

50376
1982
75

N° d'ordre: 963

50376
1982
75

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spécialité: "Amélioration et Transformation des Productions Végétales et Microbiennes"

Option MICROBIOLOGIE

par

Hassan ALI

**OBTENTION DE MUTANTS CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI
PAR L'INSERTION DU TRANSPOSON Tn5 ET
ETUDE DE LEURS REVERTANTS**



Soutenue le 21 avril 1982, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury:

MM. J. GUILLAUME
R. TAILLIEZ
C. BONNIER
J. KREMBEL
G. MARTIN

Président

Rapporteur

Examineurs

A MA MERE.

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, sous la direction de Monsieur le Professeur GUILLAUME. Je tiens à le remercier tout particulièrement de m'avoir accueilli et suivi avec beaucoup de gentillesse. Je le remercie de ses conseils judicieux pour l'orientation de cette recherche et des encouragements permanents qu'il m'a prodigués tout-au-long de ce travail. Je lui exprime ici toute ma reconnaissance et mon profond respect.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ qui a bien voulu accepter d'être le rapporteur de cette thèse.

Ma reconnaissance s'adresse également à Monsieur le Recteur C. BONNIER de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux et à Messieurs les Professeurs J. KREMBEL et G. MARTIN qui me font l'honneur de juger ce travail. Qu'ils veuillent trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je tiens à associer à cet ouvrage Monsieur M. BECHET qui a consacré une partie de son temps à corriger ce manuscrit. Je le remercie des nombreux et utiles conseils techniques et scientifiques ; la plupart des résultats obtenus n'auraient pu l'être sans son aide. Sa gentillesse est le reflet de sa valeur scientifique.

J'exprime ma gratitude à Monsieur C. NIEL qui a dirigé une partie de cette thèse et m'a prodigué une aide technique et des conseils appréciables.

Le moment est venu de remercier Messieurs B. COURTOIS, K. MAOUI et D. OCHIN pour leur aide au cours de ce travail et leur collaboration précieuse. Je les assure de mon amitié.

Je suis reconnaissant à Mademoiselle F. GAVINI qui m'a permis d'utiliser le biophotomètre expérimental de l'Unité I.N.S.E.R.M.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes du Laboratoire et surtout Mesdames P. LETOQUART et F. BECHET pour leur gentillesse et pour leur aide précieuse.

J'adresse mes remerciements au Service de l'Accueil des Etudiants Etrangers du C.R.O.U.S. , ainsi qu'à Mesdames C. CROS et D. FABIS pour l'aide et la sympathie qu'ils m'ont dispensés.

Enfin, je remercie Madame M. BONNIER qui a réalisé la dactylographie de ma thèse.

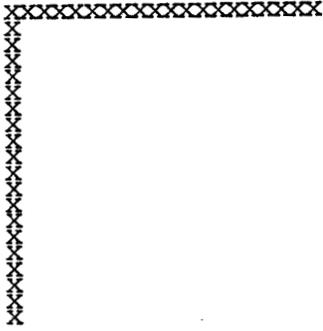
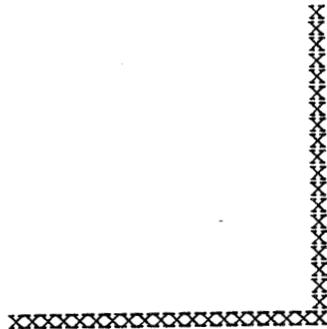


TABLE DES MATIERES



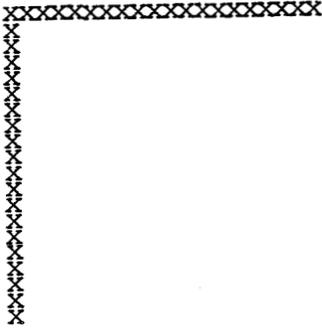
AVANT-PROPOS.....	2
INTRODUCTION.....	6
I - La découverte des éléments transposables chez les bactéries	6
II - Les différents groupes d'éléments transposables.....	7
A - IS (Séquence d'insertion).....	7
B - Tn (Transposon).....	7
C - Episomes.....	9
D - Bactériophage.....	9
III - Structure et propriétés du transposon Tn5	11
IV - Plasmide "suicide" portant des transposons.....	17
V - Problème du support des gènes de la symbiose.....	19
A - Procédés d'obtention de mutants déficients du point de vue symbiotique.....	20
B - Preuves en faveur des plasmides de <u>Rhizobium</u> comme support de gènes codant pour les propriétés symbiotiques.....	23
C - Les plasmides géants.....	25

MATERIEL ET METHODES.....	29
I - Souches bactériennes et conservation.....	29
II - Milieux de cultures.....	29
2.1 - Tampon exempt d'azote RN ⁻	29
2.2 - Tampon R	31
2.3 - Gélose blanche.....	31
2.4 - Milieu riche RC	31
2.5 - Milieu riche TY	32
2.6 - Milieu riche d'ISWARAN (IS)	32
2.7 - Milieu riche de LURIA	33
2.8 - Milieu de NICOL et THORNTON.....	33
III - Croissance bactérienne.....	34
3.1 - Numération des cellules viables.....	34
3.2 - Détermination du temps de génération.....	34
IV - Antibiotiques.....	35
4.1 - Solutions d'antibiotiques.....	35
4.2 - Obtention de mutants résistants à la streptomycine.....	36
4.3 - Détermination de la résistance aux antibiotiques.....	36
V - Transposition.....	37
5.1 - Technique de croisement.....	37
5.2 - Technique des répliques.....	38
5.3 - Identification des mutants auxotrophes.....	39
5.4 - Mesure de la fréquence de réversion de mutants auxotrophes.....	41

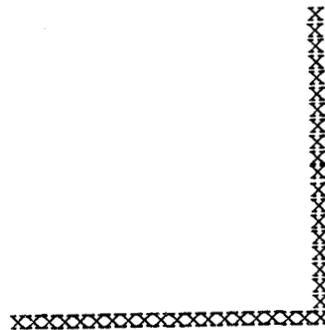
VI - Induction du phage Mu	41
VII - Dosage des exopolysaccharides.....	42
A - Dosage chimique.....	42
B - Dosage radiochimique	43
VIII - Infectivité.....	44
8.1 - Stérilisation des graines de luzerne.....	44
8.2 - Germination.....	45
8.3 - Culture aseptique des légumineuses.....	45
8.4 - Inoculation de la souche à tester.....	45
IX - Efficience.....	46
9.1 - Principe de la méthode.....	46
9.2 - Conditions expérimentales.....	47
9.3 - Technique de dosage.....	47
9.4 - Calcul de la quantité d'éthylène produite (ΔQ)	48
9.5 - Détermination du poids sec de la plantule.....	49
X - Méthode d'isolement des souches à partir de nodules.....	49
XI - Méthode électrophorétique.....	49
11.1 - Extraction et purification de l'ADN plasmidique par lyse douce effectuée directement sur le gel	49
11.2 - Choix des différents paramètres électrophorétiques	51
A - La concentration du gel.....	51
B - Voltage et temps de migration.....	51
11.3 - Visualisation des bandes plasmidiques.....	51
11.4 - Photographie.....	52
11.5 - Mode de calcul du poids moléculaire des plasmides.....	52

CHAPITRE I - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE MUTANTS PAR TRANSPOSITION.....	55
I - Mutants auxotrophes.....	55
1 - Croisement entre <u>E. coli</u> S111(pSP601) et <u>E. coli</u> C600 Rif ^r	55
2 - Choix du transposon.....	58
3 - Choix de la souche réceptrice.....	59
4 - Transposition entre E. coli S111(pSP601) et les souches sélectionnées.....	62
5 - Obtention de mutants auxotrophes.....	63
a) Transposition avec la souche 444..	63
b) Transposition avec la souche M28Str	69
6 - Ambiguïté de l'étude des mutants auxotrophes....	72
II - Mutants inefficients.....	74
1 - Isolement.....	74
2 - Electrophorèse.....	77
III - Mutants affectés sur le métabolisme des exopolysaccharides	79
1 - Isolement.....	79
2 - Dosage d'exopolysaccharides.....	79
3 - Electrophorèse.....	82
4 - Propriétés symbiotiques.....	84

CHAPITRE II - ETUDE DES "REVERTANTS PROTOTROPHES".....	87
I - Isolement de révertants prototrophes et étude de leurs résistances aux antibiotiques.....	88
II - Contenu plasmidique.....	92
III - Sélection de mutants résistants à 1500 µg/ml de kanamycine.	98
IV - Transfert du plasmide (pAB) à <u>E. coli</u> C600 Rif ^r	99
V - Induction du phage Mu.....	103
VI - Temps de génération.....	105
VII - Propriétés symbiotiques.....	110
 DISCUSSION.....	 114
 BIBLIOGRAPHIE.....	 129



GLOSSAIRE



I - NOMENCLATURE DES MUTANTS ET DÉRIVÉS RÉSULTANT DE L'INSERTION
DU TRANSPOSON Tn5

Exemples :

- Souche sauvage 444 de Rhizobium meliloti.
- Mutant auxotrophe 444::Tn5.10 : est exigeant en arginine et résistant à la kanamycine.

Le chiffre 10 : numéro du clone mutant.

En abrégé : mutant 10.

- Révertant prototrophe de ce mutant :

444::Tn5.10.1



Numéro du clone révertant

En abrégé : révertant 10.1

- Mutant résistant à une forte concentration en kanamycine :

444::Tn5.10.A



Mutant A

En abrégé : mutant 10.A

Ceci est valable pour la souche M28Str.

Le symbole :: signifie insertion.

II - ABRÉVIATIONS

- nM : millimolaire
- mn : minute
- qsp : quantité suffisante pour
- Nod⁻ : un mutant incapable de noduler les racines de la plante hôte
- Fix⁻ : un mutant incapable de fixer l'azote atmosphérique
- glc : glucose
- Tris : Tris-(hydroxy-méthyl-aminométhane)
- Na₂EDTA : acide éthylène diamine-tétra-acétique sel disodique

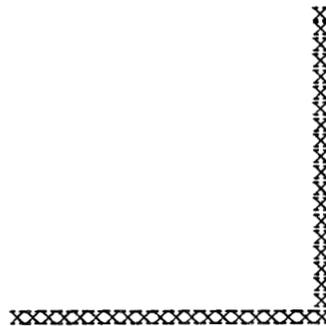
III - NOTE

1 paire de base \approx 660 Daltons

1 Dalton (masse de l'atome d'hydrogène) = 10^{-6} Mégadalton



AVANT - PROPOS



L'Homme en lui-même, avec sa capacité mentale et son cerveau, réalisa au cours des temps un net progrès pour vaincre la nature et l'adapter à ses besoins. Mais peut-il canaliser toutes ses connaissances dans le seul but de réaliser son bonheur ? Il est certain que cette faculté de penser de l'Homme peut être utilisée soit pour le bonheur, soit pour le malheur de l'humanité.

Certains exemples récents de découvertes comme la bombe atomique permettant d'affirmer cette hypothèse, comme nous l'indique l'histoire proche où une bombe de ce genre fut lancée sur HIROSHIMA en 1945 avec les conséquences que l'on sait et les séquelles existant encore actuellement.

Pourquoi ces efforts déployés seulement pour fabriquer des armements de plus en plus sophistiqués qui sèment la peur et la mort parmi les enfants de ce monde ? Parmi ceux-ci, la guerre microbiologique, lorsqu'on sait que des chercheurs travaillent jour et nuit pour rendre des microbes mortels et incontrôlables biologiquement.

EST-CE LÀ LE PROGRES DE L'HOMME ?

Si on adapte toutes les connaissances humaines seulement pour résoudre les problèmes de l'Homme, on peut faire de ce monde un paradis. Parmi ces problèmes, se pose celui de la nutrition avec la poussée démographique.

En effet, la famine, qui est responsable de la mort de beaucoup d'enfants dans le Tiers-Monde, nous incite à se pencher sérieusement sur ce problème, en cherchant à améliorer le rendement des

produits agricoles et en particulier celui des légumineuses, qui jouent un rôle important dans la nutrition de l'Homme.

La fixation de l'azote atmosphérique, grâce à la symbiose Rhizobium-légumineuse, présente un intérêt agronomique considérable puisqu'elle conduit à une synthèse des acides aminés (composants de base des protéines), à partir de substances inorganiques dans l'atmosphère ; en plus, elle maintient la fertilité du sol grâce aux exsudats racinaires.

En effet, le but de chercheurs dans le domaine génétique est destiné à supprimer ou à réduire la consommation mondiale d'engrais azotés, car leur fabrication demande une dépense énergétique considérable : elle nécessite une température de l'ordre de 500° C et une pression de 200 à 400 atmosphères pour activer la molécule d'azote, alors que la nitrogénase catalyse la même réaction à température et à pression ordinaires. Pour envisager ce projet, trois voies de recherches sont poursuivies sur les deux partenaires symbiotiques :

1. Les modifications génétiques de la plante-hôte permettant d'augmenter le rendement.

2. L'obtention de souches de Rhizobium super efficaces capables de fixer l'azote à grande échelle, ceci en multipliant les sites actifs de l'enzyme nitrogénase par amplification des gènes nif qui codent pour sa synthèse.

3. La recherche de souches de Rhizobium capables d'entrer en symbiose avec les céréales par exemple, ceci nécessite une modification génétique de la spécificité d'hôte (reconnaissance bactérie-plante).

Une façon d'aborder l'étude de gènes nif chez Rhizobium au point de vue de leur régulation et de leur emplacement est d'isoler des mutants bloqués au niveau de gènes de la symbiose et, indirectement, de rechercher des mutants auxotrophes puisque certains gènes contrôlant la synthèse des acides aminés agiraient comme activateurs de la transcription des gènes de la symbiose.

