passés sur colonne (15 x 600) Séphadex G.25. l'élution se fait par le tampon phosphate 0,2 M pH 7 contenant 0,02 % d'azoture de sodium. Le débit est de 65 ml par heure.

La fraction polyosidique sort à l'exclusion et les oses résiduels plus tardivement. En effet, les 40 premiers ml correspondant au volume mort sont éliminés. Les 40 ml suivants représentent la fraction polyosidique et les 80 ml finaux sont les oses résiduels et le dessalage de la colonne.

Ainsi, à 5 ml des deux dernières fractions, on ajoute 5 ml de liquide scintillant Lumagel. La radioactivité est comptée dans le spectromètre à scintillation liquide INTERTECHNIQUE ABAC SL40.

2° Le culot, remis en suspension dans 2 ml de tampon de non-prolifération ($\text{RN}^{-2\text{C}}$) de même pH, est lavé par une nouvelle centrifugation, puis repris par 0,2 ml de ce même tampon. On filtre sur membrane SARTORIUS 0,22 μ .

Le filtre est séché à la lumière infra-rouge. La radioactivité est comptée en présence de 10 ml de liquide scintillant Lipoluma.

La relation qui existe entre le nombre de cpm/ml et la quantité de polyosides en $\mu\text{g/ml}$ s'établit de la manière suivante : le nombre de cpm/ml dans la suspension bactérienne est calculé en tenant compte de la dilution dans les fractions. On considère que les polyosides sont des polymères constituées de n molécules de fructose utilisées pour la synthèse. Ainsi, le nombre de cpm/ml de fructose radioactif correspond à un certain nombre de $\mu\text{g/ml}$ de fructose froid. On ne tient pas compte quantitativement du fructose marqué au ^{14}C qui est en quantité négligeable par rapport au fructose froid.

C - INCORPORATION DE LA THYMIDINE RADIOACTIVE DANS L'ADN.

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est la principale molécule informationnelle de la cellule. Elle contient toute l'information génétique nécessaire à une reproduction exacte de chaque type de cellule pendant un nombre infini de générations.

1 - Marquage de l'ADN.

Les cellules, après culture sur milieu RC fructosé sont centrifugées à 4500 g pendant 10 minutes.

Le culot, remis en suspension dans du $\text{RN}^{-2\text{C}}$ de différents pH, est lavé par une nouvelle centrifugation pour être repris dans le même tampon afin d'être inoculé.

Les souches sont ensuite cultivées dans 9,5 ml de milieu $\text{RN}^{-2\text{C}}$ de pH 7,2 et 5,9 complétés par les additifs suivants :

- 0,5 ml d'une solution de fructose à 20 %.
- 0,25 ml de 2-désoxy-adénosine (Merck) de concentration 10 mg/ml.
- 0,1 ml de thymidine 6 - H (C.E.A. : activité spécifique : 26 ci/mM) correspondant à 10 μci de produit marqué.

Le produit radioactif est ajouté stérilement.

2 - Dosage.

A différents temps, on prélève 0,5 ml du milieu auquel on ajoute 5 ml d'acide trichloracétique à 10 % refroidi à + 4° C. Le tout est filtré sur membrane Sartorius 0,22 μ . Le tube est rincé à l'acide trichloracétique à 5 % froid. Le filtre est séché à l'infrarouge.

La radioactivité est comptée en présence de Lipoluma.

Signalons que les cellules radioactives sont numérotées à chaque prélèvement sur milieu RCG fructose.

D - SYNTHÈSE DES PROTÉINES.

Les cellules, après culture sur milieu minimum RHB₁ fructosé 1 % (RHB₁ : milieu R additionné de 0,01 μ g/ml de biotine (B₁) et 0,5 μ g/ml de thiamine (H)), sont centrifugées et lavées dans du tampon RN^{-2c} pH 7,2, puis centrifugées à nouveau. Le culot est repris dans RN^{-2c} fructosé à 1 %, à différents pH.

Dans des tubes de 20 x 200, on met :

- 8 ml de suspension bactérienne dans du RN^{-2c} fructosé 1 % de pH 7,2 et 6,25.
- 1 ml de mélange d'acides aminés de concentration 100 μ g/ml.
- 1 ml de leucine marquée au tritium de concentration 2.10^7 cpm/ml.

La température d'incubation est de 30° C. Au temps T = 0 (addition du mélange d'acides aminés et de la leucine marquée à la suspension bactérienne) et à différents temps, on ajoute à 0,5 ml de milieu de synthèse, 0,5 ml d'acide trichloracétique de concentration 20 % et préalablement réfrigéré à 4° C.

Après un séjour à 4° C pendant quelques minutes, le mélange réactionnel est filtré sur une membrane Sartorius 0,22 μ . Les tubes et les filtres sont rincés 2 fois à l'acide trichloracétique de concentration 10 % froid. Les filtres sont ensuite séchés.

La radioactivité est comptée en présence de 9 ml de Lipoluma.

IV - ETUDE DE LA PENETRATION DU FRUCTOSE.

Les cellules, après culture sur milieu RC fructosé à 1 % pH 7,2, sont centrifugées. Le culot est lavé par le milieu R^{2C} pH 7,2, centrifugé et repris dans ce même milieu. L'étude de pénétration se fait à 30° C sans agitation.

Dans un tube de 20 x 160 on met :

- 0,375 ml d'une solution de fructose de concentration 90 mM.
- 0,375 ml de fructose radioactif (D-fructose ^{14}C -U ; C.E.A. ; activité spécifique : 238 m Ci/mM) de concentration finale 3,6 Ci/ml soit environ $0,72 \cdot 10^7$ cpm/ml).
- 6 ml d'une suspension bactérienne dans du R^{2C} contenant $84 \cdot 10^7$ bactéries par ml.

On prélève à différents temps 0,5 ml que l'on filtre sur membrane Sartorius 0,22 μ et on lave à l'acide trichloracétique de concentration 5 % froid, puis on rince le filtre à l'éthanol. Le filtre est séché.

La radioactivité est comptée avec 9 ml de Lipoluma.

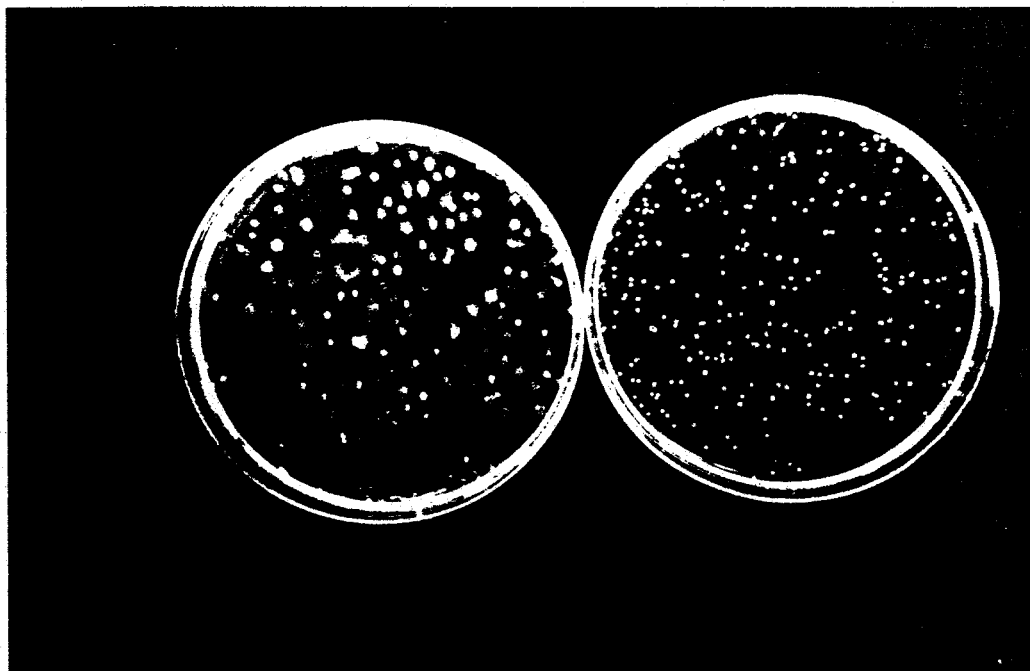
RESULTATS ET DISCUSSION.

I - MORPHOLOGIE DES SOUCHES

L'observation au microscope optique montre que les cellules de la souche M_9S semblent être plus grandes que celles de la souche $M_9Sm_1^{Str}$. Par contre, les colonies de cette dernière sont plus muqueuses.

* Photographies 1 et 2.

- Etalement en double couche sur milieu RCG fructosé à 1 % après 5 jours d'incubation à 30° C.
- Photographie montrant les souches de Rhizobium meliloti M_9S et $M_9Sm_1^{Str}$
 - 1 - souche sauvage M_9S
 - 2 - souche mutante $M_9Sm_1^{Str}$.



$M_9Sm_1^{Str}$

M_9S

II - ETUDE DU TEMPS DE GENERATION.

C'est dans les organismes en cours de développement que la biosynthèse du matériel cellulaire se manifeste de la façon la plus évidente.

Le matériel cellulaire nouvellement synthétisé est entièrement construit à partir du sucre, des sels d'ammonium, des acides aminés et des substances minérales présents dans le milieu nutritif. Ainsi c'est leur aptitude à se multiplier rapidement qui permet aux bactéries de survivre.

Le travail de biosynthèse ne consiste pas seulement à construire des molécules complexes (protéines, polysides, lipides...) à partir des précurseurs simples, mais aussi à assembler tous ces composants pour former les structures cellulaires.

La vitesse de renouvellement métabolique des composants cellulaires varie d'une cellule à l'autre et d'un milieu à un autre.

Dans cette expérience, nous avons comparé le temps de génération des souches de Rhizobium meliloti M₉S et M₉Sm₁^{Str} dans différents milieux à différents pH.

Les cellules, après préculture sur milieu RC fructosé à 1 % pH 7,2 sont centrifugées. Le culot, remis en suspension dans du milieu R, est lavé par une nouvelle centrifugation pour être repris dans le milieu de culture. Nous avons utilisé trois types de milieux : TY, RC fructosé à 1 % et R fructosé à 1 %.

La culture se fait dans une fiole d'Erlenmeyer de 300 ml contenant 100 ml de milieu et à la température de 30° C sur une table d'agitation rotative.

La croissance est suivie par numération des cellules viables en utilisant la technique à double couche sur milieu RCG fructosé.

Nous avons inoculé au départ 200 à 2000 bactéries par ml dans le milieu de culture.

Le temps de génération (T) est calculé suivant la formule :

$$T = \frac{(T_2 - T_1) \log 2}{\log N_2 - \log N_1}$$

tels que : $\log N_2$: logarithme du nombre de bactéries au temps T_2

$\log N_1$: logarithme du nombre de bactéries au temps T_1

$$N_2 > N_1$$

Le tableau suivant donne les résultats de l'étude du temps de génération.

Milieux de culture	pH du milieu de culture	M_9S		$M_9Sm_1^{Str}$	
		0 $\mu g/ml$ de dihydrostreptomycine	400 $\mu g/ml$ de dihydrostreptomycine	0 $\mu g/ml$ de dihydrostreptomycine	400 $\mu g/ml$ de dihydrostreptomycine
TY	7,0	1,43	1,7	1,7	
	7,0	1,7	2,56	2,26	
	6,7	2,11		3,96	
	6,3	2,8		5,28	
R C fructose	5,9	(10,36)		10,36	
	5,7	-		(10,36)	
	5,4	-		-	
R fructose	7,0	2,6	4,72	4,8	

Tableau 15 : Temps de génération (en heures) des souches de Rhizobium meliloti M_9S et $M_9Sm_1^{Str}$ sur milieux TY, RC fructosé et R fructosé sans ou avec 400 $\mu g/ml$ de dihydrostreptomycine.

Légende du tableau 15 : / - : le nombre de cellules/ml diminue après 24 heures de croissance (pas de croissance).
+ : le nombre de cellules/ml augmente faiblement après 24 heures de croissance (croissance très faible).
: le temps de génération est supérieure à 10,36 heures.

D'après le tableau 15, nous constatons que la souche M_9S donne de meilleurs résultats que $M_9Sm_1^{Str}$ sur ces différents milieux à pH neutre. Cette dernière a un temps de génération environ 2 fois plus grand sur R fructose pH 7 et supérieur sur les autres milieux à pH neutre (TY et RC fructose avec ou sans dihydrostreptomycine) que M_9S .

Aux pH 6,7 et 6,3, les temps de génération de M_9S sont meilleurs sur RC fructosé que ceux de $M_9Sm_1^{Str}$. Par contre à pH 5,9, nous assistons à un phénomène inverse à savoir que la souche M_9S a un temps de génération plus grand que celui de $M_9Sm_1^{Str}$ qui est de 10,36 heures. A ce pH, on assiste à une très faible croissance de M_9S .

Le pH 5,7 permet encore la croissance de la souche $M_9Sm_1^{Str}$ alors que la souche M_9S ne se développe plus.

Dans cette expérience, les différents milieux de culture sont inoculés faiblement (10^2 à 10^3 bactéries par ml). Ceci diminue fortement :

- d'une part le risque de changement du pH du milieu de culture dû à la lyse des bactéries plus ou moins déficientes.
- d'autre part, l'apparition des mutants spontanés aux pH acides qui est de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} pour la souche M_9S sur milieu RC gélosé fructosé pH 5,55.

La souche $M_9Sm_1^{Str}$, malgré une vitesse de reproduction faible jusqu'à pH 6,3, a son pH limite acido-tolérant de croissance meilleur que la souche sauvage. Elle accepte mieux l'acidité du milieu. Il semble donc que les mutagenèses et les différentes méthodes d'isolement agissent soit sur les systèmes de perméabilité, soit sur une ou plusieurs enzymes ayant une fonction dans la croissance.

Il importe alors de compléter ces résultats obtenus avant d'étudier la synthèse des macromolécules par une étude rapide du pH limite de croissance à forte inoculation. Celle-ci permet de voir, si dans de telles conditions, du fait de la lyse importante des bactéries aux pH plus acides, le pH limite de la croissance de la souche $M_9Sm_1^{Str}$ est inférieur à celui de M_9S .

III - CROISSANCE LIMITE A FORTE INOCULATION.

Les souches M_9S et $M_9Sm_1^{Str}$, après culture sur RC fructosé, sont centrifugées. Le culot, repris et lavé en le mettant en suspension dans le milieu R, est à nouveau centrifugé, puis repris dans différents tubes contenant 10 ml de RC fructosé à 1 %, à différents pH.

L'inoculum du départ est de l'ordre de $1,3.10^7$ cellules par ml pour tous les tubes.

	M_9S						$M_9Sm_1^{Str}$					
Temps (jours)	0	2	4	6	11		0	2	4	6	11	
pH milieu	7,35	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	6,7	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	6,3	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	5,85	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	5,65	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	5,35	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	5,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 16 : Détermination du pH limite de croissance de Rhizobium meliloti M_9S et $M_9Sm_1^{Str}$ pour un inoculum de $1,3.10^7$ bactéries par ml.

Légende du tableau 16 : $\left\{ \begin{array}{l} + : \text{culture dense et supérieure à l'inoculum.} \\ \pm : \text{croissance des bactéries (croissance à} \\ \text{pH 5,85 de la souche } M_9S \text{ est identique à} \\ \text{celle de } M_9Sm_1^{Str} \text{ pH 5,35).} \\ - : \text{croissance peu différente du temps } T = 0. \end{array} \right.$

Le tableau 16 confirme le résultat trouvé dans le premier chapitre concernant la limite de pH de la souche $M_9Sm_1^{Str}$ qui est de 5,35. La souche M_9S a un pH limite approximatif de croissance 5,85. A ce pH, nous observons une densité de culture équivalente à celle de $M_9Sm_1^{Str}$ à pH 5,35 et supérieure à la densité optique d'environ 0,01 de l'inoculum.

Ces résultats diffèrent de ceux obtenus au tableau 15. Ceci est dû à la forte inoculation du départ. Il semble donc qu'effectivement un enrichissement du milieu de culture, dû soit à la lyse des bactéries plus ou moins déficientes, rendant le pH favorable à la croissance, soit à une présence importante de mutants spontanés, a favorisé la prolifération de ces germes.

Par contre, cette expérience confirme la meilleure tolérance acide de la souche $M_9Sm_1^{Str}$ par rapport à la souche M_9S .

IV - SYNTHÈSE DES MACROMOLÉCULES.

A - SYNTHÈSE DES EXOPOLYOSIDES.

1 - Synthèse.

Elle se fait dans des milieux non proliférants (RN^{-2c}) de pH 7,2 et 5,9 : l'absence de source d'azote dans ces milieux ne permet pas aux R. meliloti $M_9Sm_1^{Str}$ et M_9S de se diviser. Le milieu réactionnel contient $1,6.10^8$ et $7,2.10^8$ bactéries par ml pour les pH respectifs 7,2 et 5,9.

La synthèse des polysides est suivie par :

- l'accumulation de la radioactivité intracellulaire.
- la quantité de polysides synthétisés.
- la mesure des oses résiduels radioactifs.

a - Milieu de synthèse pH 7,2.

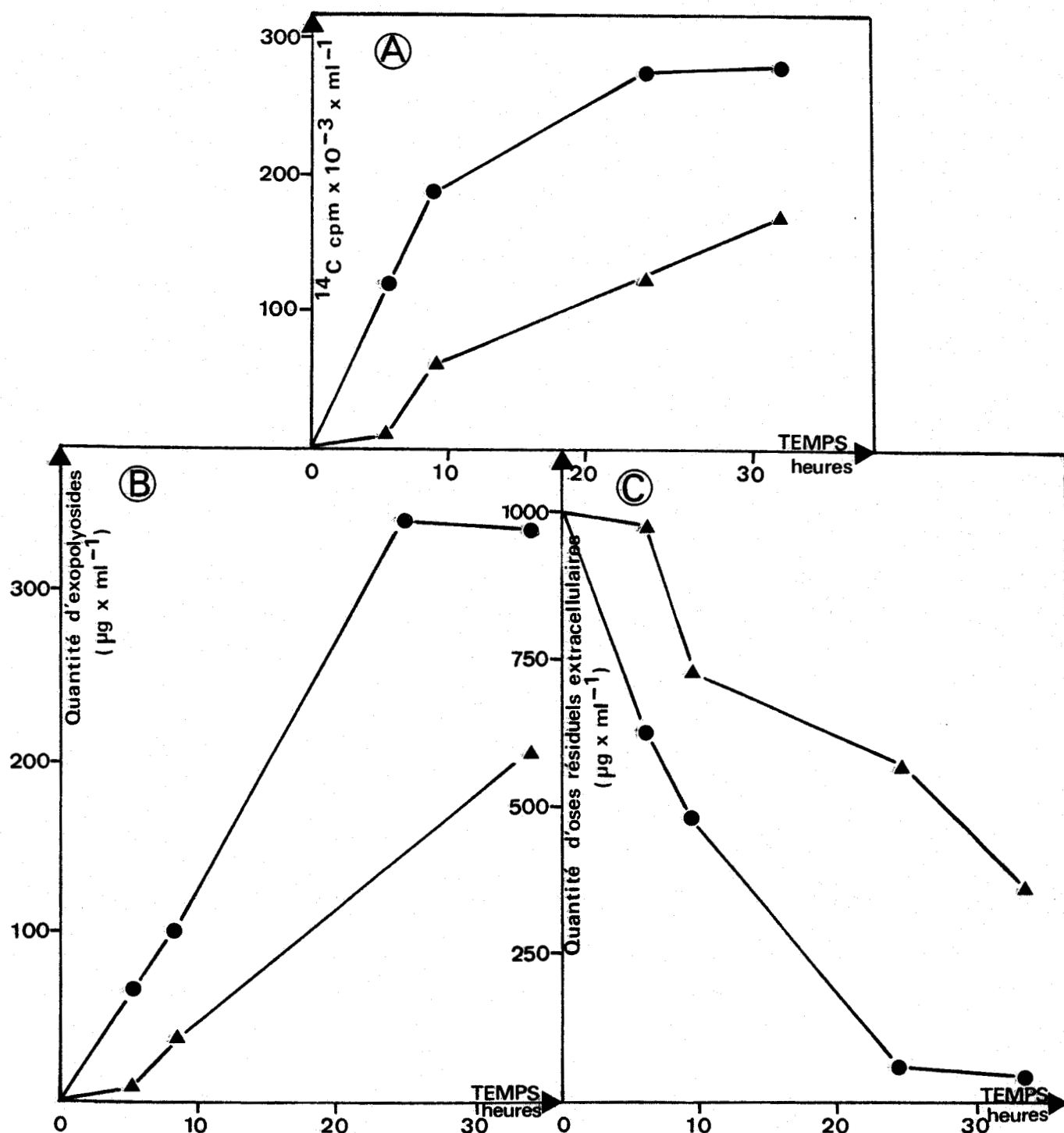


Figure 15 : Cinétique d'accumulation de la radioactivité intracellulaire (A), production d'exopolysides (B) et des oses résiduels extracellulaires (C) des souches de *Rhizobium meliloti* M₉S (●—●) et M₉Sm₁^{Str} (▲—▲) en milieu RN^{-2C} fructosé à 1 ‰ de pH 7,2 (les résultats (B) et (C) sont exprimés respectivement en $\mu\text{g/ml}$ d'exopolysides synthétisés et d'oses résiduels extracellulaires calculés à partir de la radioactivité spécifique initiale du fructose).

BUS
LILLE

Les courbes de la figure 15 nous montrent que le bilan du fonctionnement du système enzymatique de synthèse d'exopolyosides de la souche R. meliloti $M_9Sm_1^{Str}$ est moins important que celui de M_9S .

La quantité d'exopolyosides synthétisés au cours du temps d'après la figure 15 (B) par M_9S est supérieure à celle de $M_9Sm_1^{Str}$ et atteint son maximum au bout de 22 heures de synthèse. D'autre part, la souche $M_9Sm_1^{Str}$ continue à synthétiser des exopolyosides après 31 heures.

De plus, d'après la figure 15 (A), nous constatons qu'au cours de la synthèse, l'accumulation de la radioactivité à l'intérieur des cellules de la souche M_9S est plus importante que celle de la mutante $M_9Sm_1^{Str}$.

La quantité d'oses résiduels dans le milieu extracellulaire d'après la figure 15 (C) confirme ce "ralentissement" du fonctionnement du système enzymatique de synthèse d'exopolyosides de $M_9Sm_1^{Str}$. Elle est plus grande pour le mutant $M_9Sm_1^{Str}$ à différents temps de synthèse d'exopolyosides que celle de M_9S . Cette dernière souche utilise beaucoup le substrat carboné fructose pour sa biosynthèse. Après 22 heures, la synthèse d'exopolyosides s'arrête, la quantité d'oses résiduels extracellulaires se stabilise, ce qui n'est pas le cas chez la souche $M_9Sm_1^{Str}$.

b. - Milieu de synthèse pH 5,9.