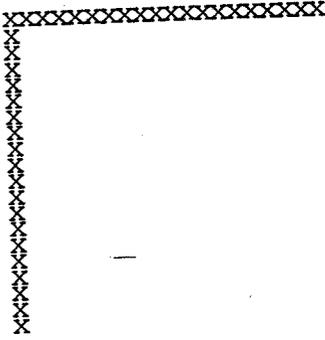
Jusqu'à maintenant, l'isolement de mutants a été réalisé à l'aide de plusieurs agents mutagènes : physiques (rayons X, U.V., etc...), chimiques (N-méthyl - N'-nitro - N-nitrosoguanidine, éthyl méthyl sulfonate, etc...) et récemment biologiques (éléments transposables).

L'utilisation des deux premiers types d'agents mutagènes sont dangereux pour la santé car la plupart sont cancérigènes par contamination de la peau ou par respiration de ces produits lors des manipulations. En plus, ces agents sont coûteux, tandis que l'emploi d'éléments transposables comme agents mutagènes ne manifeste aucun danger biologique. En outre, nous avons employé ceux-ci afin de pouvoir récolter des mutants différents de ceux obtenus par les autres agents, car chaque agent a un mode d'action particulier qui se traduit par l'affinité pour certaines séquences d'ADN.

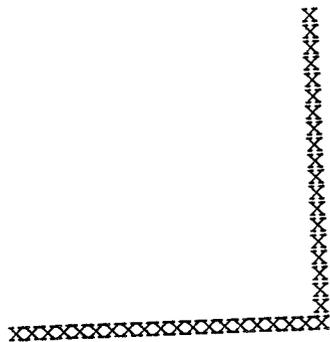
Avant d'exposer les résultats de notre travail, nous présentons une étude bibliographique en deux parties distinctes :

- Généralités sur les éléments transposables et en particulier le transposon Tn5 .

- Problème du support de gènes de la symbiose sur le matériel génétique et en particulier la relation entre ces gènes et l'existence de plasmides chez les différentes espèces de Rhizobium.



INTRODUCTION



I - LA DÉCOUVERTE DES ÉLÉMENTS TRANSPOSABLES CHEZ LES BACTÉRIES

En 1960, MALAMY (56) et SHAPIRO (80) trouvèrent un nouveau genre de mutation affectant les gènes d'une souche d'Escherichia coli. Ce caractère nouveau ne pouvait alors être expliqué par aucun mécanisme de mutation connu. Les fragments d'ADN touchés étaient des particules de bactériophage lambda portant le gène bactérien pour l'utilisation du galactose (gal). Les virions Gal⁻ et Gal⁺ ont été centrifugés en gradient de chlorure de césium. Les particules Gal⁻ se sont révélées plus denses que celles portant les gènes normaux. On a donc constaté que l'augmentation du poids moléculaire des particules Gal⁻ impliquait qu'elles contenaient une molécule d'ADN plus grande que les particules originales. A la lumière de ces données, on conclut qu'un nombre limité d'autres fragments ayant jusqu'à 2 000 nucléotides de long pouvaient s'intégrer dans des gènes différents, interrompant leur continuité et inhibant leur activité. Ces auteurs ont donné à ces éléments le nom de "séquence d'insertion" (IS).

A côté de ces résultats, HEDGES et JACOB (37) ont observé que des gènes de résistance aux antibiotiques étaient transférés d'un ADN plasmidique à un autre à l'intérieur d'une même cellule. Ceci était prouvé par le fait que le plasmide, ayant reçu la résistance à la pénicilline et à l'ampicilline, avait subi un accroissement de taille. Ces auteurs émirent l'hypothèse que le gène de la résistance à l'ampicilline était porté par un fragment d'ADN qui pouvait être "transposé", c'est-à-dire qui pouvait se déplacer d'une molécule d'ADN à une autre, et ils ont nommé ce type d'élément "transposon".

II - LES DIFFÉRENTS GROUPES D'ÉLÉMENTS TRANSPOSABLES

Il semble qu'on peut classer les éléments transposables en quatre catégories selon leur taille et selon les gènes qu'ils portent :

A - IS (Séquence d'insertion) :

Ce sont des séquences d'ADN ne renfermant que de(s) gène(s) codant pour leur fonction d'insertion et dont la taille est inférieure à 2 000 paires de bases. Exemples : IS1, IS2, IS3, etc...

L'impossibilité de détecter d'autres gènes sur les séquences d'insertion se traduit par le fait que leur présence sur le matériel génétique ne se manifeste par aucun caractère phénotypique supplémentaire, compte-tenu de l'éventuelle mutation provoquée par leur insertion.

Ceci prouve qu'ils ont une origine endogénique, car plusieurs copies de ces éléments peuvent toujours exister chez une cellule d'E. coli, sauf dans le cas du IS4, qui se trouve à l'état d'une seule copie chez plusieurs souches d'E. coli K-12 (20).

B - Tn (Transposon) :

Ces éléments sont plus complexes que les séquences d'insertion et contiennent souvent des séquences d'insertion sur leurs extrémités. En plus des gènes nécessaires à la transposition, ils possèdent un ou deux gènes conférant la résistance aux antibiotiques comme la plupart de transposons. Cependant, le transposon Tn501 code pour une résistance aux ions mercuriques (84) et le transposon Tn951 porte un opéron d'utilisation du lactose (23). Leur taille est supérieure à 2 000 paires de bases.

L'intérêt de l'utilisation des transposons au point de vue de la génétique bactérienne moderne se traduit par d'importantes propriétés (47) :

1. Les transposons conférant la résistance aux antibiotiques peuvent être trouvés insérés dans un grand nombre de sites sur le chromosome bactérien ;

2. Les gènes au niveau desquels sont insérés les transposons perdent complètement leur fonction ;

3. Le phénotype de la mutation d'insertion est étroitement lié à la résistance aux antibiotiques lors de croisements génétiques ;

4. Des mutations d'insertion peuvent être trouvées à haute fréquence après mutagenèse par les transposons ;

5. La mutation d'insertion réverse par une excision précise avec une perte concomitante de la résistance ;

6. Leur insertion dans des opérons sont fortement polaires ;

7. L'insertion des transposons peut provoquer une délétion adjacente ;

8. Les transposons peuvent fournir une région transportable d'homologie ;

9. L'insertion se comporte comme une mutation ponctuelle utile pour l'établissement d'une carte génétique ;

10. L'insertion peut être obtenue de façon spécifique.

11. L'utilisation des plasmides d'Agrobacterium tumefaciens comme vecteurs pour le génie génétique des cellules végétales, apparaît prochaine après la démonstration qu'un transposon inséré dans le plasmide Ti et dénommé "T-DNA" peut être transféré dans le génome de la cellule

végétale (39). En effet, ces bactéries pathogènes de plantes supérieures possèdent toutes ce plasmide dont l'une des caractéristiques est de porter des gènes codant pour le métabolisme d'acides aminés inhabituels appelés les "opines" (nopaline, octopine, ...).

L'obtention de plantes synthétisant des opines et la transmission de ce caractère à la descendance de quelques unes de ces plantes indiquent qu'il sera peut être possible d'utiliser ce système pour modifier le génome des végétaux.

Le tableau ci-après résume les caractères des neuf premiers transposons qui ont été découverts (47).

C - Episomes :

Ce sont des éléments transposables géants contenant souvent des séquences d'insertion (IS) et des transposons (Tn). Leur réplication est autonome et peut donner plusieurs copies de la molécule par cellule. Le facteur F d'E. coli porte une séquence d'insertion IS3 qui permet son intégration en divers endroits du chromosome (70).

D - Bactériophage :

Le cas particulier du bactériophage Mu : celui-ci peut intégrer son ADN dans le chromosome bactérien, formant alors un "prophage" latent qui coexiste avec la bactérie et se transmet à sa descendance lorsqu'elle se divise. Cependant, à l'opposé des autres phages tempérés, celui-là peut s'intégrer en de nombreux sites du chromosome, créant ainsi un grand nombre de mutations différentes chez l'hôte bactérien.

Si le phage Mu quitte le site au niveau duquel il était

TRANSPOSON	RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	ORIGINE PLASMIDIQUE	TAILLE APPROXIMATIVE (EN PAIRES DE BASES)	EXTREMES EN REPETITION (EN PAIRES DE BASES)	SPECIFICITE DU SITE D'INSERTION	GENERATION DE DELETIONS	DUPLICATION AU NIVEAU DU SITE D'INSERTION (EN PAIRES DE BASES)
Tn1	Ap	RP4	4 800	140, inversées	incertaine	oui	ID
Tn2	Ap	RSF1030	4 800	140, inversées	faible	ID	ID
Tn3	Ap	R1	4 957	140, inversées	faible	ID	5
Tn4	Ap, Su, Km	R1	20 500	140, inversées	faible	ID	ID
Tn5	Km	JR67	5 700	1532, inversées homologues à IS50	faible	oui	9
Tn6	Km	JR72	4 100	ID	ID	ID	ID
Tn7	Sm, Tp	R483	ID	ID	élevée	ID	ID
Tn9	Cm	pSM14	2 638	800, non-inversées homologues à IS1	incertaine	oui	9
Tn10	Tc	R222	9 300	1400, inversées homologues à IS3	moyenne	oui	9

TABEAU I : CARACTERES DES NEUF PREMIERS TRANSPOSONS

Symboles : Ap = Ampicilline ; Su = Sulfonamide ; Km = Kanamycine ; Tp = Triméthoprime ; Cm = Chloramphénicol ; Tc = Tétracycline ; Sm = Streptomycine ; ID = Indéterminé.



inséré, il emporte un nombre important de nucléotides de l'hôte et détermine des délétions irréparables. Lorsque le phage Mu infecte une nouvelle cellule, il perd l'ancien ADN bactérien et il est transposé sur un site du chromosome du nouvel hôte (88).

BUKHARI et coll. (17) ont montré que la capacité du phage Mu à se répliquer est étroitement associée à celle d'être transposé. Des expériences ont montré que la transposition du phage Mu du chromosome bactérien sur les plasmides impliquait le transfert du gène histidine (his) sur le plasmide entre deux copies de Mu.

L'ADN de bactériophage λ peut être considéré comme un élément transposable lors de son phénomène de lysogénisation, uniquement parce que son intégration n'est pas dépendante du fonctionnement du gène rec A. Cependant, son mécanisme d'intégration dans le chromosome d'E.coli est différent de celui des éléments transposables (63).

Notre travail portant sur l'obtention de mutants chez Rhizobium meliloti par introduction, puis insertion du transposon Tn5 , nous avons jugé nécessaire d'exposer dans le paragraphe suivant sa structure et ses propriétés.

III - STRUCTURE ET PROPRIÉTÉS DU TRANSPOSON Tn5

Le transposon Tn5 porte un gène qui confère la résistance à la kanamycine (5 , 9), en spécifiant la structure de l'enzyme aminoglycoside 3-phosphotransférerase I. Cette dernière inactive la

kanamycine en transformant le groupement 3-hydroxyl de cet antibiotique en groupement phosphoryl (7 , 90).

Ce transposon avait été découvert pour la première fois pendant la croissance du phage λ en présence d'une souche d'E. coli possédant le plasmide JR67. L'analyse phagique montra qu'un gène de la résistance à la kanamycine avait été inséré sur l'ADN du bactériophage λ (5).

Son intégration pouvait avoir lieu dans des bactéries mutantes auxquelles manquait une protéine particulière, produit du gène rec A, que l'on savait indispensable à la recombinaison homologue (21 , 22 46). Cette intégration dépendrait de la reconnaissance de courtes séquences d'ADN homologues, donc du nombre de sites contenant celles-ci. Elle peut se faire au niveau d'un génome bactérien dépourvu de séquences homologues étendues (18 , 86).

Comme le transposon Tn5 est transféré en tant qu'unité génétique distincte et caractéristique, il doit exister un mécanisme enzymatique hautement spécifique capable de couper l'ADN à ces emplacements précis.

Des expériences montrent que ce transposon code pour une enzyme appelée "transposase" qui est nécessaire à la transposition (FIGURE I) et pour une substance répresseur qui régule à la fois sa propre synthèse et la transcription en ARN du gène de la transposase (36 , 61).

La taille du transposon Tn5 est de l'ordre de 5 700 paires de bases. Ses extrémités font 1 532 nucléotides de long et sont en fait

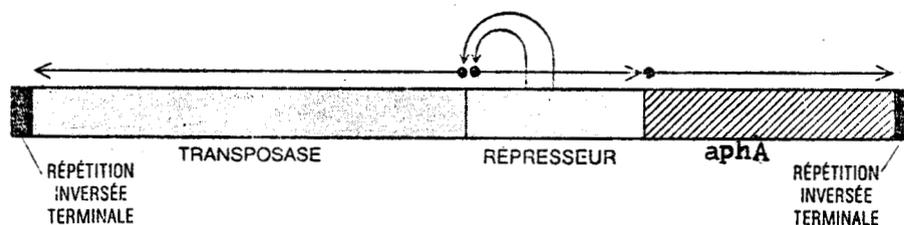


FIGURE I : LES CONSTITUANTS FONCTIONNELS DU Tn5

L'analyse génétique montre qu'il y a au moins 4 types de régions (l'échelle n'est pas respectée) : les extrémités en répétitions inversées ; un gène codant pour une enzyme, l'aminoglycoside 3-phosphotransférase I (aphA) qui confère la résistance à la kanamycine ; un gène codant pour une enzyme nécessaire à la transposition (une transposase) et un gène codant pour une protéine répresseur qui contrôle la transcription des gènes de la transposase et du répresseur lui-même. Les flèches indiquent le sens dans lequel est transcrit l'ADN des différentes régions.