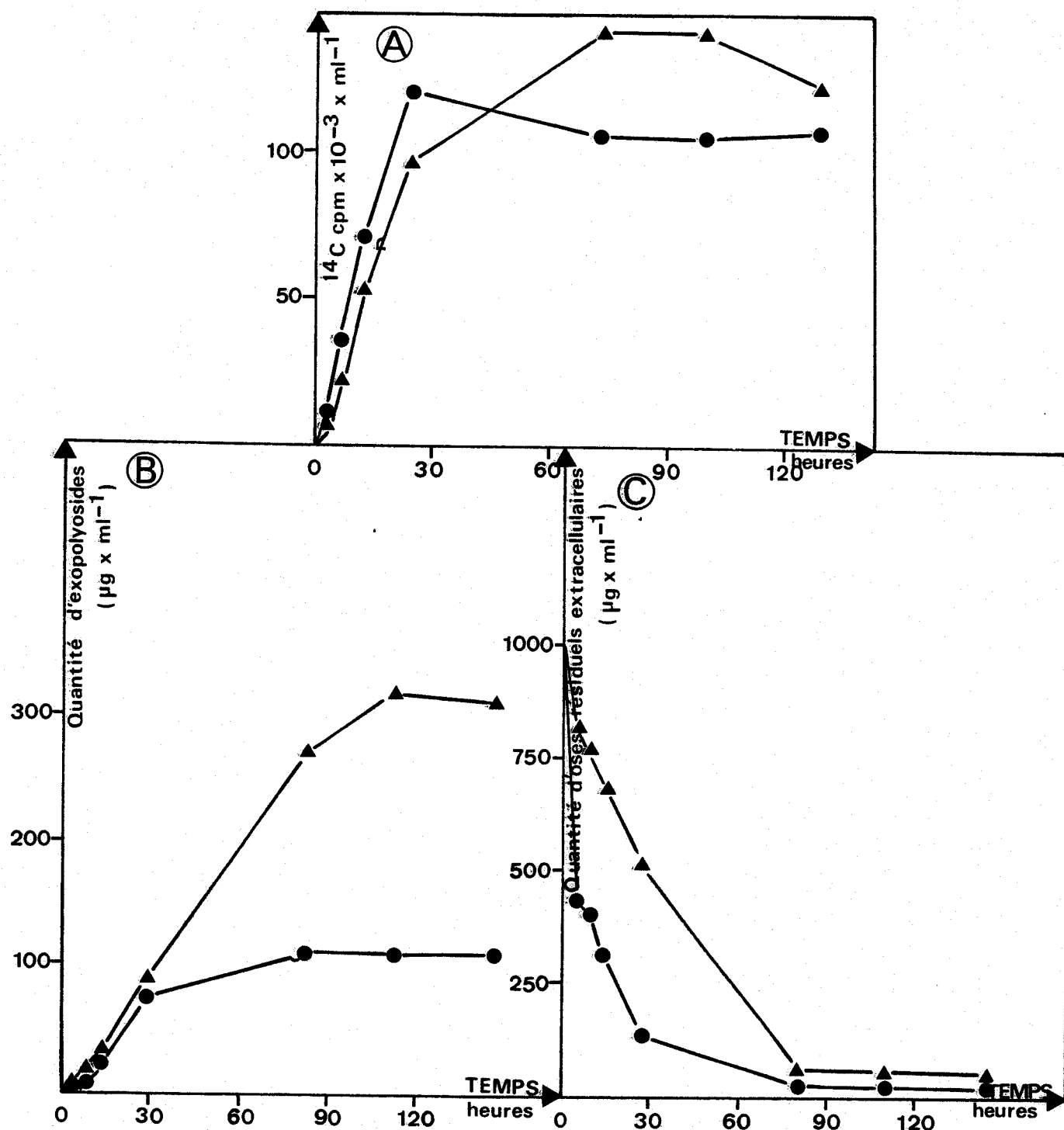


Figure 16 : Cinétique d'accumulation de la radioactivité intracellulaire

(A), production d'exopolysides (B) et des oses résiduels extracellulaires (C) des souches de *Rhizobium meliloti* M₉S (●—●) et M₉Sm₁^{Str} (▲—▲) en milieu RN^{-2c} fructose à 1 ‰ pH 5,9. (les résultats d'exopolysides et les oses résiduels sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'exopolysides synthétisés et d'oses résiduels extracellulaires calculés à partir de la radioactivité spécifique initiale du fructose.

RHS
LILLE

En milieu non prolifération (RN^{-2c}) de pH 5,9, les résultats rapportés dans les courbes de la figure 16 (A, B et C) montrent que la souche de R. meliloti $M_9Sm_1^{Str}$ a une vitesse de fonctionnement du système enzymatique de polyosides presque égale à celle de M_9S . Cette dernière souche semble très affectée par l'acidité du milieu.

La quantité d'exopolyosides synthétisés, montrée par la figure 16 (B) au cours du temps, est identique pour les deux Rhizobium durant les premières 24 heures, alors qu'elle est nettement supérieure à pH 7,2. De plus, la souche $M_9Sm_1^{Str}$ continue à synthétiser des exopolyosides jusqu'à 98 heures, alors que la souche sauvage s'arrête après 30 heures. Pour une même concentration finale de fructose dans le milieu réactionnel, la souche $M_9Sm_1^{Str}$ synthétise plus d'exopolyosides que la souche M_9S .

La radioactivité intracellulaire mesurée (figure 16 (A)) est semblable pour les deux Rhizobium jusqu'à 24 heures. Elle continue à augmenter et se stabilise à partir de 72 heures pour la souche $M_9Sm_1^{Str}$ alors que pour la souche M_9S un plateau est atteint au bout de 24 heures.

c.- Discussion.

Les expériences réalisées sur la synthèse d'exopolyosides en milieux non proliférants (RN^{-2c}) nous amènent aux constatations suivantes :

La souche M_9S a un métabolisme plus actif que la souche mutante $M_9Sm_1^{Str}$ à pH neutre. Cette dernière souche a une vitesse de synthèse d'exopolyosides plus faible que la souche M_9S . Ce résultat reflète ceux du temps de génération, à savoir une croissance meilleure pour la souche sauvage M_9S .

A pH acide, nous assistons à une diminution d'activité du système enzymatique de synthèse d'exopolyosides des deux R. meliloti par rapport à pH 7,2. La synthèse des exopolyosides à pH acide est bloquée partiellement (même résultat que COURTOIS (17)).

Ces faits suggèrent que la souche de Rhizobium meliloti $M_9Sm_1^{Str}$ lors des mutagenèses successives et lors de son isolement, a subi une mutation rendant acido-résistante la synthèse de polyosides normalement acido-sensibles. Le fait qu'il y ait une très grande différence de l'activité du complexe enzymatique des deux souches M_9S et $M_9Sm_1^{Str}$ amène à penser une différence dans l'utilisation du fructose qui pourrait être due à un défaut de perméabilité à ce sucre chez le mutant.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier la perméabilité au fructose des deux souches dans le milieu complet R deux fois concentré en phosphate (milieu pourvu d'azote permettant la croissance bactérienne) à pH 7,2.

2 - Perméabilité au fructose.

L'étude cinétique de la perméabilité concerne en fait la rétention de ce substrat carboné par les cellules de R. meliloti M_9S et $M_9Sm_1^{Str}$ en fonction du temps. La technique est décrite dans la partie "matériel et méthodes".

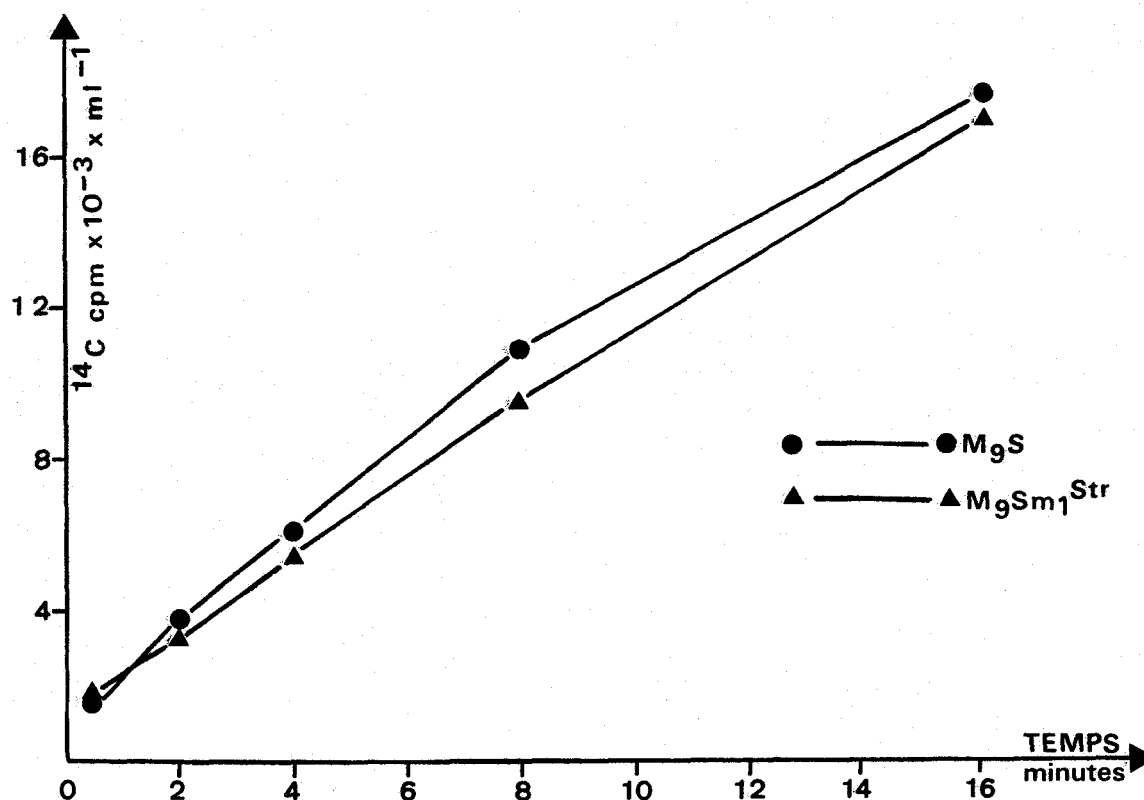


Figure 17 : Perméabilité au fructose des souches de Rhizobium meliloti M_9S et $M_9Sm_1^{Str}$ dans le milieu R^{2c} .

D'après cette expérience montrée par la figure 17, nous constatons que les courbes d'incorporation obtenues sont très similaires et montrent que la pénétration de fructose est régulière et très progressive pour les deux souches de Rhizobium.

Il semble donc que la mutation, rendant acido-résistante la synthèse de polysides et provoquant une diminution de son activité à pH 7,2 de la souche $M_9Sm_1^{Str}$, n'a pas de corrélation avec la perméabilité au fructose. L'incorporation de fructose radioactif est la même dans les deux souches. Il s'établit un équilibre entre la concentration interne des cellules et celle du milieu extérieur en fructose à différents temps du métabolisme.

B - INCORPORATION DE LA LEUCINE RADIOACTIVE.

Les milieux d'incorporation de pH 7,2 et 6,25 contiennent chacun un inoculum de 50.10^7 cellules par ml.