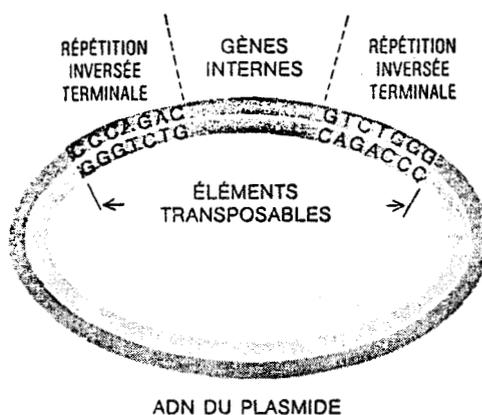


FIGURE II : LES SEQUENCES DE NUCLEOTIDES EN REPETITIONS INVERSEES DES EXTREMITES DES ELEMENTS TRANSPOSABLES.

1

constituées de deux copies de la séquence d'insertion IS50 (8). La microscopie électronique a montré également que les deux extrémités avaient une propriété singulière : elles étaient constituées de séquences de nucléotides complémentaires les unes des autres, mais disposées en sens inverse (46,87) ; par exemple, la séquence de nucléotides CCCAGAC est complémentaire de la séquence GICTGGG (FIGURE II).

Les deux séquences d'insertion IS50 n'ont pas une fonction identique ; celle qui se trouve sur l'extrémité à droite est nécessaire à la transposition du transposon Tn5, tandis qu'une seule paire de bases située sur la séquence d'insertion IS50 sur l'autre extrémité stimule la synthèse du promoteur nécessaire à l'expression du gène de la résistance à la kanamycine (35).

YAMAMOTO et YOKOTA (93) ont établi la carte de restriction du transposon Tn5 installé sur le plasmide JR67 (FIGURE III), en digérant ce dernier par des endonucléases de restriction et en séparant les fragments par migration en gel d'agarose. Ces auteurs ont trouvé que les enzymes de restriction suivantes : BamHI, XhoI, SalI, PstI et SmaI coupent au niveau de la région centrale portant le gène de la résistance à la kanamycine, tandis que les enzymes XhoI, PstI, Hind III coupent au niveau des deux extrémités.

L'insertion du transposon Tn5 affecte les gènes adjacents du site d'insertion en créant une délétion (5, 6), et elle provoque également le dédoublement d'une séquence de neuf paires de nucléotides sur l'ADN receveur (75). Les séquences dédoublées encadrent l'élément

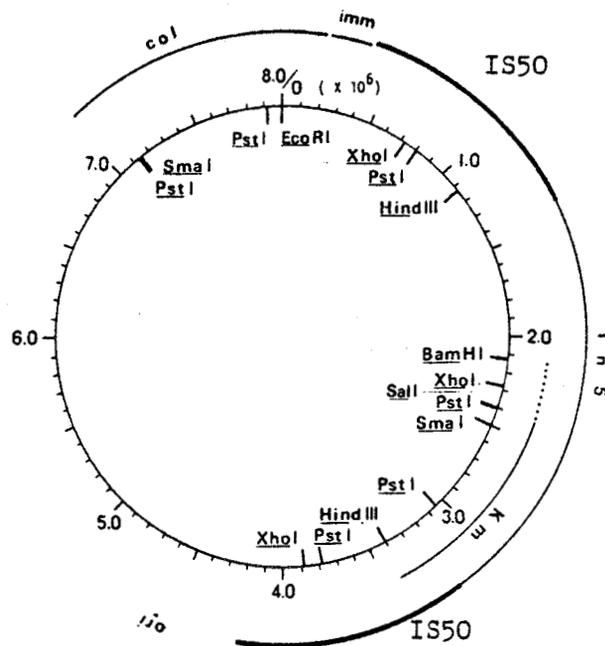


FIGURE III : LA CARTE DE RESTRICTION DU TRANSPONON Tn5 ETABLIE PAR YAMAMOTO ET YOKOTA (93).

Celui-ci est intégré au niveau du plasmide JR67.

515

d'insertion et sont immédiatement adjacentes à ses extrémités en répétitions inversées, car l'une des étapes du processus d'intégration comprend une cassure décalée des brins d'ADN complémentaires au niveau du site choisi pour l'intégration (71)

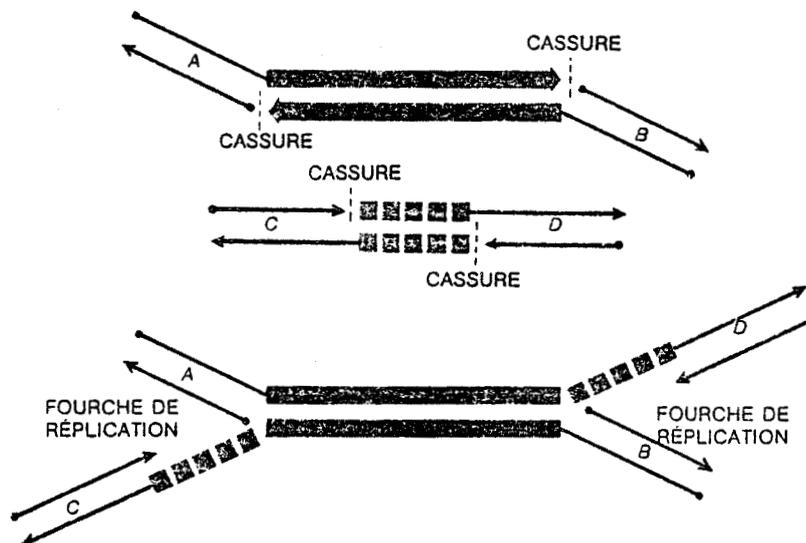


FIGURE IV : CASSURE DECALEE DES BRINS D'ADN COMPLEMENTAIRES.

L'intérêt de l'introduction du transposon Tn5 dans une cellule bactérienne réside dans son insertion en de multiples points du chromosome provoquant des mutations polaires. En utilisant comme vecteur un phage λ dont l'ADN porte le transposon Tn5 et a subi une délétion au niveau de gènes codant pour son attachement sur le chromosome d'E. coli,

SHAW et BERG (81) ont obtenu plus de 300 mutants auxotrophes. Des mutants dans au moins 45 citrons différents ont été observés, mais la distribution des sites d'insertion n'était pas due au hasard ; en effet, il y avait prédominance des mutants proA, proB, cysG, cysH, cysD ou cysC.

Donc le transposon Tn5 peut s'intégrer en de multiples sites à l'intérieur d'une molécule réceptrice d'ADN, mais cette intégration ne se fait pas exactement au hasard. Certaines régions d'ADN sont des "points chauds" qui se prêtent à de multiples intégrations de transposons.

Ceci peut s'expliquer par le fait que le transposon Tn5 s'intègre préférentiellement au voisinage de séquences de nucléotides complémentaires à celles de ses extrémités en répétitions inversées.

Une étude récemment publiée chez une souche d'E. coli montre que la fréquence d'excision du transposon Tn5 intégré sur le gène lactose (Lac : Tn5) est liée au site d'insertion. En outre, les extrémités en répétitions inversées contrôlent ce phénomène (35).

IV - PLASMIDE "SUICIDE" PORTANT DES TRANSPOSONS

Un moyen efficace pour introduire des transposons chez R. meliloti consiste à transférer chez cette bactérie des plasmides hybrides composés d'un plasmide du groupe d'incompatibilité P1 (à large spécificité d'hôte chez les bactéries gram négatives) portant l'ADN du bactériophage Mu.

En effet, BOUCHER et coll., en 1977, (14) ont constaté que la fréquence de transfert du plasmide hybride RP4::Mu_{cts} (mutant thermosensible de Mu) était fortement inférieure de 4 à 5 puissances à celle du plasmide RP4 seul chez R. meliloti 2011 (de l'ordre de 10^{-4}) ; ces auteurs pensaient pouvoir introduire l'ADN du bactériophage Mu chez Rhizobium afin d'obtenir des mutants par l'insertion de celui-ci, et provoquer ensuite une éventuelle intégration du plasmide RP4 dans le chromosome. Ce phénomène de non-expression de ces plasmides hybrides R-Mu chez Rhizobium (12) et Agrobacterium (91) qui leur a valu la dénomination de plasmide "suicide" (42), est probablement dû à leur destruction, sans doute par des enzymes de restriction (12).

Cependant, ce comportement n'est pas observé chez les entérobactéries où ces plasmides sont transférés entièrement et à une fréquence élevée.

Des auteurs ont remarqué que de tels plasmides "suicide" portant divers transposons pouvaient servir de vecteurs pour l'introduction et l'insertion de ces transposons chez Rhizobium et Agrobacterium à des fréquences variables, en l'absence de répllication du plasmide vecteur. Ceci constitue un moyen intéressant de mutagenèse par insertion de transposon chez ces bactéries.

Le plasmide "suicide" employé dans le présent travail a été construit par R. SIMON (82) de l'Université de Bielefeld (R.F.A.) ; nous en résumons les étapes ici :

1. Le plasmide R751 transférable (tra) et portant le transposon Tn402 conférant la résistance au triméthoprime provient de Klebsiella aerogenes (43) et appartient au groupe d'incompatibilité P1 de Pseudomonas (équivalent au groupe d'incompatibilité P chez E. coli). La souche d'E. coli C600 portant le plasmide R751 a été mise en présence du phage $\text{Mu}_{\text{C}+}$; celui-ci, après infection de la cellule, s'insère au hasard dans le chromosome ou dans le plasmide R751. Par conjugaison avec une population réceptrice résistante à l'acide nalidixique (Nal^{r}) et portant le phage Mu_{Cts} (induit à 42° C), suivie d'une sélection à 42° C sur milieu contenant du triméthoprime et de l'acide nalidixique, seuls les transconjugants ayant acquis le plasmide $\text{R751}::\text{Mu}_{\text{C}+}$ survivent, car l'allèle $\text{Mu}_{\text{C}+}$ est dominant sur l'allèle Mu_{Cts} .

2. Par transfert de ce plasmide $\text{R751}::\text{Mu}_{\text{C}+}$ à des souches d'E.coli portant divers transposons sur leur chromosome ou sur un autre plasmide R, puis conjugaison ultérieure avec sélection des résistances correspondant à celle du R751 et des transposons, R. SIMON a obtenu un plasmide "suicide" $\text{R751}::\text{Mu}_{\text{C}+}$, Tn1 (Ap), Tn5 (Km), Tn1771 (Tc) .

V - PROBLÈME DU SUPPORT DES GÈNES DE LA SYMBIOSE

Il nous a paru intéressant d'employer ce système afin d'isoler des mutants de R. meliloti affectés sur leurs propriétés symbiotiques ; en effet, jusqu'en 1980, de tels mutants ont été obtenus par action d'agents chimiques.

Dans ce qui suit, nous décrivons les procédés qui ont été employés chez Rhizobium pour obtenir ces mutants, puis nous parlerons d'études récentes concernant le support génétique des propriétés symbiotiques chez cette bactérie, en particulier :

- les arguments en faveur de la situation sur des plasmides de gènes codant pour la nodulation et la fixation de l'azote ;
- le cas des plasmides géants.

A - Procédés d'obtention de mutants déficients du point de vue symbiotique :

Une approche indirecte du problème de la localisation des gènes nif sur le matériel génétique a été rendue possible grâce à l'obtention de mutants auxotrophes inefficients en présence d'un agent mutagène chimique puis à leur passage sur plantules.

BERINGER et coll. (10) ont constaté que 3 % des survivants d'une souche de Rhizobium leguminosarum traitée par la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) étaient inefficients. La moitié de ces mutants originaux se sont avérés efficaces à 13° C ; il s'agit donc de mutants thermoconditionnés.

D'autre part, des mutants non-nodulants ont été isolés par MAIER et BRILL (57) à partir d'une souche de Rhizobium japonicum en employant le même agent mutagène.

Une souche inefficace induisant la formation de nodules roses a été isolée ; elle est caractérisée par la présence de léghémoglobine, conjointement synthétisée par les deux partenaires (une des raisons du fonctionnement préférentiel de la nitrogénase en symbiose).

L'analyse du mutant a montré qu'il est défectueux au niveau de composant II de la nitrogénase (26).

Certains auteurs ont remarqué chez différentes espèces de Rhizobium (R. meliloti, R. trifolii, R. leguminosarum) que les exigences en bases nucléiques, leucine, histidine et riboflavine sont étroitement associées à l'efficiencia : le passage à l'état prototrophe de ces souches provoque le retour de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, ce qui n'est pas le cas après addition de l'exigence (27, 28, 76, 79).

Par contre, les mutants exigeants en arginine, glycolle, cystéine, méthionine, tryptophane et phénylalanine ne montrent aucune relation avec les propriétés symbiotiques (28, 76).

La transduction est une autre façon d'étudier la prototrophie. En effet, un mutant $Lys^- Nod^-$ de R. trifolii et un autre $Leu^- Nod^-$ de R. meliloti sont devenus prototrophes et à nouveau capables de noduler les racines de légumineuse en introduisant dans le génome un segment d'ADN portant le gène convenable (50, 51).

Diverses hypothèses ont été suggérées : la plante-hôte ne peut pas fournir la substance indispensable aux mutants pendant les différentes étapes de la symbiose, ou bien le produit final de leur biosynthèse est impliqué dans le processus de la symbiose.

A propos de révertants de R. meliloti exigeants en isoleucine + valine, certains sont Nod^+ et d'autres Nod^- ; ceci suggère que le produit final de la biosynthèse de l'isoleucine intervient indirectement dans le processus symbiotique (28).