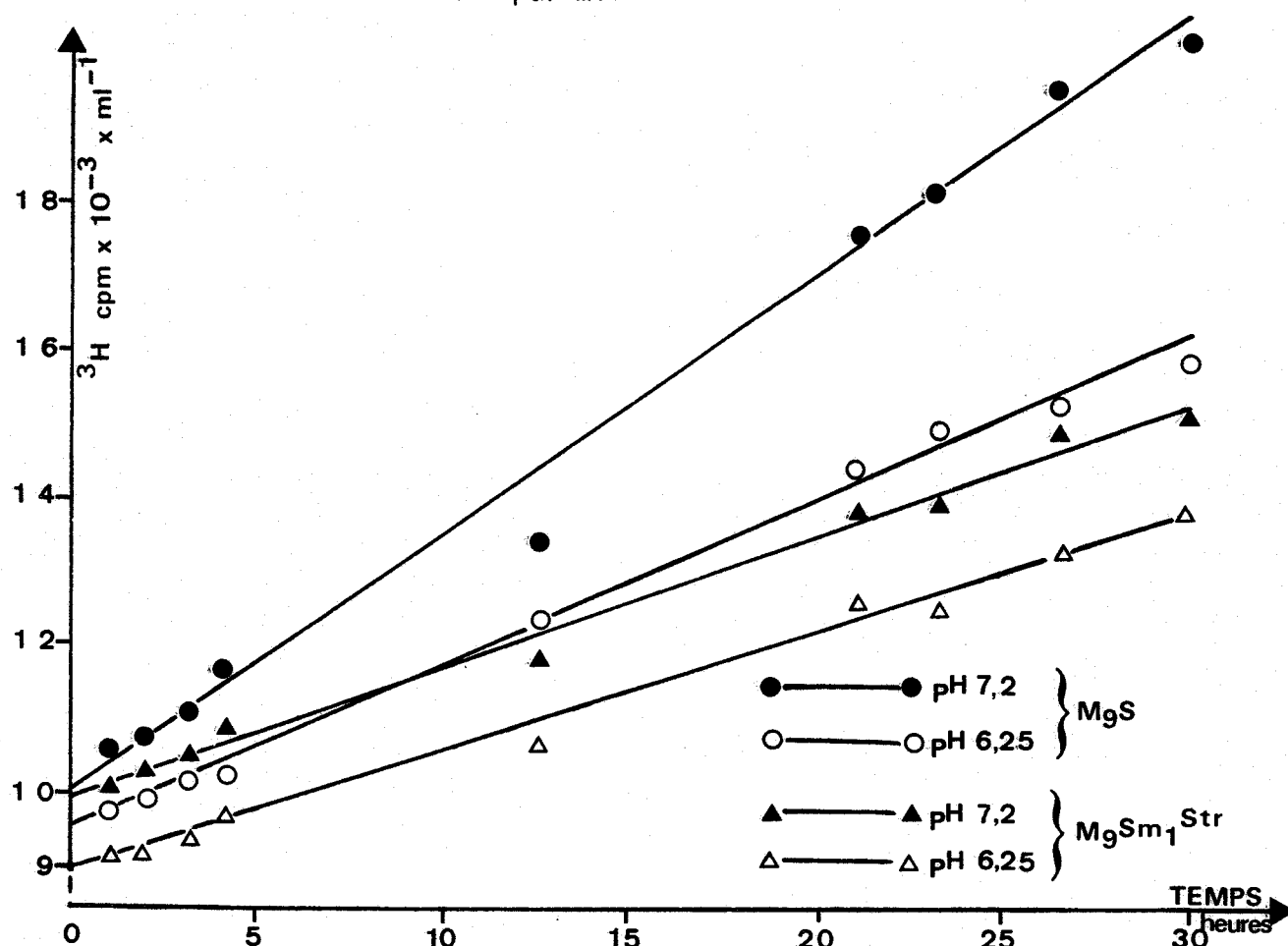


Figure 18 : Cinétique d'incorporation de la leucine radioactive dans les milieux RN^{2C} fructosés 1 % de pH 7,2 et de pH 6,25 des souches de Rhizobium meliloti M_9S et $M_9Sm_1^{Str}$.

Nous constatons d'après la figure 18 une incorporation de la leucine radioactive plus importante chez la souche M_9S que chez $M_9Sm_1^{Str}$ pour les deux pH étudiés. Ce résultat confirme aussi que la croissance et la synthèse d'exopolysides sont meilleures pour les pH voisins de la neutralité. Les pentes des droites correspondant aux pH 7,2 et 6,25 sont différentes pour la souche M_9S : elles diminuent au fur et à mesure que le pH devient acide. Pour $M_9Sm_1^{Str}$, ce phénomène n'est pas aussi évident du fait que les pentes à pH 7,2 et 6,25 sont du même ordre de grandeur.

Enfin la souche M_9S semble être plus sensible à l'acidité du milieu que la souche $M_9Sm_1^{Str}$.

Pour compléter cette étude, nous avons étudié cette différence du comportement métabolique au niveau de la production d'adénosine triphosphate (ATP).

C - PRODUCTION D'ATP AU COURS DE LA CROISSANCE CELLULAIRE*

La principale source d'énergie des cellules aérobies est la respiration, ou l'oxydation enzymatique des molécules nutritives par l'oxygène moléculaire. Les principaux composants chimiques de la structure cellulaire sont construits enzymatiquement à partir de précurseurs simples grâce à l'énergie apportée par l'A.T.P.

Pour cette étude expérimentale, les cellules sont précultivées dans le milieu RC fructosé 1 % ; elles sont ensuite centrifugées, lavées dans le milieu RC^{-2C} pH 7,2, puis centrifugées à nouveau. Le culot est remis en suspension dans du milieu RN^{-2C} pH 7,2. A 10 ml de milieu RC fructosé pH 7,2 est additionné 1 ml de cette suspension bactérienne. L'incubation se fait dans un bain-marie agité à 37° C. A différents temps : 2, 24 et 48 heures, on prélève 0,1 ml pour doser l'ATP produit au cours de la croissance.

Les résultats sont exprimés en picogramme d'ATP par ml. L'inoculum initial est de 2.10^8 bactéries par ml.

* Cette expérience a été réalisée au laboratoire bactériologie (Faculté de Médecine) par Mme NARCOLIN. Nous la remercions aimablement de sa collaboration.

Souches	Temps en heures		
	2	24	48
M ₉ S	296 000	639 205	502 500
M ₉ Sm ₁ ^{Str}	365 625	417 614	522 143

Tableau 17 : Production d'ATP des souches de Rhizobium meliloti M₉S et M₉Sm₁^{Str} dans le milieu RC fructose 1 % pH 7,2 à 37° C en agitation.

Malgré une différence de production d'ATP au bout de deux heures, due probablement à une quantité plus faible d'inoculum de départ, la souche M₉S au bout de 24 heures présente une production supérieure à celle de M₉Sm₁^{Str}. En effet, pour assurer un meilleur fonctionnement métabolique, la souche M₉S fournit beaucoup plus d'énergie ; au bout de 48 heures la production d'ATP décroît du fait de l'établissement de la phase stationnaire et de la phase de déclin. Par contre, la souche M₉Sm₁^{Str} continue à produire de l'ATP parce qu'elle présente un retard de croissance.

Ce résultat permet de confirmer que la synthèse d'exopolysides, l'incorporation de la leucine et la croissance sont meilleures à pH voisin de la neutralité pour la souche M₉S que pour la souche M₉Sm₁^{Str}.

D - INCORPORATION DE LA THYMIDINE DANS L'ADN.

1 - Incorporation.

L'expérience a été réalisée à partir d'un inoculum de 2.10^7 bactéries par ml.

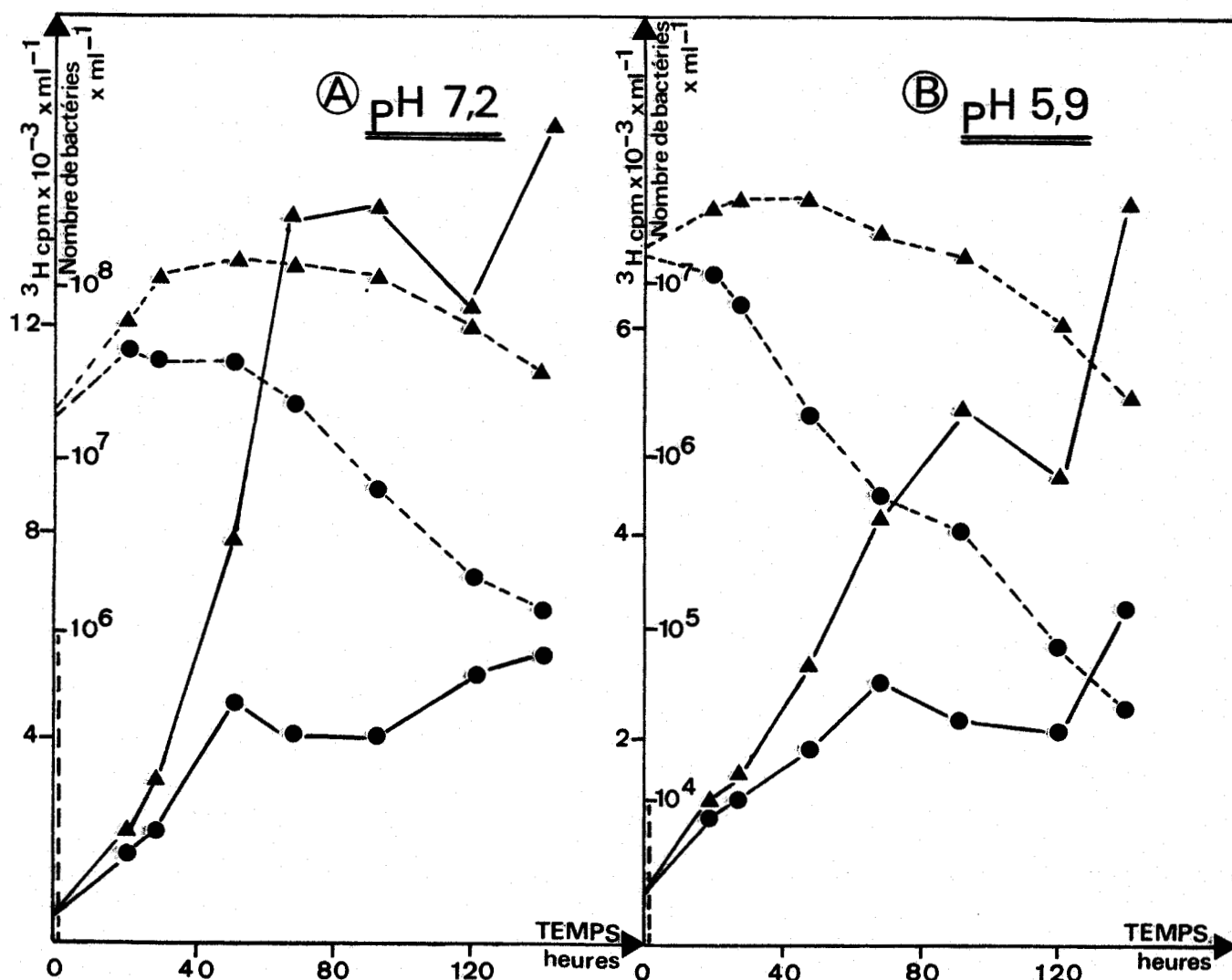


Figure 19 : Cinétique d'incorporation de la thymidine radioactive (dans le milieu RN^{-2c}) des souches *Rhizobium meliloti* M_0S (●) et $M_0Sm_1^{Str}$ (▲) : (en trait plein) accumulation de la radioactivité et (en pointillés) nombre de cellules par ml.

Les résultats obtenus d'après la figure 19 (A et B) indiquent qu'à pH 5,9 (figure 19, B), l'incorporation de la thymidine par les deux souches est deux fois plus faible qu'à pH 7,2 (figure 19, A). L'acidité affecte l'incorporation de la thymidine tritiée.

De plus, à fort inoculum de départ, la souche $M_9Sm_1^{Str}$ pour les deux pH de milieu d'incorporation (dont la source d'azote est apportée par la 2'-déoxy-adénosine et la thymidine marquée) a un rendement en "ADN synthétisée" supérieur à celui de M_9S . Ceci est surprenant car ce résultat diverge de ceux obtenus précédemment qui montraient qu'à pH 7,2 la croissance et la biosynthèse de la souche M_9S étaient plus importantes que celles de la souche mutante $M_9Sm_1^{Str}$. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le nombre de bactéries viables dans le milieu d'incorporation au cours du temps. En effet, d'après la figure 19 (A), pour une même quantité d'inoculum de départ, le nombre de bactéries viables dans le milieu au cours du temps est supérieur pour la souche $M_9Sm_1^{Str}$. Cette dernière souche semble mieux adaptée au milieu que la souche M_9S . De plus, à pH 5,9 (figure 19 B), la souche $M_9Sm_1^{Str}$ continue à se développer jusqu'à 30 heures, alors qu'il y a directement lyse pour M_9S , ce qui s'accroît au cours du temps.

Nous avons donc exprimé les résultats de l'incorporation de la thymidine trouvés sur la figure 19 par rapport au nombre de bactéries viables dans le milieu.

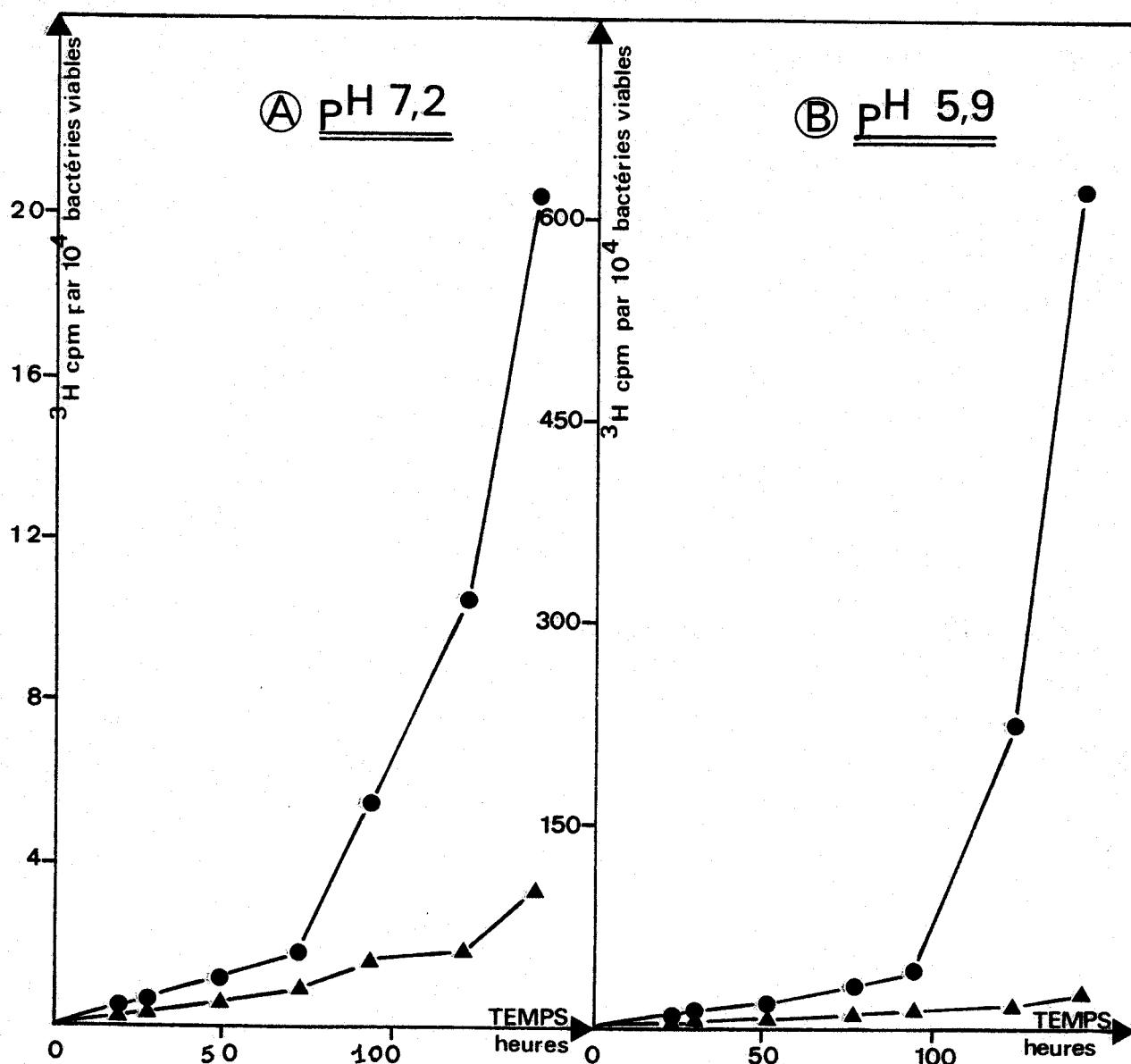


Figure 20 : Cinétique d'incorporation de la thymidine marquée dans l'ADN (en milieu $\text{RN}^{-2\text{C}}$) des souches de *Rhizobium meliloti* M₉S (●) et M₉Sm₁^{Str} (▲) rapportée en fonction du nombre de bactéries viables.

La figure 20 montre qu'en ramenant au nombre de bactéries viables l'incorporation de la thymidine est bien supérieure pour la souche M₉S.

Ce phénomène nous amène à reprendre notre analyse en réalisant l'expérience dans les mêmes conditions, mais en partant d'un inoculum initial plus faible.

2 - Etude de l'influence de la 2'-déoxy-adénosine et de la thymidine sur la croissance.

Cette expérience permet de voir l'influence de ces sources d'azote sur la croissance bactérienne. Elle est réalisée pour les deux souches étudiées : M_9S et $M_9Sm_1^{Str}$.

Pour préparer les inoculums, les cellules cultivées dans le milieu RC fructosé pH 7,2 sont centrifugées. Le culot, remis en suspension dans du milieu RN^{-2c} , est lavé par une nouvelle centrifugation pour être repris dans le milieu de culture.

La culture se fait dans le milieu RN^{-2c} pH 7,2. La 2'-déoxy-adénosine et la thymidine (non radioactives) sont ajoutées à raison de 250 $\mu g/ml$, la concentration finale de fructose est de 1 %.

L'inoculum de départ est de l'ordre de $1,65.10^3$ bactéries/ml pour les deux souches.

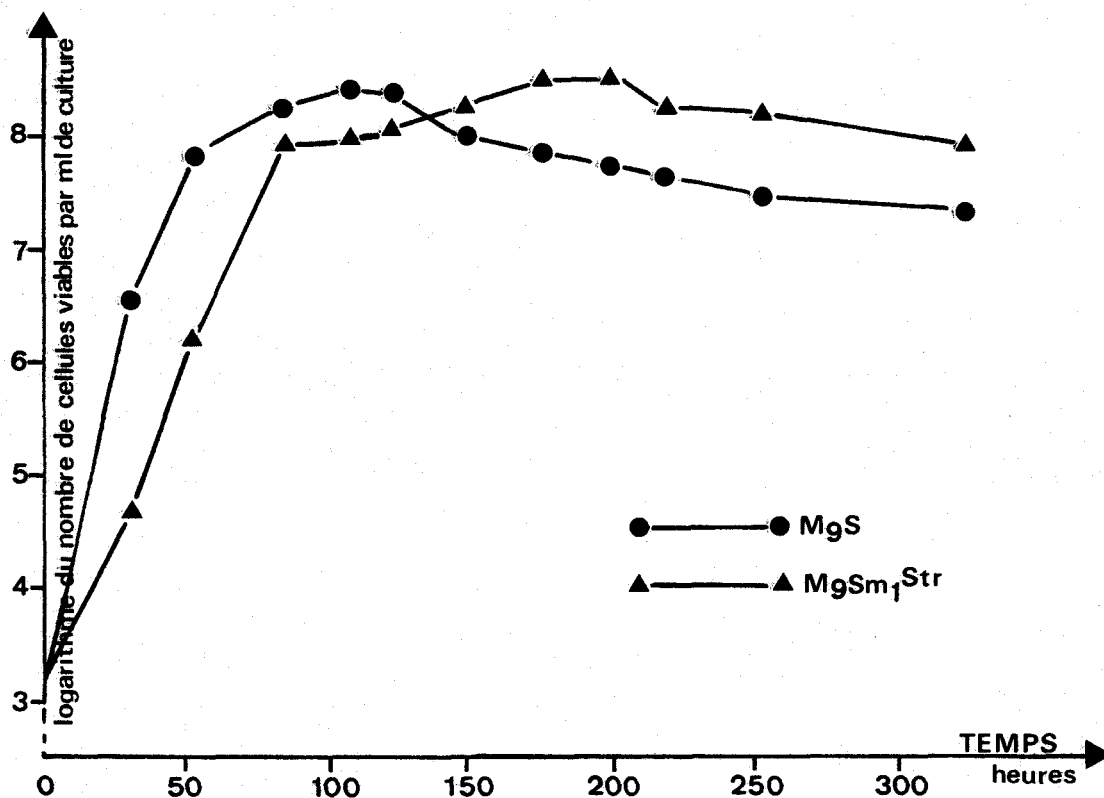


Figure 21 : Croissance des souches de *Rhizobium meliloti* M_9S et $M_9Sm_1^{Str}$ sur milieu RN^{-2c} pH 7,2 fructosé 1 % ayant comme source d'azote la 2'-déoxy-adénosine et la thymidine à raison de 250 $\mu g/ml$.

D'après la figure 21, la croissance de la souche M_9S est meilleure que celle de $M_9Sm_1^{Str}$. Ces deux Rhizobium ont des temps de génération respectifs de 2,62 et 3,88 heures. La phase stationnaire se situe entre 100 et 120 heures pour la souche M_9S , et entre 170 et 220 heures pour la $M_9Sm_1^{Str}$; la phase de déclin de cette dernière survient beaucoup plus tardivement que celle de M_9S .

Le phénomène qui fait que la souche $M_9Sm_1^{Str}$ incorpore plus de thymidine (à pH 7,2) que M_9S peut donc s'expliquer comme suit : d'une part il y a un nombre supérieur de bactéries viables dans le milieu de synthèse au cours du temps et d'autre part on a affaire à une forte inoculation initiale.

Le temps de génération de la souche $M_9Sm_1^{Str}$ sur nitrate d'ammonium (NO_3NH_4) comme source d'azote est de l'ordre de 4,8 heures, alors qu'avec la 2'-déoxy-adénosine additionnée de thymidine il n'est que de 3,88 heures. Par contre, pour la souche M_9S , on constate des temps de génération presque identiques que ce soit en présence de $NO_3 NH_4$ ou en présence de 2'-déoxy-adénosine et de thymidine.

Il est intéressant de compléter les essais précédents par une étude comparative de la croissance des souches M_9S et $M_9Sm_1^{Str}$ sur les milieux R^{2c} (milieu R 2 fois concentré en phosphate) et RN^{-2c} , avec des sources de carbone et d'azote différentes.

3 - Etude comparative de la croissance.

Les cultures sont inoculées à partir d'une préculture lavée par centrifugation et reprise dans du milieu RN^{-2c} .

L'inoculation du départ est de l'ordre de 10^3 bactéries par ml. Les sources de carbone (fructose ou succinate ou glutamate) sont utilisées à la concentration finale de 1 %. La 2'-déoxy-adénosine et la thymidine sont employées à 250 $\mu g/ml$.

SOUCHES	M ₉ S		M ₉ Sm ₁ ^{Str}	
Temps (heures)	144	192	144	192
Milieux de culture				
: R ^{2c} +fructose	: 1,05	: 1,23	: 0,45	: 0,76
: RN ^{-2c} +fructose	: 0	: 0	: 0	: 0
: R ^{2c} +fructose+2'-déoxy-adénosine	: 1,17	: 1,34	: 0,65	: 1,05
: RN ^{-2c} +fructose+2'-déoxy-adénosine	: 0,52	: 0,78	: 0,32	: 0,82
: RN ^{-2c} +fructose+thymidine+ 2'-déoxy-adénosine	: 0,95	: 1,19	: 0,64	: 1,27
: R ^{2c} +succinate	: 0,51	: 0,58	: 0,14	: 0,22
: RN ^{-2c} +succinate	: 0	: 0	: 0	: 0
: R ^{2c} +glutamate	: 0,36	: 0,47	: 0,3	: 0,36
: RN ^{-2c} +	: 0,56	: 0,69	: 0,26	: 0,24
:	:	:	:	:

Tableau 18 : Densités optiques des cultures de Rhizobium meliloti M₉S et M₉Sm₁^{Str} en présence de différentes sources de carbone et d'azote.

Les cultures obtenues après 144 et 192 heures d'incubation donnent les résultats rapportés dans le tableau 18. La croissance de la souche M₉S est analogue dans les milieux contenant du fructose, que la source d'azote soit de nitrate ou de la 2'-déoxy-adénosine additionnée ou non de la thymidine.

Par contre, pour la souche M₉Sm₁^{Str}, l'addition de 2'-déoxy-adénosine avec ou sans thymidine amène une augmentation importante de la croissance par rapport au milieu R^{2c} fructosé.