Enfin, LUDWIG et SIGNER (55) ont sélectionné un mutant de Rhizobium "cowpea" 32H1 bloqué au niveau du gène synthétisant la glutamine synthétase [GS; E.C.6.3.1.2.] en utilisant la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. La mutation est étroitement liée avec l'efficacité. Ces auteurs ont conclu que cette enzyme agissait comme un activateur de la transcription des gènes nif.

De notre côté, après traitement de la souche de R. meliloti 2011 par l'éthylméthylsulfonate, nous avons isolé trois mutants incapables de synthétiser la glutamate synthase [GOGAT ; E.C.1.4.1.13] . Ceux-ci présentent une activité nitrogénasique comparable à celle de la souche sauvage, d'où l'absence de relation entre cette mutation et les propriétés symbiotiques (1).

En établissant la carte génétique de Rhizobium (11 , 44) , 48 , 59), aucun gène codant pour les caractères d'infectivité ou d'efficacité n'a pu être identifié et localisé sur le chromosome de Rhizobium, car il n'a pas été possible d'isoler chez Rhizobium des mutants Nif⁻, sélectionnés par l'incapacité à se développer sur milieu gélosé dépourvu de source d'azote, comme dans le cas de bactéries fixatrices libres de l'azote telles Klebsiella (31 , 32 , 85) et Azotobacter (58 , 65). Signalons que ceci n'a pas été mis en évidence pour les Rhizobium fixateurs libres à la suite de la sensibilité de leur nitrogénase à l'oxygène. Donc les gènes de l'efficacité pourraient être situés soit sur le chromosome bactérien, ou sur de(s) plasmide(s) indigène(s) ou sur une combinaison de ces deux structures.

B - Preuves en faveur des plasmides de Rhizobium comme support de gènes codant pour les propriétés symbiotiques :

Depuis quelques années, des recherches sont axées sur l'ADN extrachromosomique (ou plasmide) présent dans différentes espèces de Rhizobium, afin de voir s'il existe une relation entre ces macromolécules et les propriétés symbiotiques de la bactérie.

En effet, d'après les travaux d'HIGASHI en 1967 (40), il a été montré que les plasmides indigènes de Rhizobium sont impliqués dans les processus de nodulation, par le fait qu'il a réussi à transférer la spécificité d'hôte de R. trifolii à Rhizobium phaseoli ; il a obtenu ainsi des R. phaseoli capables de noduler le trèfle.

Des auteurs ont également transféré cette spécificité à R. leguminosarum et Agrobacterium tumefaciens au moyen d'un plasmide de R. trifolii marqué par le transposon Tn5 (pRtr5a::Tn5). La première souche ayant acquis ce plasmide avait le pouvoir de noduler le trèfle ainsi que sa plante-hôte originale (pois). Cependant, les clones hybrides d'A. tumefaciens ont provoqué uniquement des poils absorbants sur les racines de pois (42).

En outre, les gènes nif de R. trifolii ont été transférés à une souche de K. aerogenes déficiente du point de vue de la fixation de l'azote (34) et à une souche de R. trifolii inefficace (96). La fréquence de transfert obtenue est en faveur d'un plasmide comme porteur des gènes nif.

SKOTNICKI et coll. (83) ont transmis, à l'aide du plasmide conjugatif RI-19drd, les gènes de la fixation de l'azote de R. trifolii

à une souche d'E. coli en irradiant aux U.V. la souche donatrice pour stimuler la mobilisation du plasmide indigène portant les gènes nif (34). Ils ont sélectionné ainsi une souche hybride d'E. coli fixatrice libre d'azote en conditions d'anaérobiose. L'avantage pratique du plasmide R1-19drd, c'est qu'il permet le transfert d'importants fragments d'ADN : par conséquent, les gènes gal (galactose), bio (biotine), chl (chlorate), etc... ont été transmis en même temps. Ceci a pu être utilisé pour positionner un nombre de caractères relativement faibles.

Une perte de l'efficiencia a été constatée chez R. trifolii à la suite de traitements par l'acridine (33) ; ZURKOWSKI et coll. (94) ont également provoqué la perte de l'infectivité chez la même espèce, mais cette fois grâce à l'emploi d'acriflavine et de lauryl-sulfate de sodium. D'autre part, le traitement par une température de 45° C provoque une exclusion du plasmide moyen de R. trifolii LPR5035 avec perte concomitante de l'infectivité (42).

Un plasmide conjugatif (pRL5JI) codant pour la synthèse d'une bactériocine et contenant les gènes (Nod) et (Fix) a été mis en évidence chez R. leguminosarum. Ce plasmide a été transféré à une souche non-nodulante de la même espèce (16).

Le transfert de ce plasmide à une autre espèce (R. phaseoli) a rendu les dérivés de R. phaseoli capables de noduler médiocrement le pois (13). En outre, un plasmide de la famille (pRLIJI) avait supprimé la mutation d'une souche inefficace de R. leguminosarum en introduisant les gènes nif dans cette dernière (15). Tout ceci suggère que certains caractères sont portés par ce plasmide en plus des gènes nif.

La présence de plasmides chez Rhizobium a d'abord été prouvée par des méthodes physico-chimiques basées sur l'ultracentrifugation en gradients alcalins de saccharose ou en gradients de chlorure de césium contenant du bromure d'éthidium. Des plasmides de tailles variables ont ainsi été mis en évidence (4 , 25, 95). Actuellement, l'électrophorèse en gel d'agarose constitue le moyen le plus rapide, et le plus économique pour la détection de ces molécules ; des plasmides de taille élevée, dont le poids moléculaire s'échelonne de 50 à plus de 200 mégadaltons (Md), ont ainsi été mis en évidence (19, 29).

C - Les plasmides géants :

En outre, des études récentes ont détecté des plasmides cryptiques géants chez plusieurs espèces de Rhizobium (52 , 73). Leur poids moléculaire est supérieur à 300 Md. On pense qu'ils portent près de 300 gènes compte tenu de leur taille. Jusqu'à présent, le rôle de ces gènes est inconnu. Est-ce qu'ils contrôlent quelques relations entre les deux partenaires ? C'est l'avenir des recherches sur les Rhizobium.

En effet, des auteurs ont démontré que certains gènes codant pour la synthèse de la nitrogénase et des gènes contrôlant la formation de nodules sont localisés sur les plasmides géants de R. meliloti L5-30 et 41 (73). La perte du pouvoir infectieux de ces souches serait due à une délétion spontanée sur le plasmide géant de la souche L5-30, et à une délétion sur le plasmide de la souche 41 à la suite d'un traitement par la température. L'hybridation entre ces deux plasmides et le plasmide pSA30 portant les gènes nif D et nif H de K. pneumoniae prouve que des

gènes nif sont localisés sur les plasmides géants. Cependant, la migration en gel d'agarose ne montre pas une différence de taille du plasmide géant par rapport à celui de la souche sauvage L5-30 . Par contre, une différence est constatée dans le cas de la souche 41, à la suite d'une grande délétion sur son plasmide géant.

L'état actuel des connaissances sur les gènes nif d'une souche fixatrice libre d'azote de K. pneumoniae fournit un moyen indirect pour l'étude de ces gènes chez le Rhizobium en comparant les gènes nif de ces deux bactéries. L'hybridation de segments d'ADN clonés de R. japonicum avec un plasmide portant des gènes nif de K. pneumoniae montre une homologie entre les gènes codant pour les deux nitrogénases. Cette homologie concerne les gènes nif H et nif D (38). Une homologie a été prouvée également entre les gènes nif de K. pneumoniae portés sur le grand plasmide de R. leguminosarum (49 , 64) et R. trifolii (RUVKUN et AUSUBEL, résultats non publiés).

Enfin, le plasmide Ti d'A. tumefaciens a été transmis par conjugaison à une souche de R. trifolii (41 , 68) ; cette dernière est capable d'induire des tumeurs sur des plantes supérieures, mais elle est restée efficiente sur sa légumineuse hôte. Ceci suggère que les plasmides indigènes de la souche réceptrice et de la souche donatrice n'appartiennent pas au même groupe d'incompatibilité.

Toutes ces données suppriment l'hypothèse que les gènes nif sont partagés entre les deux partenaires de la symbiose.

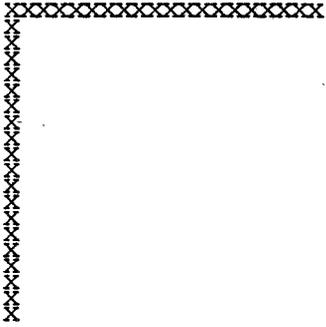
Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé dans le but de rechercher des souches dans lesquelles l'insertion du transposon Tn5 s'effectue avec une forte efficacité ; ensuite, nous avons recherché des mutants affectés sur les propriétés symbiotiques de trois manières :

1° - Recherche de mutants Fix^- ou Nod^- par passage direct sur les plantes de clones prototrophes ayant acquis le transposon Tn5 .

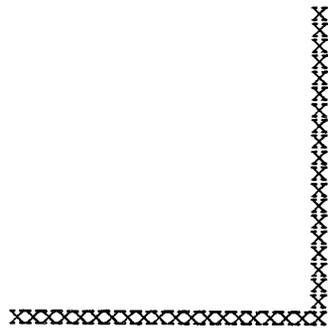
2° - Isolement après transposition de mutants auxotrophes qui nous permettent de déterminer les sites précis d'insertion de ce transposon ; étude de leurs propriétés symbiotiques.

3° - Etude de nouveaux mutants provenant des précédents et ayant subi des remaniements de leur génome par transposition endocellulaire, ce qui pouvait conduire à l'isolement indirect de mutants Fix^- ou Nod^- .

En parallèle, nous avons procédé à l'étude du contenu plasmidique afin de détecter une éventuelle modification de celui-ci.



MATERIEL ET METHODES



I - SOUCHES BACTÉRIENNES ET CONSERVATION

Nous avons utilisé vingt souches sauvages de R. meliloti pour vérifier leur capacité à acquérir le transposon Tn5 .

La souche d'E. coli S111 renferme un plasmide "suicide" (pSP601) provenant de R. SIMON. Afin de pouvoir estimer le poids moléculaire des plasmides séparés par électrophorèse, nous avons employé les plasmides des souches témoins d'E. coli J53(RP4) et R. meliloti L5-30, Ls2a, U45 identifiés et mesurés par CASSE et coll. (19).

L'origine et le phénotype de chaque souche étudiée sont mentionnés dans le TABLEAU II.

Les souches sont conservées en milieu RC glucosé à - 20° C en présence de glycérol à 20 % comme antigél pour garder la culture à l'état liquide.

II - MILIEUX DE CULTURES

2.1 - Tampon exempt d'azote RN⁻

MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g

q.s.p. 1 litre d'eau bidistillée ; pH 7,2 à 7,5.

Nous avons employé ce tampon dépourvu d'azote pour laver la culture de Rhizobium avant l'inoculation dans le milieu de NICOL et THORNTON ainsi que pour étudier la synthèse d'exopolysaccharides en non-prolifération.

SOUCHES	ORIGINE	ISOLEMENT	PHENOTYPE
a) <i>E. coli</i>			Thi ⁻ Thr ⁻ Leu ⁻ SuIII Lac ⁻ His ⁺ :: Mu ⁺ _{cts} Tnl (Ap), Tn5 (Km), Tn402 (Tp) Tnl771 (Tc) Mu ⁺ _{ct}
S111 (pSP601)	Dr R. SIMON ; Université de Bielefeld (R.F.A.)		
J53 (RP4)	Dr M. VAN MONTAGU ; Gent (Belgique)		Met ⁻ Pro ⁻ (Tra ⁺ Ap ^r , Km ^r , Tc ^r)
C600	Dr J. COLLINS ; Gesellschaft für Biotechnologische Forschung MbH Braunschweig - Stöckheim (R.F.A.)		ΔTrp Leu ⁻ rk ⁻ mk ⁻ RecA Rif ^r
W3350			sauvage
b) <i>R. meliloti</i>			
2004	M. DYE ; Rothamsted Experimental Station (Grande-Bretagne)	Non connu	sauvage
444	G. TRUCHEF ; Marseille (France)	Non connu	sauvage
44	G. TRUCHEF ; Marseille (France)	Medicago sativa AUSTRALIE 1969	sauvage
12	Research Institute of Ontario (Canada) (R.I.O)	Medicago sativa 1962	sauvage
17	Research Institute of Ontario (Canada) (R.I.O)	Medicago sativa 1963	sauvage
U45	Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (C.S.I.R.O.)	Medicago sativa URUGUAY 1963	sauvage
SJ47	Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (C.S.I.R.O.)	Medicago sativa AUSTRALIE 1939	sauvage
I - 5 Str	C. BONNIER ; Gembloux (Belgique)	Medicago sativa BELGIQUE 1968	Sm ^r
M 21	F. PICHINOTY ; Centre International Agricultura Tropical ; Colombia (C.I.A.T.)	Medicago sativa RHODESIE 1971	sauvage
MSNI	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	Medicago sativa LILLE	sauvage
M3S	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	Medicago sativa LILLE	sauvage
M5S	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	Medicago sativa LILLE	sauvage
M9S	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	Medicago sativa LILLE	sauvage
M11S	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	Medicago sativa LILLE 1972	sauvage
M14S	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	Medicago sativa LILLE	sauvage
M19S	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	Medicago sativa LILLE	sauvage
M22S	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	Medicago sativa LILLE	sauvage
M27S	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	Medicago sativa LILLE	sauvage
M28S	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	Medicago sativa LILLE	sauvage
LS2a	M. ORATON ; Institut National de Recherches Agronomiques (France) (I.N.R.A.)	Non connu	sauvage
LS-30	M. KOWALSKI ; (Pologne)	Non connu	sauvage

TABLEAU II : SOUCHES UTILISEES

AP^r Km^r TC^r Sm^r Rif^r = résistances aux antibiotiques ampicilline, kanamycine, tetracycline, streptomycine, rifamycine.