Dans une autre expérience, les calculs des temps de génération sur milieu R^{2c} fructosé additionné de la thymidine et de 2'-déoxy-adénosine (concentration finale 250 $\mu\text{g/ml}$) avec les souches M_9S et $M_9Sm_1^{Str}$ ont donné les valeurs respectives suivantes : 2,44 et 3,44 heures. Ainsi, la croissance de la souche $M_9Sm_1^{Str}$ est améliorée sur ces composés par rapport au milieu R contenant de nitrate (temps de génération : 4,8 heures) mais n'atteint pas celle de la souche sauvage M_9S (temps de génération : 2,6 heures).

V - DISCUSSION ET CONCLUSION

	Taux de croissance sur milieu RC fructose 1 %	μ = temps de génération	Exopolysides synthétisés ($\mu\text{g}/10^6$ bactéries)	Incorporation ³ H de la leucine H ($\text{cpm}/10^6$ bactéries)	Contenu en ATP (picogramme par 10^6 bactéries)	Incorporation de la thymidine ³ H dans l'ADN ($\text{cpm}/10^6$ bactéries)	Pénétration du fructose ($\text{cpm}/10^6$ bactéries)		
pH du milieu	7,35	5,95	7,2	5,95	7,2	6,25	7,2		
souches									
M ₉ S	0,588	0,2,03	0,16	40	31,8	3186 (24h) 2512,5 (48h)	2042,9	23,64	
M ₉ Sm ₁ ^{Str}	0,39	0,096	1,24	0,45	29,4	26,9	2088 (24h) 2560,7 (48h)	324,5	23

Tableau 19 : Activités des souches de *Rhizobium meliloti* M_9S et $\text{M}_9\text{Sm}_1^{\text{Str}}$.

Les valeurs des diverses activités précédemment obtenues sont rapportées dans le tableau 19. Le rapport des activités à pH neutre et à pH acide pour chacune des souches est différent : il est nettement plus élevé pour la souche sauvage M_9S : le rapport du taux de croissance tend vers l'infini ; celui de la synthèse des exopolyosides est de 12,84 et celui correspondant à l'incorporation de la leucine tritiée est de 1,25. Par contre pour le mutant $\text{M}_9\text{Sm}_1^{\text{Str}}$, les rapports sont respectivement : 4,06 ; 2,75 et 1,09. Ces résultats reflètent la propriété nouvelle du mutant $\text{M}_9\text{Sm}_1^{\text{Str}}$: à savoir un développement à pH acide nettement meilleur que celui de la souche sauvage M_9S .

En comparant les taux de croissance dans le milieu RC fructose à 1 % de la souche sauvage et du mutant à pH neutre, nous constatons un avantage important (de l'ordre de 1,50 fois plus grand) pour la souche sauvage.

La première raison du développement plus lent du mutant $\text{M}_9\text{Sm}_1^{\text{Str}}$ peut être une mauvaise pénétration des substrats. Nous avons enregistré seulement la pénétration du fructose radioactif et nous avons constaté que le rapport pénétration du fructose chez la souche sauvage sur celle du mutant est voisin

de 1. Il n'existe donc pas de différence à ce niveau. Ainsi, ce résultat indique :

- d'une part qu'il ne s'agit pas de lésions au niveau du système de pénétration du fructose.
- d'autre part la mutation affectant la souche $M_9Sm_1^{Str}$ n'est pas pleiotrophe : en effet, s'il s'agit d'une mutation de ce type, la perméabilité au fructose devrait diminuer.
- enfin, qu'il n'y a pas de lésion sur d'autres systèmes concernant l'entrée de l'ensemble des substrats dans les cellules car les perméases sont spécifiques. Le rapport du taux de croissance de la souche sauvage sur celui de la souche mutante est toujours du même ordre de grandeur quel que soit le milieu de culture. Il est 1,5 pour le milieu RC fructose, 1,2 pour le milieu TY et 1,8 pour R fructose.

Cela ne veut pas dire qu'il n'y ait pas de lésions au niveau d'un autre système perméasique. Cependant ceci est très improbable. En effet, nous constatons que le rapport du taux de croissance de la souche sauvage sur celui de la souche mutante est identique quel que soit le milieu de croissance (minimum ou nutritif).

Une deuxième raison du ralentissement de la croissance à pH neutre du mutant peut provenir d'une difficulté à produire son énergie (ATP) à partir des substrats carbonés habituels. Les contenus en ATP montrent une légère différence au bout de vingt quatre heures, mais elle ne paraît pas être l'élément limitant de la croissance puisque chez le mutant l'ATP est en quantité importante.

Si l'on examine sur le tableau 19 les valeurs concernant le taux de croissance, la synthèse "gratuite" (celle des exopolyosides) et des deux synthèses "obligatoires" (incorporation de la leucine tritiée et de la thymidine tritiée), nous pouvons faire les rapports de l'activité de la souche sauvage sur celle du mutant à pH neutre. Ces rapports sont respectivement : 1,5 pour le taux de croissance, 1,61 pour la synthèse des polyosides, 1,36 pour l'incorporation de la leucine tritiée et 6,3 pour l'incorporation de la thymidine tritiée.

Ces résultats montrent que la synthèse des exopolyosides n'est pas particulièrement inhibée chez le mutant. Cette synthèse correspond à un excès de production d'ATP par la cellule. En effet, la synthèse des exopolyosides est favorisée pratiquement par un rapport concentration en carbone sur concentration en azote élevé dans les milieux. De plus, le mutant $M_9Sm_1^{Str}$ comparé à la souche sauvage synthétise des exopolyosides dans un rapport de valeur presque égale à celle du rapport des taux de croissance. Ceci confirme que le mutant n'a pas de difficulté à réaliser ses réactions énergétiques (voir production d'ATP lors de la croissance). Enfin, le rapport d'incorporation de la leucine tritiée de la souche sauvage sur celle de la mutante à pH neutre est du même ordre de grandeur que celui concernant le taux de croissance. Par contre, celui caractérisant l'incorporation de la thymidine tritiée est élevé (environ 6,3). Cette anomalie constatée permet de suggérer que le facteur limitant la croissance du mutant existe probablement au niveau de la synthèse de l'ADN.



Conclusion Générale

L'utilisation de souches de R. meliloti sélectionnées ayant une capacité élevée de fixer symbiotiquement l'azote avec la luzerne est l'une des conditions à l'établissement de cette culture dans les différents types de sol et en particulier dans les sols acides de BRETAGNE.

Le premier objectif de notre travail a consisté à isoler une (ou plusieurs) souche (s) de R. meliloti acido-tolérante(s), car l'acidité dans les sols est néfaste à la survie et à la multiplication des souches bactériennes sauvages. Le caractère de résistance en milieu acide n'a pas été obtenu par adaptation sur des milieux de plus en plus acides (il dépendrait du potentiel somatique), mais par mutagenèses successives provoquées par la N-méthyl-N'-nitroso-N-nitrosoquandine (NTG) et sélection sur milieu acide de façon à rendre génétiquement stable le caractère acido-résistant. Le mutant $M_9Sm_1^{Str}$ que nous avons isolé à partir de la souche sauvage M_9S est non seulement acido-résistant, mais aussi streptomycino-résistant : cette dernière qualité assure un marquage génétique qui permet non seulement de repérer notre mutant, mais aussi d'éliminer les éventuels contaminants au cours de diverses manipulations.

En présence de glucose, la plupart des souches de R. meliloti acidifient le milieu et inhibent leur propre croissance ; on pouvait penser que notre mutant $M_9Sm_1^{Str}$ était acido-résistant parce qu'il n'acidifie pas : nos résultats expérimentaux montrent qu'il n'est pas ainsi.

Les études du comportement symbiotique du mutant $M_9Sm_1^{Str}$ et des souches sauvages M_9S et $1-5^{Str}$ en milieu synthétique de NICOL et THORNTON à différents pH, dans les terres de BRETAGNE de pH 4,9 ou de pH 5,9 additionnées ou non de supports (sable de FONTAINEBLEAU ou milieu de NICOL et THORNTON) permettent de constater :

- 1° L'acidité affecte la fixation symbiotique soit par une faible multiplication et des conditions réduites de survie de la bactérie entraînant un faible taux d'infection racinaire, soit en interférant sur le processus de la nodulation (réduction ou inhibition), soit encore en agissant sur le phénomène d'absorption du calcium de la luzerne.
- 2° L'efficacité symbiotique varie d'un R. meliloti à un autre selon sa capacité à résister au pH du milieu. La souche M_9S présente une faible efficacité (test de la réduction d'acétylène, rendement en matière sèche et nombre de nodules par plante après 45 jours d'expérience) par rapport aux souches $M_9Sm_1^{Str}$ et $1-5^{Str}$ pour les pH inférieurs ou égaux à 5,5 dans le milieu synthétique de NICOL et THORNTON.

Nous avons constaté la présence d'une forte quantité de nitrate dans les deux terres de BRETAGNE qui on le sait présente un effet défavorable pour l'établissement de la symbiose par la réduction de l'infectivité.

L'état rachitique de la plante à pH 4,9, malgré l'apport d'inocula et la présence de nitrate, nous suggère la présence d'autres facteurs liés aux sols acides : aluminium, manganèse, etc... Pour réussir l'établissement de la culture de luzerne pour la terre de pH 4,9, le chaulage est indispensable de façon à neutraliser l'excès d'alumine et de manganèse néfaste à cette plante.

L'étude faite directement sur la terre de pH 5,9 nous permet de confirmer la présence de R. meliloti indigènes ayant une efficacité symbiotique non négligeable. Bien que le rendement en matière sèche soit presque identique pour les souches indigènes et les souches M_9S , $M_9Sm_1^{Str}$, $1-5^{Str}$ du fait de la présence de nitrate, l'étude de la fixation symbiotique par le test de la réduction d'acétylène montre une meilleure efficacité pour les souches $M_9Sm_1^{Str}$ et $1-5^{Str}$, ceci montre qu'une fois les nitrates épuisés, ces deux souches présenteraient un intérêt pratique pour la fixation de l'azote.

Enfin, l'étude physiologique montre une différence très nette des deux souches R. meliloti M₉S et M₉Sm₁^{Str}. Cette dernière présente aux pH voisins de la neutralité un ralentissement de la croissance, de la synthèse d'exopolysides en milieu de non-prolifération, de la synthèse de protéine et de l'incorporation de la thymidine radioactive dans l'ADN. Par contre, à pH 5,9, on observe une meilleure croissance et une synthèse accrue d'exopolysides pour la souche M₉Sm₁^{Str} que pour M₉S, mais celles-ci restent inférieures à celles observées à pH 7,2.

Le ralentissement de la vitesse de renouvellement du matériel biologique du mutant M₉Sm₁^{Str} n'est pas dû à une perméabilité moindre aux substrats carbonés tel le fructose, mais à un phénomène génétique entraînant un changement du fonctionnement du système métabolique. Il peut présenter dans la nature (sol acide) un avantage important : en effet, il donne une résistance plus grande pour la souche M₉Sm₁^{Str} (pas de lyse) assurant un nombre de bactéries viables suffisant pour l'infection racinaire de la plante hôte.

S'il n'a pas été possible de déterminer les sites précis affectés par les mutations de la souche M₉S donnant M₉Sm₁^{Str}, il apparaît que le système d'incorporation de la thymidine dans l'ADN semble être le plus touché chez le mutant. Enfin, nous n'avons trouvé aucune hypothèse permettant de relier directement le faible taux d'incorporation de la thymidine dans l'ADN et l'aptitude à se développer à pH acide.