Thi⁻ Thr⁻ Leu⁻ Met⁻ Pro⁻ Lac⁻ = exigeants en thiamine, thréonine, leucine, méthionine, proline ; incapable de dégrader la lactose

Tra⁺ = plasmide conjugatif qui porte des gènes du transfert.

RecA⁻ = mutant déficient pour la recombinaison.

rk⁻ = mutant déficient du point de vue de la restriction.

mk⁻ = mutant déficient du point de vue de la modification.

Δ = mutant provoqué par une délétion partielle ou totale d'un gène ou d'un opéron.

SuIII = mutant qui supprime la mutation non-sens (ambre).

2.2 - Tampon R

MgSO ₄ , 7 H ₂ O.....	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NH ₄ NO ₃	0,5 g

q.s.p. 1 litre d'eau bidistillée ; pH 7,2 à 7,5

Pour le milieu gélosé, on ajoute 15 g/l d'Agar Difco.

Le tampon R est utilisé couramment pour les dilutions.

Le milieu minimum de croissance est le tampon R auquel on ajoute du glucose à 1 %, de la biotine à 0,01 µg/ml et de la thiamine à 0,5 µg/ml (concentrations finales) : R glc HB₁.

2.3 - Gélose blanche

Elle renferme 7,5 g de Bacto Agar (Difco) par litre d'eau bidistillée et est répartie à raison de 4 ml/tube. Elle est utilisée pour les numérations sur boîtes.

2.4 - Milieu riche RC

MgSO ₄ , 7 H ₂ O.....	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Extrait de levure..... (Bacto Yeast Extract Difco)	1 g

q.s.p. 1 litre d'eau distillée ; pH 7,2 à 7,5

La source de carbone (glucose) est additionnée à la concentration finale de 1 % sous forme d'une solution stérile (105° C, 30 mn).

Ce milieu est utilisé pour la conservation des souches de Rhizobium. Le milieu est éventuellement gélosé (RCG) à l'aide de 15 g/l

de Bacto Agar (Difco). Il est utilisé pour la numération des souches et la sélection des clones ayant acquis le(s) transposon(s) après addition des antibiotiques indispensables.

2.5 - Milieu riche TY

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

q.s.p. 1 litre d'eau distillée ; pH 7,2 à 7,5

Ce milieu est utilisé pour la préculture des souches de Rhizobium.

2.6 - Milieu riche d'ISWARAN (IS)

K ₂ HPO ₄	0,5	g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2	g
FeCl ₃ , 6 H ₂ O.....	0,01	g
NaCl.....	0,2	g
Mannitol.....	10	g
Gluconate de potassium.....	1,5	g
Extrait de levure (Difco).....	2	g

q.s.p. 1 litre d'eau distillée ; pH 6,8 à 7,5

Ce milieu a été utilisé pour la production d'exopolysaccharides solubles par des souches de Rhizobium en prolifération.

2.7 - Milieu riche de LURIA

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

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

Le milieu éventuellement gélosé à 15 g/litre de Bacto Agar (Difco), est utilisé pour la préculture des souches d'E. coli.

2.8 - Milieu de NICOL et THORNTON

K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4$	0,2 g
NaCl.....	0,1 g
$FePO_4$	1 g
$Ca_3(PO_4)_2$	2 g
$FeCl_3$	1 ml d'une solution mère à 10 g/l

Ce milieu est utilisé pour la culture des graines de Luzerne. Il est réparti par 20 ml en tubes de 220 mm de hauteur et 20 mm de diamètre dans lesquels a été introduit un support en papier fort (Whatman 3) assurant le maintien de la graine à la surface du liquide. Ces tubes sont bouchés avec de la gaze renfermant du coton.

Tous les milieux, gélose blanche, tampon RN^- et tampon R, sont stérilisés à 120° C pendant 20 minutes sauf la stérilisation du milieu de NICOL et THORNTON qui s'opère à 105° C durant 30 minutes pour éviter la variation du pH.

III - CROISSANCE BACTÉRIENNE

3.1 - Numération des cellules viables

On prélève 0,5 ml de culture que l'on amène à la dilution désirée avec une série de tubes contenant chacun 4,5 ml de tampon R pour cette dilution, on prélève une partie aliquote de 0,1 ml que l'on incorpore à 4 ml de gélose blanche préalablement fondue et maintenue à 60° C et que l'on coule sur une boîte de milieu solide (méthode de la double couche).

Après solidification, on incube les boîtes à 30° C ; la lecture se fait après 3 jours d'incubation pour le R. meliloti, tandis que les clones d'E. coli apparaissent après 24 heures.

3.2 - Détermination du temps de génération

Nous avons établi la courbe de croissance afin de déterminer le temps de génération de la souche étudiée, en suivant la densité optique de cultures au moyen d'un biophotomètre (I.N.S.E.R.M.).

Les caractéristiques essentielles et les conditions expérimentales de cet appareil sont les suivantes :

- Culture : cet appareil renferme 16 tubes standards de diamètre 18 x 200 mm pouvant contenir 10 ml de milieu.

- Vitesse d'agitation : réglable et continue. Pour nos cultures, nous avons maintenu une vitesse constante de 700 tours/minute. La lecture se fait chaque demi-heure. Lors de chaque lecture, l'agitation du tube est arrêtée, puis celui-ci reprend aussitôt sa position et son

agitation initiales. L'incubation a été réalisée à 30° C. Le temps de génération en phase exponentielle est calculé suivant les formules :

$$K = \frac{\log_N (DO f) - \log_N (DO i)}{T \text{ (heures)}} \dots\dots\dots 1$$

$$\mu = \frac{K}{\log_N 2 = 0,692} \dots\dots\dots 2$$

$$g(H) = \frac{1}{\mu} \dots\dots\dots 3$$

où : $\log_N (DO f)$: logarithme de la densité optique finale en phase exponentielle.

$\log_N (DO i)$: logarithme de la densité optique initiale en phase exponentielle.

T : le temps en heure.

K : taux de croissance Népérien.

μ : taux de croissance numérique : nombre de divisions par unité de temps (par heure).

g : temps de génération.

IV - ANTIBIOTIQUES

4.1 - Solutions d'antibiotiques

Les antibiotiques utilisés dans ce travail sont préparés et additionnés aux concentrations convenables dans les milieux à partir des solutions mères suivantes : Km, 30 mg/ml ; Tc, 1 mg/ml ; Sm, 40 mg/ml ; Ap, 5 mg/ml ; Rif, 1 mg/ml d'eau distillée ; celles-ci sont conservées à + 4° C.

A propos de la rifamycine SV, celle-ci est utilisée le lendemain de sa préparation, car il s'agit d'un produit instable dans l'eau.

Les stérilisations des solutions d'antibiotiques s'effectuent par filtration sur unité de filtration stérile Millipore "Millex" de porosité 0,2 μm , sauf dans le cas du triméthoprim qui est additionné directement dans le milieu gélosé à concentration finale de 1 mg/ml et l'ensemble est stérilisé à 105° C durant 30 mn, parce qu'il est insoluble dans l'eau.

4.2 - Obtention de mutants résistants à la streptomycine

Ces travaux ont été réalisés dans le but d'isoler des mutants de Rhizobium résistants à la streptomycine en vue d'avoir un moyen de sélection des clones ayant acquis le transposon Tn5 .

Les bactéries sont cultivées en milieu riche TY jusqu'en fin de phase exponentielle, puis 0,1 ml de cette suspension est étalé par la méthode de double couche sur des boîtes de Petri contenant du milieu RCG additionné de la streptomycine à la concentration de 400 $\mu\text{g/ml}$. Les clones apparus sont purifiés par isolements successifs sur le même milieu.

4.3 - Détermination de la résistance aux antibiotiques

Cette méthode consiste à repiquer les clones testés sur des boîtes de Petri renfermant du milieu gélosé auquel on ajoute l'antibiotique convenable à la concentration désirée. Le repiquage se fait à l'aide d'un

fil de platine sur une boîte placée au-dessus d'une grille permettant de les repérer. On peut ainsi tester 37 clones par boîte.

V - TRANSPOSITION

5.1 - Technique de croisement

La souche d'E. coli S111 (pSP601) est précultivée dans le milieu de LURIA glucosé, celle de R. meliloti dans le milieu TY, jusqu'à l'obtention d'une croissance bactérienne en fin de phase exponentielle (environ DO = 1 à 600 nm).

On effectue les mélanges suivants :

Témoin <u>Rhizobium</u>	{	1 ml de milieu LURIA
	{	1 ml de <u>Rhizobium</u>
Témoin <u>E. coli</u>	{	1 ml de milieu TY
	{	1 ml d' <u>E. coli</u>
Croisement	{	1 ml de <u>Rhizobium</u>
	{	1 ml d' <u>E. coli</u>

Après avoir effectué les mélanges, on filtre sur membrane (SARTORIUS Ø 35 mm, porosité 0,2 µm) stérile déposée sur un appareil de filtration SARTORIUS.

Une fois les bactéries recueillies sur le filtre, celui-ci est déposé stérilement dans une boîte de Pétri contenant du RCG additionné

de glucose à 1 %. Après incubation à 30° C pendant 18 heures, la membrane est reprise, placée dans un tube à centrifugation contenant 5 ml de milieu R, puis fortement agitée.

Après centrifugation, le culot est remis en suspension dans 5 ml de milieu R et recentrifugé pour effectuer un deuxième lavage. On procède de la même manière pour les deux souches qui servent de témoins pour le contrôle du taux de réversion et de mutation spontanée. On effectue des dilutions du milieu R jusqu'à 10^{-6} pour les trois mélanges.

On prélève une partie aliquote de 0,1 ml de la dilution appropriée que l'on étale sur les différents milieux de sélection.

Les lectures de clones ayant acquis le transposon Tn5 et le R. meliloti sont faites après quatre jours d'incubation à 30° C, celle d'E. coli après un jour à 37° C.

5.2 - Technique des répliques

On étale sur milieu riche RCG additionné de glucose à 1 %, les boîtes sont incubées à 30° C pendant 3 à 4 jours jusqu'à ce que les colonies apparues atteignent environ 1 mm de diamètre ; on réplique par la méthode de LEDERBERG (53). On fixe un morceau de velours stérile sur un bloc à répliques (cylindre en métal) grâce à un collier à vis. On applique la boîte sur ce velours, afin que chaque colonie laisse une empreinte sur celui-ci, puis on applique une boîte de milieu minimum (RHB₁ glucose 1 %), enfin une boîte de milieu riche RC glc gélosé. La

boîte 1 sert à l'identification des mutants exigeants en un élément se trouvant dans le milieu riche : acide aminé, base nucléique, source d'azote organique, etc... La boîte 3 contenant du milieu riche sert de contrôle. Il faut que tous les clones présents sur la boîte mère se développent sur la boîte 3.

5.3 - Identification des mutants auxotrophes

Les colonies se développant sur la boîte mère, sur la boîte 3 et non sur la boîte 2 sont présumées auxotrophes, et sont testées à nouveau par repiquage, à l'aide d'un fil de platine.

Les clones dont le ou les caractères paraissent stables après plusieurs repiquages successifs sont alors conservés en milieu RC glucosé à - 20° C en présence de glycérol et mis en collection après avoir reçu un numéro d'identification.

Ensuite les mutants sont mis en culture jusqu'en phase exponentielle de croissance, la culture est alors centrifugée, lavée deux fois et reprise dans le tampon R.

Dans le cas où l'on recherche une seule exigence, les mutants sont repiqués sur une série de boîtes en milieu minimum (RglcHB₁) complété par une exigence à la fois.

Dans le cas de la recherche de plusieurs exigences d'un mutant, les clones sont repiqués sur milieu (RglcHB₁) complété de l'un des mélanges suivants :

- Mélange A Alanine (20 µg/ml) + Arginine (20 µg/ml) + Cystéine (20 µg/ml) + Méthionine (20 µg/ml) + Sérine (20 µg/ml) + Thréonine (20 µg/ml) + Glycocolle (20 µg/ml).
- Mélange B Tyrosine (20 µg/ml) + Phénylalanine (20 µg/ml) Tryptophane (20 µg/ml) + Lysine (20 µg/ml).
- Mélange C Histidine (20 µg/ml) + Leucine (20 µg/ml) + Proline (20 µg/ml) + Glutamine (20 µg/ml) + Aspartate (20 µg/ml).
Acide nicotinique (0,15 µg/ml) + Acide folique (0,015 µg/ml) + Phosphate de Pyridoxal (1,5 µg/ml)
- Mélange D Inositol (0,15 µg/ml) + Acide para amino benzoïque (0,075 µg/ml) + Panthoténate de sodium (0,3 µg/ml) + Acide parahydroxy-benzoïque (0,015 µg/ml).
- Mélange E Adénine (30 µg/ml) + Cytosine (30 µg/ml) + Guanine (30 µg/ml) + Thymine (30 µg/ml) + Uracile (30 µg/ml).
- Mélange F Isoleucine (20 µg/ml) + Valine (20 µg/ml).
- Mélange T Renferment tous les acides aminés , les bases nucléiques et les vitamines.

Signalons qu'une solution à 1 % est faite pour chaque acide aminé et base nucléique ; les stérilisations s'effectuent à 105° C pendant 30 minutes.

Si un clone se développe uniquement sur les mélanges A et T par exemple, il s'agit d'un mutant exigeant en plusieurs acides aminés. On cherche alors ses exigences en faisant les combinaisons des acides aminés du mélange A : Ala + Arg, Ala + Cys, Ala + Met, etc...

5.4 - Mesure de la fréquence de réversion de mutants auxotrophes

On effectue des dilutions jusqu'à 10^{-6} à partir d'une culture du mutant qui est déjà lavée deux fois par du tampon R. On coule par la suite 0,1 ml des suspensions bactériennes non diluées et diluées à 10^{-1} sur milieu minimum (Rg1cHB₁) en méthode de double couche. Le nombre de la population bactérienne de départ est déterminé en coulant 0,1 ml des dilutions 10^{-5} et 10^{-6} sur le même milieu minimum supplémenté en exigence convenable.

La fréquence de réversion est calculée comme suit :

$$\frac{\text{Nombre de révertants / ml}}{\text{Nombre de bactéries totales / ml}}$$

La fréquence d'apparition de mutants spontanés est calculée suivant le même principe.

VI - INDUCTION DU PHAGE Mu

Nous nous sommes attachés à utiliser la méthode qui fut mise au point par BOUCHER et coll. (14) pour déterminer la présence du phage Mu_{cts}.

Les souches à tester sont cultivées dans le milieu de LURIA supplémenté de L-tryptophane, 0,1 mM ; CaCl₂, 2,5 mM ; MgSO₄, 1 mM.

L'induction du phage Mu s'effectue à l'aide de chloroforme à raison de 1 ml pour 10 ml de culture à $DO = 1$. Le mélange est agité au moyen d'un homogénéiseur pendant 1 mn. On laisse par la suite à température ambiante durant 15 minutes, puis on centrifuge à 15 000 g pendant 15 minutes à $+ 4^{\circ} C$. Le surnageant est centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions pour éliminer les traces de la lyse bactérienne.

Ensuite, la suspension phagique est stérilisée par filtration sur disque de nitrocellulose "Millex" de porosité 0,2 μm . Juste après la stérilisation, on réalise la lyse de la manière suivante : on dépose 0,1 ml de la suspension de phages dans un tube renfermant 0,3 ml de la souche indicatrice (sensible au phage Mu). Après homogénéisation, on laisse 20 minutes à température ambiante. On coule par la suite 4 ml de gélose blanche dans le tube, puis en double couche dans une boîte contenant le même milieu de LURIA supplémenté. L'incubation se fait à $37^{\circ} C$. Si la lyse est effective, on voit apparaître des petites plages sur la boîte après 24 heures.

VII - DOSAGE DES EXOPOLYSACCHARIDES

A - Dosage chimique

Nous avons appliqué la méthode au phénol sulfurique. Vingt ml de culture sont centrifugés à 15 000 g pendant 30 minutes à $+ 4^{\circ} C$. Le surnageant est centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le surnageant final est traité par 5 volumes d'éthanol glacé, additionné

d'acétate de sodium. La précipitation des exopolysides dure 12 heures à + 4° C. On obtient alors deux phases. La phase inférieure solide, formée par les exopolysides précipités, et la phase supérieure liquide qui contient entre autres le sucre en solution.

Le précipité est repris par 20 ml d'eau bidistillée. A 1 ml de cette solution, on ajoute 1 ml d'eau phénolée à 5 % et 5 ml d'acide sulfurique. On maintient au bain-marie bouillant 5 minutes. On laisse ensuite à l'obscurité 30 minutes. La gamme étalon, de 0 à 1 000 µg/ml, est préparée avec des exopolysides purifiés de Rhizobium préparés antérieurement. Le dosage est ensuite réalisé par mesure de l'absorbance à 510 nm.

B - Dosage radiochimique

La méthode décrite ici fut mis au point dans notre laboratoire par COURTOIS et coll. (24).

L'avantage de cette méthode se traduit par le fait que l'on peut réaliser ce dosage en un temps court (environ 1 heure).

. Synthèse des exopolysaccharides en non-prolifération :

On fait une culture de Rhizobium âgées de 48 heures dans le milieu RC fructosé (1 %), puis on lave par du tampon RN⁻ et on remet en suspension dans le même tampon à la concentration de $1,5 \cdot 10^9$ bactéries/ml. On additionne du fructose à la même concentration précédemment notée et du [D ¹⁴C (u)] fructose (New-England Nuclear : activité spécifique 280 µci /µmole) à la concentration de 1,7 nM dans le milieu de synthèse. Le mélange est alors incubé à 30° C sous agitation durant 24 heures.

. Séparation des exopolysaccharides :

La culture bactérienne est centrifugée le lendemain à 16 300 g pendant 10 minutes.

La séparation se fait par fractionnement au moyen d'un gel de filtration. Celle-ci est réalisée sur colonne de Sephadex G 25 (60 cm x 1,5 cm) éluée par tampon phosphate 0,02 M à la vitesse de 65 ml/heure.

Les 40 premiers millilitres sont exempts de radioactivité, les 40 millilitres suivants contenant la totalité des exopolysaccharides solubles.

On effectue la mesure de la radioactivité de ces derniers 40 millilitres au sein du liquide scintillant de KENNEDY (1 ml de solution aqueuse pour 10 ml Scintillant Lumagel) dans un compteur à scintillation de type LKB.

VIII - INFECTIVITÉ

Capacité d'infecter les racines de certaines légumineuses et d'y provoquer l'apparition de nodules. Ce caractère se note Nod⁺ ; il se différencie difficilement de la spécificité d'hôte.

8.1 - Stérilisation des graines de luzerne

Elle s'effectue de la façon suivante : une centaine de graines sont déposées dans une boîte de Petri. On ajoute 20 ml de chlorure

mercurique à 2,5 ‰, puis on met une goutte de détergent (Teepol). On laisse agir pendant 5 minutes en agitant et ensuite, on vide cette solution stérilement au moyen d'une pipette Pasteur branchée sur une trompe à vide et passée à la flamme ; puis les graines sont rincées au moins 10 fois à l'eau distillée stérile pour bien éliminer le chlorure mercurique.

8.2 - Germination

On dépose stérilement une vingtaine de graines par boîte sur un milieu riche (RCG glucosé) afin de contrôler la stérilité et la germination. La prégermination dure 2 à 4 jours à 30° C selon les graines.

8.3 - Culture aseptique des légumineuses

On prend stérilement, à l'aide d'une öse, les graines germées d'une longueur de 1 à 2 centimètres et on les place sur le support dans le tube à raison de deux plantules par tube. L'incubation s'effectue dans les conditions suivantes : 16 heures d'éclairage, 8 heures d'obscurité, à température 26° C.

8.4 - Inoculation de la souche à tester

Dès que les racines secondaires sont apparues, environ 10^6 bactéries par tube sont inoculées pour minimiser le risque d'une réversion; la suspension bactérienne étant préalablement centrifugée, lavée par du tampon RN⁻, et reprise dans le même tampon.

IX - EFFICIENCE

Qualité de l'association Rhizobium - Légumineuse qui aboutit à la fixation d'azote moléculaire, ce caractère se note Fix⁺. L'utilisation de la réduction de l'acétylène en éthylène a été employée pour mesurer l'efficience (activité d'azote fixé).

9.1 - Principe de la méthode

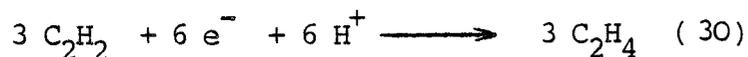
DILLWORTH (30) et SCHOLLHORN et coll. (78) ont montré que l'acétylène était réduit en éthylène par le système de la nitrogénase chez Clostridium pasteurianum.

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 est peu spécifique : elle peut transférer des électrons aux substrats homologues au N₂ comme la C₂H₂, N₂O, HCN, etc...

La réduction de l'acétylène est réalisée 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 d'azote est réalisée de la même façon que la formation de trois molécules d'éthylène à partir d'acétylène. En se basant sur cette analogie, on emploie la méthode à l'acétylène pour mesurer l'activité nitrogénasique.

9.2 - Conditions expérimentales

Cette opération se fait sur un chromatographe Intersmat I.G.C. 112 F.L. selon les conditions suivantes :

- . Gaz vecteur : N₂
- . Température du four : 50° C
- . Température d'injection : 70° C
- . Température du détecteur : 115° C
- . Détecteur : à ionisation de flamme
- . La colonne en acier inoxydable, de 2 mètres de longueur, et de 0,31 centimètre de diamètre, est remplie de sphérosil XoBo 75.

9.3 - Technique de dosage

Quand les plantules sont bien développées (2 à 3 mois), elles sont lavées avec de l'eau distillée, sont mises dans un flacon de 150 ml fermé hermétiquement. On prélève d'abord à l'aide d'une seringue à travers le bouchon de caoutchouc, 17 ml d'air du flacon que l'on remplace par 15 ml d'acétylène soit 10 % (V/V) et 2 ml de propane dilué 100 fois par l'air (témoin interne) de façon à avoir approximativement 1,27 μ moles. Le flacon est ensuite homogénéisé par agitation manuelle.

L'incubation se fait à l'étuve à 30° C. La mesure d'acétylène réduit est effectuée à différents temps (0 ; 3 ; 6 ; 24 heures) par injection de 50 µl dans le chromatographe en phase gazeuse, jusqu'à ce que la courbe de la formation d'éthylène atteigne un plateau.

9.4 - Calcul de la quantité d'éthylène produite (ΔQ)

La formule appliquée pour déterminer la quantité d'éthylène formée dans le flacon est la suivante :

$$Q = C \times K \times \frac{H_1 \text{ (C}_2 \text{ H}_4 \text{ éthylène)}}{H_2 \text{ (C}_3 \text{ H}_8 \text{ propane)}}$$

Tels que : Q = Nombre de moles de $C_2 H_4$ produites

C = Nombre de moles de $C_3 H_8$ injectées

K = Coefficient de proportionnalité établi à partir d'un mélange en proportions égales (V/V) de $C_3 H_8$ et $C_2 H_4$ dans l'air (dans notre expérience :

$$K = \frac{\text{Hauteur de pic } C_3 H_8}{\text{Hauteur de pic } C_2 H_4} = 1,5)$$

H_1 = Hauteur de pic de $C_2 H_4$

H_2 = Hauteur de pic de $C_3 H_8$

$$\Delta Q = Q_6 - Q_0$$

où : Q_6 = Nombre de moles de $C_2 H_4$ produites au temps $T = 6$ heures

Q_0 = Nombre de moles de $C_3 H_8$ produites au temps $T = 0$ heure

9.5 - Détermination du poids sec de la plantule

Après mesure de l'activité nitrogénasique, les plantules sont mises dans une capsule bien sèche de poids connu. Elles sont placées à l'étuve à 80° C pendant 16 heures, puis pesées pour avoir le poids sec correspondant. Pour chaque détermination du poids sec, nous avons pris la moyenne de 8 plantules.

X - MÉTHODE D'ISOLEMENT DES SOUCHES À PARTIR DE NODULES

On prélève les nodules à partir de la racine et on les introduit dans un tube en plastique contenant 2 ml de saccharose à 20 %. On écrase le nodule à l'aide de l'extrémité d'un étaleur stérile. Cette suspension est homogénéisée par agitation. On inocule 0,1 ml dans le milieu (TY) afin d'avoir une culture bactérienne. Ensuite, on effectue un isolement de la souche étudiée sur milieu riche (RCG) à l'aide d'une öse. Les clones apparus après 3 jours sont analysés pour leurs caractères génétiques.

XI - MÉTHODE ÉLECTROPHORÉTIQUE

11.1 - Extraction et purification de l'ADN plasmidique par lyse douce effectuée directement sur le gel

La méthode employée est dérivée de celle de R. SIMON de l'Université de Bielefeld (résultats non publiés).

Les souches d'E. coli sont précultivées dans le milieu de LURIA additionné de glucose, celles de R. meliloti dans le milieu TY jusqu'à obtention de la croissance bactérienne en phase exponentielle. Le nombre de cellules utilisées est estimé par la mesure de la densité optique de la culture au spectrophotomètre Zeiss PMQ II. Une DO de 1 correspond environ à 10^9 cellules/ml. On dépose 0,5 ml de culture à DO égal 0,3 dans de petits tubes coniques en plastique "Eppendorf" de 1,5 ml de capacité et on ajoute un volume de Sarkosyl NL 97 à 0,2 % dans le tampon Tris, 50 mM ; Na₂EDTA, 20mM (TE), pH 8. On mélange en inversant le tube doucement plusieurs fois.

Ensuite, le tube en plastique est placé dans la glace et, après quelques minutes, est centrifugé au moyen d'une centrifugeuse de paillasse Eppendorf 5412 pendant 4 minutes à température ambiante. Le surnageant est retiré à l'aide d'une seringue et le culot est repris dans 60 µl de tampon d'électrophorèse (Tris, 89 mM ; Na₂ EDTA, 2,5 mM ; B (OH), 89 mM de pH 8,3 contenant du saccharose à 25 %, 1 unité/ml de RNase I et 1 mg/ml de lysozyme (ce dernier est ajouté au moment de l'utilisation). Puis le culot est rapidement homogénéisé au moyen d'un homogénéiseur. 30 µl de cette suspension sont déposés dans une alvéole d'un gel vertical d'agarose à 0,8 %. Attendre quelques minutes et déposer au-dessus 90 µl du tampon d'électrophorèse renfermant du saccharose à 5 %, du dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 1 %, du bleu de bromophénol (BBP) à 0,025 % et de l'agarose à 0,4 %.

Signalons que la verrerie et les tampons utilisés sont stérilisés à l'autoclave afin d'éliminer toutes traces possibles de DNases.