En conclusion et quoique les résultats rapportés ci-dessous ne font pas partie du sujet de notre thèse, le mutant M₉Sm₁^{Str} a montré son utilité sur le plan pratique. En effet, dans des expériences agronomiques en terrains acides (pH 4,9) n'ayant jamais supporté les cultures de luzerne, l'inoculation par les souches M₉Sm₁^{Str} et 1-5 après chaulage léger a permis d'obtenir des rendements convenables en luzerne après deux coupes. Le rendement moyen en grammes de matières sèches de luzerne au m² passe de 93,69 pour le terrain non inoculé à 225,20 pour les parcelles inoculées avec les Rhizobium.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ALLEN, E.K. and ALLEN, O.N. (1958). Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation. In Encyclopedia of Plant Physiology. Ruhland, W. vol. VIII, Nitrogen Metabolism, pp. 64-118. Berlin : Springer-Verlag.
- (2) ANDERSON, A.J. (1956). Molybdenum as a fertilizer. *Ad. Agron.*, 8 : 163-202.
- (3) ANDREW, C.S. and HEGARTY, M.P. (1969). Comparative responses to manganese excess of eight tropical and four temperate pasture legume species. *Aust. J. Agric. Res.*, 20 : 687-696.
- (4) BEATON, J.B., SPEAR, R.S. and BARAPIAK, J.T. (1968). Response of red clover to kimberley electric furnace iron slag and other liming materials. *Can. J. Plant Sci.*, 48 : 455-466.
- (5) BERGERSEN, F.J. and TURNER, G.L. (1967). Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. *Biochem. Biophys. Acta*, 141 : 507-515.
- (6) BERSTEIN, L. and OGATA, G. (1966). Effects of salinity on nodulation, nitrogen fixation, and growth of soybeans and alfalfa. *Agron. J.*, 58 : 201-203.
- (7) BONNIER, C. (1960). Symbiose Rhizobium-Légumineuses. Aspects particuliers aux régions tropicales. *Ann. Inst. Pasteur*, 98 : 538-556.

- (8) BONNIER, C. (1962). Relation entre la spécificité et l'efficacité des souches de Rhizobium. Ann. Inst. Pasteur, 103 : 403.
- (9) BROCKWELL, J., SCHWINGHAMER, E.A. and GAULT, R.R. (1977). Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. V. A critical examination of the stability of antigenic and streptomycin-resistance markers for identification of strains of Rhizobium trifolii. Soil Biol. Biochem., 9 : 19-24.
- (10) BROUGHTON, W.J., CHAN, P.Y., PADMANABHAN, S. and TAN, I.K.P. (1975). Rhizobia in tropical legumes. I. Preliminary studies of antibiotic sensitivity, pH and temperature optima. Malaysian Agric. Res., 4 : 141-153.
- (11) BURRIS, R.H. and WILSON, P.W. (1957). Methods for measurement of nitrogen fixation. In : Methods in Enzymology. Vol. 4. S.P. Colowick and N.O. Kaplan, eds. Academic Press, New York. pp : 355-367.
- (12) BURTON, J.C. (1972). Nodulation and symbiotic nitrogen fixation. Pages 229-246 in C.H. Hanson, ed. Alfalfa, science and technology. N. 15 Amer. Soc. Agron. Inc., Madison, Wis.
- (13) CAMPBELL, N.E.R., DULAR, R., LEES, H. and STANDING K.G. (1967). The production of $^{13}\text{N}_2$ by 50 Mev protons for use in biological nitrogen fixation. Can. J. Microbiol., 13 : 587-599.
- (14) CERDA-OLMEDO, E. and HANAWALT, P.C. (1968). Diazomethane as the active agent in nitrosoguanidine mutagenesis and lethality. Molec. Gen. Genet., 101 : 191-202.

- (15) CHEN, A.P.T. and PHILLIPS, D.A. (1976). Attachment of Rhizobium to legume roots as the basis specific interactions. *Physiol. Plant.*, 38 : 83-88.
- (16) CLOOMAN, M.J. and VINCENT, J.M. (1967). The nodulation of annual summer legumes sown on the far north coast of New South Wales. *Aust. J. exper. Agric. animal Husband.* 7 : 181-189.
- (17) COURTOIS, B. (1975). Etude des polyosides de Rhizobium. Thèse de 3ème cycle (Université des Sciences et Techniques de Lille).
- (18) COURTOIS, B., DERIEUX, J.C. et HORNEZ, J.P. (1975). Etude des polyosides de Rhizobium à croissance rapide. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 126B (I) : 1-15.
- (19) DART, P.J. (1974). The infection process. *The Biology of Nitrogen Fixation* (A. QUISPÉL, Editor). *Frontiers of Biology*, 33 : 381-429.
- (20) DART, P.J. and MERCER, F.V. (1964). The legume rhizosphere. *Arch. Microbiol.*, 47 : 344-378.
- (21) DELATTRE, J.M. et DELEPLANQUE, A. (1971). Etude des caractères physiologiques et biochimiques de 63 souches isolées de nodules de légumineuses. *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, 22 : 215-230.
- (22) DILWORTH, M.J. (1966). Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from Clostridium pasteurianum. *Biochem. Biophys. Acta*, 127 : 285-294.

- (23) DÖBEREINER, J. (1966). Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation of beans. (Phaseolus vulgaris L.) in acid soils. Plant and Soil, 24 : 153-166.
- (24) DOKU, E.V. (1970). Effect of day-length and water on nodulation of cowpea (Vigna unguiculata L.) in Ghana. Exper. Agric., 6 : 13-18.
- (25) DUDMAN, W.F. and HEILDEBERGER, M. (1969). Immunochemistry of newly found substituents of polysaccharides of Rhizobium species. Science, 164 : 954-955.
- (26) FAHRAEUS, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. J. Gen. Microbiol., 16 : 374-381.
- (27) FAHRAEUS, G. and LJUNGGREN, H. (1959). The possible significance of pectic enzymes in root hair infection of nodule bacteria. Physiol. Plant., 12 : 145-154.
- (28) FAHRAEUS, G. and SAHLMAN, K. (1977). The infection of root hairs of leguminous plants by nodule bacteria. A review of recent work and a discussion of possible mechanisms. Ann. Acad. R. Sci. Upsal., 20 : 103-137.
- (29) FRANCO, A.A. and DOBBERREINER, J. (1971). Manganese toxicity in a acid soil affecting the soybean Rhizobium symbiosis. Presq. agropec. bras. Ser. Agron., 6 : 57-66.
- (30) GIBSON, A.H. (1971). Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. Plant and Soil, Special Volume : 139-152.

- (31) GOODCHILD, D.J. and BERGERSEN, F.J. (1966). Electron microscopy of the infection and subsequent development of soybean nodule cells. J. Bacteriol., 92 : 204-213.
- (32) GRAHAM, P.H. (1963). Vitamin requirements of root nodule bacteria. J. Gen. Microbiol., 30:245-248.
- (33) GRAHAM, P.H. (1976). Identification and classification of root nodule bacteria. In Symbiotique Nitrogen Fixation in Plants ed. Nutman, P.S., pp: 99-112 , Cambridge : Cambridig University Press.
- (34) HAMBLIN, J. and KENT, S.P. (1973). Possible role of phytohaemagglutinin in Phaseolus vulgaris L. Nature New Biol., 245 : 28-30.
- (35) HARDY, R. W. F., HOLSTEN, R.D., JACKSON, E.K. and BURNS, R.C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation : Laboratory and field evaluation. Plant Physiol., 43 : 1185-1207.
- (36) HOLDING, A.J. and LOWE, J.F. (1971). Some effects of acidity and heavy metals on the Rhizobium-leguminous plant association. Plant Soil, Special volume : 153-166.
- (37) HORNEZ, J.P. (1976). Etude des voies de dégradation du glucose et du fructose chez Rhizobium meliloti. Thèse de 3ème cycle (Université des Sciences et Techniques de Lille).
- (38) HORNEZ, J.P., COURTOIS, B. et DERIEUX, J.C. (1976). Mise en évidence de voies de métabolisme différents à partir du glucose ou du fructose chez Rhizobium. C.R. Acad. Sci. Paris, 283 : 1559-1562.

- (39) HOYT, P.B., HENNIG, A.M.F. and DOBB, J.L. (1967). Reponse of barley and alfalfa to liming of Solonetzic, Podzolic and Gleysolic soils of Peace River region. Can. J. Soil Sci., 47 : 15-21.
- (40) HOYT, P.B. and NYBORG, M. (1972). Use of dilute calcium chloride for the extraction of plant-available aluminium and manganese from acidic soil. Can. J. Soil Sci., 52 : 163-167.
- (41) IMSHENETSKII, A.A., PARIKSKAYA, A.N. and GORELOVA, O.M. (1976). Study of survival of Rhizobium meliloti using genetic markers. Microbiology, 45 : 945-946.
- (42) ISWARAN, V., SUNDARA RAO W.V.B., JAUHRI, K.S. and MAGHU, S.P. (1970). Effect of temperature on survival of Rhizobium japonicum in soil and peat. Mysore J. Agric. Sci., 4 : 105-107.
- (43) JENSEN, H.L. (1942). Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of Medicago and Trifolium in Australia. Proc. Linn. Soc. N.S.W., 67 : 98-108.
- (44) JENSEN, H.L. (1943). Nitrogen fixation leguminous plants. IV. The influence of reaction on the formation of root-nodules in Medicago and Trifolium. Proc. Linn. Soc. N.S.W., 68 : 207-220.
- (45) JENSEN, H.L. (1947). Nitrogen fixation in leguminous plants. VII. The nitrogen fixing activity of root nodule tissue in Medicago and Trifolium. Proc. Linn. Soc. N.S.W., 72 : 265-291.

- (46) JORDAN, D.C.(1962). The bacteroids of the genus Rhizobium. Bact. Rev., 26 (2) : 119-141.
- (47) KATZNELSON, H. (1955). Production of pyruvate from 6-phosphogluconate by bacterial plant pathogens and legume bacteria. Nature, 175 : 551-552.
- (48) KAUSS, H, and BOWLES, D.J. (1976). Some properties of carbohydrate-binding proteins (lectins) solubilized from cell walls of Phaseolus aureus. Planta (Berlin), 130 : 169-174.
- (49) KIJNE, J.W. (1975). The fine structure of peat root nodules. I. Vacuolar changes after endocytotic host cell infection by Rhizobium leguminosarum. Physiol. Plant Pathol., 5 : 75-79.
- (50) KOCH, B. and EVANS, H.J. (1966). Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. Plant Physiol., 41 : 1748-1749.
- (51) KOCH, B., EVANS, H.J. and RUSSELL, S.A. (1967). Reduction of acetylene and nitrogen gas by breis and cell-free extracts of soybean root nodules. Plant Physiol., 42 : 466-468.
- (52) LAIRD, D.J. (1932). Bacteriophage and the root nodule bacteria. Arch. Mikrobiol., 3 : 159-193.
- (53) LIE, T.A. (1969). The effect of low pH on different phases of nodule formation in pea plants. Plant and Soil, 31 : 391-406.
- (54) LIE, T.A. (1971). Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. Plant and Soil, Special Volume : 117-127.

- (55) LIENER, I.E. (1976). Phytohemagglutinins (Phytolectins). Ann. Rev. Plant Physiol., 27 : 291-319.
- (56) LJUNGGREN, H. (1969). Mechanism and pattern of Rhizobium invasion into leguminous roots hairs. Physiol. Plant., Suppl. V : 1-82.
- (57) LJUNGGREN, H. and FAHRAEUS, G. (1959). Effect of Rhizobium polysaccharide on the formation of polygalacturonase in lucerne and clover. Nature, 184 : 1578-1579.
- (58) LONERAGAN, J.F. (1971). The soil chemical environment in relation to symbiotic nitrogen fixation. In Use of Isotopes for Study of Fertiliser Utilisation by Legume Crops. pp. 17-54, Vienna : United Nations FAO/IAEA Division for Atomic Energy in Food and Agriculture.
- (59) LONERAGAN, J.F. and DOWLING, E.J. (1958). The interaction of calcium and hydrogen ions in the nodulation of subterranean clover. Aust. J. Agric. Res., 9 : 464-472.
- (60) LOWE, J.F. and HOLDING, A.J. (1970). In Proceedings Symposium white clover Research. pp.79-89. Ed. J. Lowe British Grassland Soc., Hurley.
- (61) LOWTHER, W.L. (1970). Calcium in the nodulation and growth of legumes. Ph. D. Thesis, University of Western Australia. Nedlands.
- (62) LOWTHER, W. L. and LONERAGAN, J.F. (1968). Calcium and nodulation in subterranean clover. (Trifolium subterraneum L.) Plant Physiol., 43 : 1362-1366.