11.2 - Choix des différents paramètres électrophorétiques

A - La concentration du gel :

La concentration du gel utilisée par les auteurs varie de 0,7 à 0,9 % en agarose (19, 45, 66).

Pour nos conditions expérimentales, nous avons employé une concentration à 0,8 % d'agarose (Sigma).

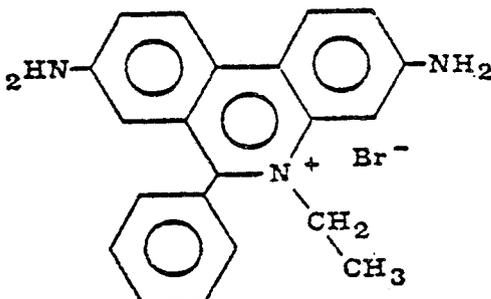
B - Voltage et temps de migration :

Nous avons utilisé un générateur du type Elvi 20 pour fournir un courant continu.

D'abord le voltage est mis à 20 V pendant 45 minutes, ensuite, nous l'avons fait passer à 130 V pendant 3 heures pour faire migrer l'ADN plasmidique.

11.3 - Visualisation des bandes plasmidiques

La visualisation des bandes plasmidiques s'effectue par le bromure d'éthidium. Ce colorant est le plus utilisé pour révéler les acides nucléiques en gradient de CsCl (4 , 25,60) ainsi qu'en électrophorèse (19, 45, 66). La formule du bromure d'éthidium est : bromure de 3,8-diamino 6 -phényl 5-éthylphénantridinium.



Ce dérivé du phénanthrène s'intercale entre les paires de bases de l'ADN et donne une fluorescence en ultra-violet à 302 nm.

Le gel est alors trempé dans un bain de bromure d'éthidium à la concentration approximative de 1 $\mu\text{g/ml}$ et placé pendant 30 mn à l'obscurité, car il s'agit d'un produit instable à la lumière. Puis il est trempé, si nécessaire, dans un bain d'eau distillée pendant deux à trois heures afin de décolorer le gel pour avoir un contraste optimum.

11.4 - Photographie

Les gels placés sur le transilluminateur sont photographiés au moyen d'un appareil Réflex 24 x 36 muni d'une combinaison de filtres couleur.

11.5 - Mode de calcul du poids moléculaire des plasmides

Le poids moléculaire des plasmides d'E. coli J53 (RP4) et R. meliloti L5-30, Ls2a et U45, qui ont été calculé par CASSE et coll. (19), nous ont servi à estimer ceux des souches étudiées.

En électrophorèse en gel d'agarose, il existe une relation linéaire entre le logarithme de la migration relative de la forme super-hélicoïdale des plasmides et celui de leur poids moléculaire (jusqu'à environ 140 Md).

Après mesure des distances de migration en projetant la diapositive, nous avons déterminé les équations des droites de régression

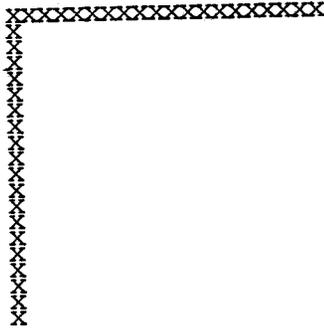
et les coefficients de corrélation pour chaque expérience au moyen d'une calculatrice Hewlett-Packard HP-91 :

$$\log PM = A \log MR + B \quad (\text{équation de la droite de régression})$$

où :

- PM : poids moléculaire
- MR : migration relative
- A : pente de la droite
- B : constante

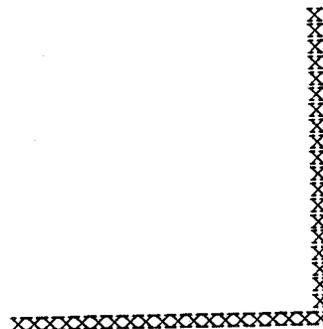
Le poids moléculaire des plasmides étudiés a été obtenu par intrapolation et extrapolation de ces droites.



CHAPITRE I

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE MUTANTS

PAR TRANSPOSITION



I - MUTANTS AUXOTROPHES

1 - Croisement entre E. coli S111 (pSP601) et E. coli C600 rif

Nous envisageons de transférer le plasmide "suicide" (pSP601) de la souche d'E. coli S111 à la souche C600 de la même espèce afin de vérifier s'il y a eu transfert global ou partiel du plasmide en question.

Les deux souches étudiées présentent les caractères suivants :

- . E. coli S111 : thi thr leu SuIII lac his::Mu_{Cts} Mu^r
- . E. coli C 600 : Δtrp leu rk⁻ mk⁻ recA rif^r

Ce plasmide "suicide" porte le phage Mu_{C+} ainsi que quatre transposons :

- . Tn1 : porte un gène de résistance à l'ampicilline ;
- . Tn5 : porte un gène de résistance à la kanamycine ;
- . Tn402 : porte un gène de résistance au triméthoprime ;
- . Tn1771 : porte un gène de résistance à la tétracycline.

Nous avons effectué le croisement entre ces deux souches d'E. coli. La sélection des transconjugants est réalisée sur milieu riche (RC glc 1 %) contenant de la rifamycine SV (100 µg/ml), et auquel nous ajoutons l'un ou l'autre des antibiotiques dont la résistance est codée par ces transposons.

Les résultats du croisement sont consignés dans le TABLEAU III.

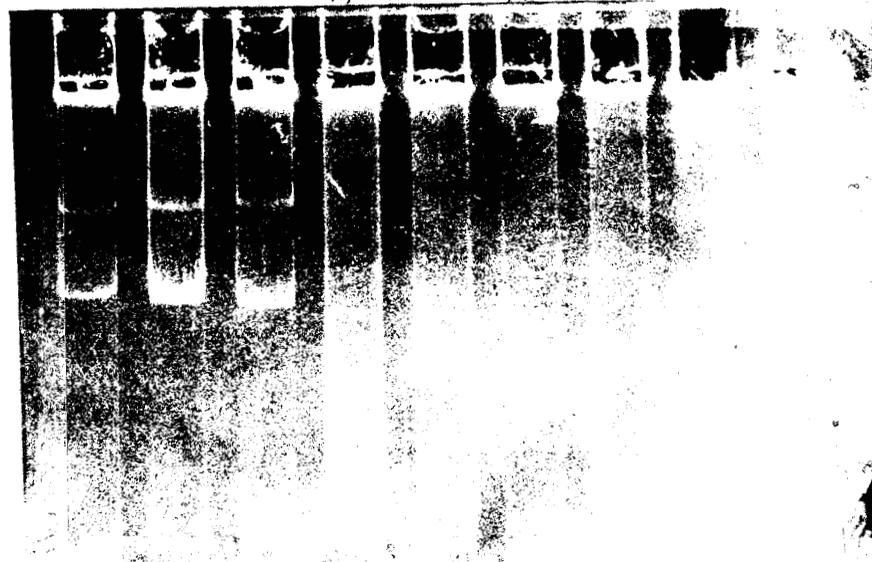
Nom du transposon	Fréquence de transfert	Antibiotiques additionnés dans le milieu (RCglc 1 %)	Résistance aux antibiotiques de 10 transconjugants
Tn1 (Ap)	$3,4 \cdot 10^{-4}$	Rif (100 µg/ml) Ap (100 µg/ml)	Tc, Km, Tp
Tn1771 (Tc)	$9,9 \cdot 10^{-5}$	Rif (100 µg/ml) Tc (10 µg/ml)	Ap, Km, Tp
Tn5 (Km)	$4,8 \cdot 10^{-5}$	Rif (100 µg/ml) Km (50 µg/ml)	Ap, Tc, Tp
Tn402 (Tp)	$8,3 \cdot 10^{-6}$	Rif (100 µg/ml) Tp (200 µg/ml)	Ap, Tc, Km

TABLEAU III : FREQUENCE DE TRANSFERT DES TRANSPOSONS ET ANALYSE DES TRANSCONJUGANTS ISSUS DU CROISEMENT ENTRE E. coli S111 ET E. coli C600

Conditions : croisement sur filtre, incubation à 37° C pendant 18 heures.

Nous constatons que les dix transconjugants analysés sont devenus résistants aux quatre antibiotiques, ce qui prouve que le transfert du plasmide est intégral. Il faut noter que la fréquence de transfert varie d'un antibiotique à un autre. Nous remarquons que la fréquence de transfert du transposon Tn1 de l'ordre de $3,4 \cdot 10^{-4}$, est nettement plus importante que celle du transposon Tn402.

Nous avons par la suite effectué une électrophorèse pour savoir si les transconjugants ont totalement acquis le plasmide "suicide" (pSP601). Les résultats sont indiqués dans la PHOTOGRAPHIE I.



Souche	Nombre de plasmides	Poids moléculaire des plasmides en Md
<u>E. coli</u> S111 (pSP601)	1	70
Transconjugant (1)	1	71
Transconjugant (2)	1	70
Transconjugant (3)	1	69
<u>E. coli</u> J53 (RP4)	1	36
L5-30	2	1 : PG (>300) 2 : 89
Ls2a	3	1 : PG (>300) 2 : 100 3 : 91
U45	2	1 : PG (>300) 2 : 101

PHOTOGRAPHIE I : L'ESTIMATION DU POIDS MOLECULAIRE DU PLASMIDE "SUICIDE" (pSP601) ACQUIS PAR LES 3 TRANSCONJUGANTS ISSUS DU CROISEMENT ENTRE E. coli S111 (pSP601) ET E. coli C600 Rif^r DEPOURVUE DE PLASMIDE

- équation de la droite de régression

$$\log PM = - 2,67 \log MR + 12,11$$

- coefficient de corrélation

$$r = - 0,9965$$

Nous remarquons que la souche C600 est dépourvue de plasmide. En revanche, nous constatons la présence d'une bande plasmidique chez les trois transconjugants analysés qui correspond à celle de la souche donatrice d'E. coli S111. L'évaluation du poids moléculaire du plasmide (pSP601) donne une valeur de 70 Md ; celle-ci a été effectuée par comparaison avec des plasmides de poids moléculaire connu. Les souches témoins sont E. coli J53(RP4) , R. meliloti L5-30, Ls2a et U45 ; les poids moléculaires de leurs plasmides ont été calculés par CASSE et coll. (19).

2 - Choix du transposon

Nous nous sommes proposés d'étudier la transposition de ces quatre éléments transposables nommés précédemment en utilisant différentes souches de R. meliloti. Le croisement est effectué entre la souche donatrice d'E. coli S111 (pSP601) et les souches réceptrices de R. meliloti : 1-5 Str, M22S, M5N1, M11S. Les résultats obtenus sont rapportés dans le TABLEAU IV.

Souche réceptrice <u>R. meliloti</u>	Fréquence de transposition du Tn1 (Ap)	Fréquence de transposition du Tn5 (Km)	Fréquence de transposition du Tn1771 (Tc)
1-5 Str	ID	$5,7 \cdot 10^{-6}$	$< 5,3 \cdot 10^{-9}$
M22S	ID	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$< 3,5 \cdot 10^{-9}$
M5N1	ID	$5,8 \cdot 10^{-7}$	$< 4,1 \cdot 10^{-9}$
M11S	ID	$4,2 \cdot 10^{-7}$	$< 3,4 \cdot 10^{-9}$

TABLEAU IV : FREQUENCE DE TRANSFERT DES DIFFERENTS TRANSPOSONS CHEZ R. meliloti

ID : Indéterminé (des colonies peu apparentes, difficiles à déterminer).

La sélection des cellules ayant reçu les transposons est réalisée sur milieu minimum (R glc HB₁) additionné d'ampicilline, de kanamycine ou de tétracycline.

Le TABLEAU III nous indique que nous n'observons pas de tels clones sur milieu minimum additionné de l'ampicilline ou de la tétracycline pour les quatre souches testées.

Les colonies qui apparaissent sur le milieu contenant de l'ampicilline sont des microcolonies ; lorsqu'on les purifie par repiquage sur le même milieu, on n'observe aucune croissance. Il s'agit d'artéfacts probablement dûs à la dégradation de l'ampicilline par l'E. coli présent dans le croisement.

La transposition des Tn1 (Ap) et Tn1771 (Tc) n'a pas eu lieu ; dans le cas du Tn5 (Km), nous avons constaté la présence de clones résistants sur milieu minimum additionné de kanamycine. Ceci nous conduit à admettre la transposition du Tn5 dans les différentes souches de R. meliloti. La non-transposition des Tn1 et Tn1771 est probablement liée au mécanisme du plasmide "suicide" chez R. meliloti. Nous avons donc recherché des clones ayant acquis le transposon Tn5 pour les expérimentations ultérieures.

3 - Choix de la souche réceptrice

Nous avons utilisé vingt souches prototrophes de R. meliloti d'origine différente du point de vue géographique. Afin de sélectionner des souches présentant une aptitude convenable à recevoir

le transposon Tn5 , nous avons effectué les croisements avec la souche d'E. coli S111 (pSP601) comme souche donatrice et ces vingt souches comme souches réceptrices.

Les R. meliloti résistants à la kanamycine ont été sélectionnés sur milieu minimum additionné de kanamycine à la concentration de 200 µg/ml.

Les fréquences de transposition et de mutation spontanée obtenues au cours de cette série de croisements sont indiquées dans le TABLEAU V.

Nous avons calculé le pourcentage de mutants spontanés (devenus résistants à la kanamycine à 200 µg/ml) par rapport aux mutants résultant de l'insertion du transposon Tn5 , chez ces vingt souches étudiées. Ceci nous permet de sélectionner les souches les plus aptes à acquérir ce transposon.