- (63) LOWTHER, W.L. and LONERAGAN, J.F. (1970). Calcium in the nodulation of legumes. Proceedings of the Eleventh International Grasslands Conference, 446-450.
- (64) MACLEAN, A.J., HALSTEAD, R.L. and FINN, B.J. (1972). Effects of lime on extractable aluminium and other soil properties and on barley and alfalfa grown in pot tests. Can. J. Soil Sci., 52 : 427-438.
- (65) MANDELL, J.D. and GREENBERG, J. (1960). A new chemical mutagen for bacteria, 1 - methyl - 3 - nitro - 1 nitrosoguanidine. Biochem. Biophys. Res. communic., 3 : 575-577.
- (66) MARSHALL, K.C., CRUICKSHANK, R.H. and BUSHBY, H.V.A. (1975). The orientation of certain root-nodule bacteria at interfaces, including legume root-hair surfaces. J. Gen. Microbiol., 91 : 198-200.
- (67) MARTINEZ, C.I. (1971). Statistical evaluation of factors affecting symbiotic nitrogen fixation by alfalfa (Medicago sativa) and soybean (Glycine max. Merr.). Ph. D. Thesis, University of Wisconsin, Madison, Wisc.
- (68) MATT, K. JOHN, K., CASE, V. W. and VAN LAERHOVEN, C. (1972). Liming of alfalfa (Medicago sativa L.). I. Effect on plant growth and soil properties. Plant and Soil, 37 : 353-361.
- (69) MENDEZ-CASTRO, F.A. and ALEXANDER, M. (1976). Acclimation of Rhizobium to salts, increasing temperature and acidity. Rev. Lat-amer. Microbiol., 18 : 155-158.

- (70) MULDER, E.G., LIE, T.A. and HOUWERS, A. (1966). Effect of pH on symbiotic nitrogen fixation of some leguminous plants. IX. Intern. Congr. for Microbiology, Moscow pp. 133-151.
- (71) MUNNS, D.N. (1965). Soil acidity and growth of a legume. I : Interactions of lime with nitrogen and phosphate on growth of Medicago sativa L. and Trifolium subterraneum L. Aust. J. Agric. Res., 16 : 733-741.
- (72) MUNNS, D.N. (1968). Nodulation of Medicago sativa in solution culture. I. Acid sensitive steps. Plant and Soil, 28 : 129-146.
- (73) MUNNS, D.N. (1968). Nodulation of Medicago sativa in solution culture. II. Compensating effects of nitrate and of prior nodulation. Plant and Soil, 28, N 2 : 246-257.
- (74) MUNNS, D.N. (1968). Nodulation of Medicago sativa in solution culture. III. Effects of nitrate on root hairs and infection. Plant and Soil, 29 : 33-47.
- (75) MUNNS, D.N. (1969). Enzymatic breakdown of pectin and acid-inhibition of the infection of Medicago roots by Rhizobium. Plant and Soil, 30 : 117-120.
- (76) MUNNS, D.N. (1970). Nodulation of Medicago sativa in solution culture. V. calcium and pH requirements during infection. Plant and Soil, 32 : 90-102.
- (77) NIEL, C. (1975). Etude de la mutagenèse chez Rhizobium meliloti. Diplôme d'études approfondies de Biochimie (Université des Sciences et Techniques de Lille).

- (78) NICOL, H. and THORNTON, H.G. (1941). Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of legume host. *Proceedings of the Royal Society fo London, Series B*, 130 : 32-59.
- (79) NORRIS, P.S. (1965). Acid production by Rhizobium. A unifying concept. *Plant and Soil*, 22 : 143-166.
- (80) NUTMAN, P.S. (1965). The relation between nodule bacteria and the legume host in the rhizosphere and the process of infection. In *Ecology of Soil. Borne Plant Pathogens* eds Baker, K.F. and Snyder, W.C. pp. 231-247, Berkeley : University of California Press.
- (81) PATTISON, A.C. and SKINNER, F.A. (1974). The effects of antimicrobial substances on Rhizobium spp. and their use in selective media. *J. Appl. Bact.*, 37 : 239-250.
- (82) PENNEY, D.C., NYBORG, M., HOYT, P.B., RICE, W.A., SIEMENS, B. and LAVERTY, D.H. (1977). An assessment of the soil acidity problem in Alberta and Northeastern British Columbia. *Can. J. Soil Sci.*, 57 : 1957-1964.
- (83) PURCHASE, H.F. (1958). Restriction of infection threads in nodulation of clover an lucern. *Aust. J. Biol. Sci.*, 11 : 155-161.
- (84) RAGGIO, M. and RAGGIO, N. (1962). Root nodules. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 13 : 109-128.
- (85) REPORTER, M., REVEED, D. and NORRIS, G. (1975). Binding of Rhizobium japonicum to cultured soybean root cells morphological evidence. *Plant. Sci. Letters*, 5 : 73-76.

- (86) RHYKERD, C. L. and OVERDAHL, C.J. (1972). Nutrition and fertilizer use. Pages 437-468 in C.H. Hansan, ed. Alfalfa Science and Technology Agronomy. No. 15. Amer. Soc. Agron., Inc., Madison. Wis.
- (87) RICE, W.A. (1975). Effect of CaCO_3 and inoculum level on nodulation and growth of alfalfa in an acide soil. Can. J. Soil Sci., 55 : 245-250.
- (88) RICE, W.A., PENNEY, D.C. and NYBORG, M. (1977). Effects of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. Can. J. Soil Sci., 57 : 197-203.
- (89) ROBISON, R.S. (1946). The antagonistic action of the by-products of a culture of Aspergillus wentii on the legume bacteria. J. Bact., 51 : 129.
- (90) ROBSON, A.D. and LONERAGAN, J.F. (1970). Nodulation and growth of Medicago truncatula on acid soils. I. Effects of calcium carbonate and inoculation level on the nodulation of Medicago truncatula on a moderately acid soil. Aust. J. Agric. Res., 21 : 427-434.
- (91) ROBSON, A.D. and LONERAGAN, J.F. (1970). Nodulation and growth of Medicago truncatula on acid soils. II. Colonization of acid soils by Rhizobium meliloti. Aust. J. Agric. Res., 21 : 435-445.
- (92) ROPONEN, I., VALLE, E. and ETTALA, T. (1970). Effect of temperature on the culture medium on growth and nitrogen fixation of inoculated legumes and rhizobia. Physiol. Plant., 23 : 1198-1205.
- (93) ROUGHLEY, R.J. and DART, P.J. (1969). Reduction of acetylene by nodules of Trifolium subterraneum as affected by root temperature, Rhizobium strain and host cultivar. Arch. Mikrobiol., 69 : 171-179.

- (94) ROVIRA, A.D. (1965). Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. In Ecology of Soil-borne Plant Pathogens eds Bakker, K.F. and Snyder, W.C. pp. 170-184, London : John Murray.
- (95) ROVIRA, A.D. (1969). Plant root exudates. Bot. Rev., 35 : 35-57.
- (96) SCHÖLLHORN, R. and BURRIS, R.H. (1967). Acetylene as a competitive inhibitor of N_2 fixation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 58 : 213-216.
- (97) SCHREVEN, D.A. Van. (1964). The effect of some actinomycetes on rhizobia and agrobacterium radiobacter. Plant and Soil, 21 : 283-302.
- (98) SCHREVEN, D.A. Van. (1972). On the resistance of effectiveness of Rhizobium trifolii to a low pH. Plant and Soil, 37 : 49-55.
- (99) SCHERWOOD, M.T. (1966). In Soils Division Research Report, pp. 64-65. An Foras Taluntais.
- (100) SOLHEIM, B. and RAA, J. (1973). Characterization of the substances causing deformation of root hairs of Trifolium repens when inoculated with Rhizobium trifolii. J. Gen. Microbiol., 77 : 241-247.
- (101) STEWARD, W.D.P. (1966). Nitrogen Fixation in Plants. The Athlone Press, University of London, London.
- (102) STEWARD, W.D.P., FITZGERALD, G.P. and BURRIS, R.H. (1967). In situ studies on N_2 fixation using the acetylene reduction technique. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 58 : 2071-2078.
- (103) SUTHERLAND, I.W. (1972). Bacterial exopolysaccharides. Adv. Microbial. Physiol., 8 : 143-213.

- (104) SUBBA RAO, N.S., LAKSHMI-KUMARI, M., SINGH, C.S. and MAGU, S.P. (1972). Nodulation of lucern (Medicago sativa L.) under the influence of sodium chloride. Ind. J. Agric. Sci., 42 : 384-386.
- (105) TRUONG, N.V., WILSON, G.L. and ANDREW, C.S. (1971). Manganese toxicity in pastures legumes. I. Effects of calcium and phosphorus levels in the substrate. Plant and Soil, 34 : 309-330.
- (106) VALERA CONCEPCION, L. and ALEXANDER, M. (1965). Reversal of nitrate inhibition of nodulation by indole 3 acetic acid. Nature, 206 : 326.
- (107) VINCENT, J.M. (1965). Environmental factors in the fixation of nitrogen by the legumes. Pages 384-435. in W.V. Bartholomew and F.E. clarck, eds. Soil nitrogen. Agronomy N. 10 Amer. Soc. Agron., Inc., Madison. Wis.
- (108) VINCENT, J.M. (1974). Root-nodules symbioses with Rhizobium. The Biology of Nitrogen Fixation (A. QUISPEL, Editor). Frontiers of Biology, 33 : 265-341.
- (109) VINCENT, J.M. (1977). Rhizobium : general microbiology. In A Treatise on Dinitrogen Fixation Section III. Biology eds Hardy, R.W.F. and Silver, W.S., pp. 277-366. New York : Wiley Interscience.
- (110) VIRTANEN, A.E., NORDLUND, M. and HOLLO, E. (1934). Fermentation of sugar by the root nodule bacteria. Biochem. J., 28 : 796-802.
- (111) VISONA, L. et TARDIEUX, P. (1964). Antagonistes des Rhizobium dans la rhizosphère du trèfle et de la luzerne. Ann. Inst. Pasteur, 107.S : 297-302.

- (112) VOSE, P.B. and JONES, D. G. (1963). the interaction of manganese and calcium on nodulation and growth of Trifolium repens. Plant and Soil, 18 : 372-385.
- (113) WERQUIN, M., MOHAMED, T.B.B. et DRAGA KRSMANOVIC-SIMIC. (1977). Etude des bactériophages de Rhizobium meliloti. C.R. Acad. Sci. Paris, 1851-1854.
- (114) WIERINGA, K.T. (1963). Organismes isolés du sol des Apennins, producteurs d'antibiotiques envers diverses souches de Rhizobium. Ann. Inst. Pasteur Paris, 105 : 417-425.
- (115) WILKINS, J. (1967). The effects of high temperatures on certain root-nodules bacteria. Aust. J. Agric. Res. 18 : 299-304.
- (116) WILSON, D.O. and REISENAUER, H.M. (1970). Effects of some heavy metals on the cobalt nutrition of Rhizobium meliloti. Plant and Soil, 32 : 81-89.
- (117) WILSON, D.O. and REISENAUER, H.M. (1970). Effects of manganese and zinc ions on the growth of Rhizobium. J. Bacteriol., 102 : 729-732.
- (118) YAO, P.Y. and VINCENT, J.M. (1969). Host specificity in the root hair "curling factor" of Rhizobium spp. Aust. J. Biol. Sci., 22 : 413-423.
- (119) YAO, P.Y. and VINCENT, J.M. (1976). Factors responsible for curling and branching of clover root hairs by Rhizobium. Plant and Soil, 45 : 1-16.