Les souches 2009, 444, 44, M11S, M19S, M22S et M28S montrent une fréquence de mutation spontanée faible et sont capables d'acquérir le transposon Tn5 .

Les souches U45, M5S, 17 R.I.O. présentent une fréquence de mutants spontanés résistants à la kanamycine plus élevée que celle des souches précédentes (1 à 10 %). Ces souches ne sont pas intéressantes pour la transposition.

Les souches 2004, 1-5 Str, M5N1, M12S, M14S, M27 donnent une fréquence de mutants spontanés très élevée, tandis que les souches SU47, M3S, M9S, M21 n'ont pas acquis le transposon Tn5 et ne présentent pas de mutants spontanés résistants à la kanamycine.

Souche réceptrice	Fréquence de transposition	Fréquence de mutation Km ^r 200 µg/ml spontanée	Pourcentage de mutants spontanés	Nombre d'essais	Souche utilisable pour la transposition
2009	$6 \cdot 10^{-5}$	$5,7 \cdot 10^{-7}$	0,95	2	+
444	$5,8 \cdot 10^{-6}$	$1,9 \cdot 10^{-9}$	0,03	3	+
44	$2,1 \cdot 10^{-6}$	$< 1,3 \cdot 10^{-8}$	$< 0,62$	2	+
M11S	$4,2 \cdot 10^{-7}$	$3,6 \cdot 10^{-9}$	0,84	2	+
M19S	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$< 4 \cdot 10^{-9}$	$< 0,20$	1	+
M22S	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-9}$	0,21	1	+
M28S	$4,6 \cdot 10^{-6}$	$8,9 \cdot 10^{-9}$	0,19	3	+
U45	$3,8 \cdot 10^{-7}$	$1,4 \cdot 10^{-8}$	3,68	2	+
M5S	$4 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-6}$	4,25	1	+
17 R.I.O.	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-7}$	4,21	2	+
2004	$8 \cdot 10^{-9}$	$3,5 \cdot 10^{-8}$	100,00	1	-
1-5 Str	$5,7 \cdot 10^{-6}$	$3,6 \cdot 10^{-6}$	62,89	1	-
M5N1	$5,8 \cdot 10^{-7}$	$5,2 \cdot 10^{-7}$	90,90	1	-
M12S	$1,7 \cdot 10^{-5}$	$4,3 \cdot 10^{-6}$	25,32	3	-
M14S	$2 \cdot 10^{-6}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$	100,00	2	-
M27	$3,2 \cdot 10^{-6}$	$6,4 \cdot 10^{-6}$	100,00	1	-
SU47	$< 1,2 \cdot 10^{-8}$	$< 6,4 \cdot 10^{-9}$		1	-
M3S	$< 1,7 \cdot 10^{-9}$	$< 2,1 \cdot 10^{-9}$		2	-
M9S	$< 4,3 \cdot 10^{-9}$	$< 2,6 \cdot 10^{-9}$		1	-
M21	$< 2,5 \cdot 10^{-8}$	$< 7,8 \cdot 10^{-9}$		1	-

TABLEAU V : TRANSPOSITION ENTRE LA SOUCHE D'E. COLI S111 (pSP601) ET LES DIFFÉRENTES SOUCHES DE R. MELILOTI



- + Signifie que les souches ont acquis le transposon Tn5 et le pourcentage de mutants spontanés est inférieur à 1
- + Signifie que les souches ont acquis le transposon Tn5 et le pourcentage de mutants spontanés est compris entre 1 et 10.
- Signifie que les souches n'ont pas acquis le transposon Tn5 ou qu'elles présentent un pourcentage de mutants spontanés supérieur à 10.

Enfin, parmi les souches susceptibles de recevoir le transposon Tn5, nous avons retenu les souches 444 et M28S pour les expérimentations ultérieures dans le but d'obtenir des mutants auxotrophes.

4 - Transposition entre E. coli S111 (pSP601) et les souches sélectionnées

Nous avons d'abord isolé des mutants résistants à la streptomycine à 400 µg/ml pour la souche M28S afin de pouvoir la sélectionner ultérieurement ; la souche 444 porte déjà la mutation de résistance à la streptomycine.

La sélection des mutants ayant acquis le transposon Tn5 est réalisée sur milieu riche (RC glc 1 %) auquel nous avons ajouté de la streptomycine et de la kanamycine à la concentration de 200 µg/ml. Ce milieu nous permet de détecter les colonies ayant acquis le transposon Tn5.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le TABLEAU VI.

Souche réceptrice	Fréquence de transposition	Fréquence de mutation Km ^r 200 µg/ml spontanée	Pourcentage de mutants spontanés
444	$7 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-8}$	0,17
M28Str	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$2,8 \cdot 10^{-9}$	0,18

TABLEAU VI : FREQUENCES DE TRANSPOSITION OBTENUES ENTRE LA SOUCHE D'E. coli ET LES SOUCHES SELECTIONNEES : 444, M28Str

5 - Obtention de mutants auxotrophes

a) Transposition avec la souche 444 :

Après sélection des mutants ayant acquis le Tn5 sur milieu riche additionné de streptomycine et de kanamycine, environ dix mille clones ont été répliqués sur milieu minimum (Rg1cHB₁).

Cette technique nous a permis de dénombrer environ 130 clones incapables de se développer sur milieu minimum. Ensuite ces clones ont été étudiés pour leur auxotrophie ; parmi ces mutants présumés auxotrophes, certains se sont révélés être en réalité des prototrophes ; cela est dû à des artéfacts d'expérience comme par exemple un mauvais contact de la boîte avec le velours au moment de la réplique ; par ailleurs, certains mutants auxotrophes sont instables : le Tn5 intégré sur certains gènes pourrait subir une excision ou une retransposition ; ceci provoque une réversion vers le phénotype sauvage avant que l'on ait pu les identifier.

En définitive, 27 clones se sont révélés être des mutants auxotrophes véritables, car ils sont incapables de se développer sur milieu minimum.

Le pourcentage de mutants auxotrophes obtenus en employant le Tn5 comme agent mutagène est d'environ 0,3 %. Nous signalons que ce taux de mutation confirme les résultats déjà obtenus par BERINGER (12) et par WALTON (92) en utilisant le même transposon.

Les exigences de ces mutants auxotrophes ont été déterminées. Les résultats sont résumés dans le TABLEAU VII.

NOM DU MUTANT	EXIGENCE(S)	FREQUENCE DE REVERSION	NOMBRE DE MUTANTS	CROISSANCE SUR MILIEU MINIMUM ADDITIONNE DES INTERMEDIAIRES SUIVANTS :		
444::Tn5.1	Arginine	$< 7,8 \cdot 10^{-9}$	10	Ornithine..... -- Citrulline..... - Argininosuccinate..... +		
444::Tn5.3	Arginine	$< 6,5 \cdot 10^{-9}$				
444::Tn5.7	Arginine	$3,8 \cdot 10^{-6}$				
444::Tn5.8	Arginine	$< 6,6 \cdot 10^{-9}$				
444::Tn5.10	Arginine	$2,9 \cdot 10^{-7}$				
444::Tn5.11	Arginine	$2,7 \cdot 10^{-6}$				
444::Tn5.13	Arginine	$< 5,8 \cdot 10^{-9}$				
444::Tn5.14	Arginine	$< 2 \cdot 10^{-8}$				
444::Tn5.15	Arginine	$8,3 \cdot 10^{-9}$				
444::Tn5.16	Arginine	$3,3 \cdot 10^{-7}$				
444::Tn5.2	Méthionine	$3,3 \cdot 10^{-7}$			4	Homocystéine..... + Cystathionine..... + Homosérine..... -
444::Tn5.17	Méthionine	$< 6,4 \cdot 10^{-9}$				
444::Tn5.29	Méthionine	$2,7 \cdot 10^{-8}$				
444::Tn5.43	Méthionine	$2 \cdot 10^{-7}$				
444::Tn5.12	Méthionine	$2,6 \cdot 10^{-8}$			4	Homocystéine..... - Cystathionine..... - Homosérine..... -
444::Tn5.27	Méthionine	$6,9 \cdot 10^{-7}$				
444::Tn5.28	Méthionine	$< 2,6 \cdot 10^{-9}$				
444::Tn5.30	Méthionine	$8,2 \cdot 10^{-9}$				
444::Tn5.6	Leucine	$< 1,2 \cdot 10^{-8}$	4	α -Céto-isocaproate..... + 2-Céto-isovalerate..... -		
444::Tn5.18	Leucine	$1,7 \cdot 10^{-6}$				
444::Tn5.21	Leucine	$9,9 \cdot 10^{-8}$				
444::Tn5.40	Leucine	$< 1,9 \cdot 10^{-9}$				
444::Tn5.19	{ Cystéine Méthionine	$< 5,7 \cdot 10^{-9}$	2	Homocystéine..... + Cystathionine..... + Homosérine..... -		
444::Tn5.20	{ Cystéine Méthionine	$3,6 \cdot 10^{-6}$				
444::Tn5.4	{ Arginine Pyrimidine	N.D.	1	N.D.		
444::Tn5.39	Histidine	$< 1,6 \cdot 10^{-9}$	1	N.D.		
444::Tn5.42	Tyrosine	N.D.	1	N.D.		

TABLEAU VII : MUTANTS AUXOTROPHES ISSUS PAR INSERTION DU Tn5 SUR LE GENOME DE *R. meliloti* 444

La fréquence de réversion, déterminée sur milieu minimum Rglc HB₁, ne tient pas compte s'il s'agit de vrais révertants (redevenus sensibles à la kanamycine) ou de pseudo-révertants (restés résistants à cet antibiotique).

Les fonctions principales touchées par le transposon Tn5 sont représentées par l'incapacité à synthétiser les acides aminés suivants : arginine, méthionine, leucine. Ceci nous a conduit à penser à regrouper les mutants en 4 catégories : arginine (10 mutants), méthionine (8 mutants), leucine (4 mutants), cystéine/méthionine (2 mutants).

Pour chaque catégorie, on a cherché la croissance sur les intermédiaires de la biosynthèse des acides aminés. Si les voies de cette biosynthèse chez Rhizobium sont identiques à celles établies chez E. coli (2) et en employant la même nomenclature des génotypes chez E. coli, nous constatons que les 10 mutants exigeants en arginine ont subi une altération au niveau de gène arg G qui est responsable de la synthèse d'arginino succinate-synthétase [E.C. 6.3.4.5] ; cette dernière transforme la citrulline en arginino succinate (FIGURE V).

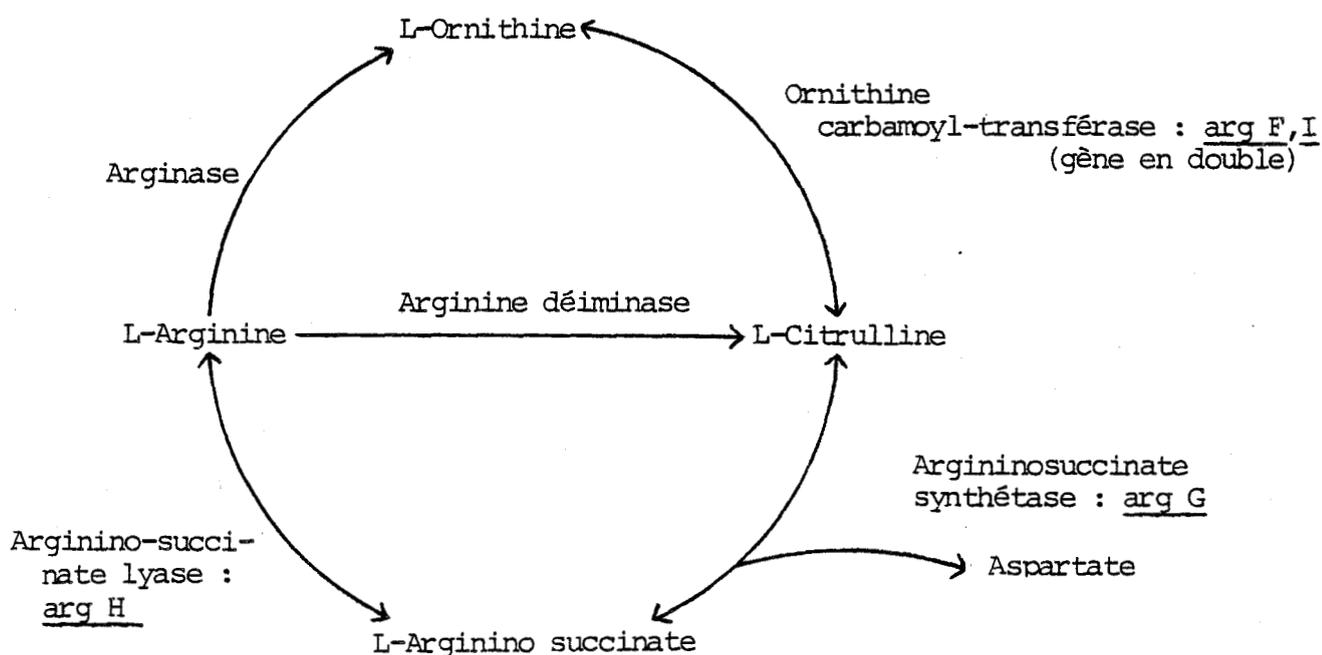


FIGURE V : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA BIOSYNTHESE DE L'ARGININE
CHEZ E. coli

En ce qui concerne les huit mutants exigeants en méthionine, nous remarquons deux types d'altération génétique : les quatre premiers mutants (444::Tn5.2), (444::Tn5.17), (444::Tn5.29) et (444::Tn5.43) sont capables de se développer sur cysthationine et homocystéine, mais pas sur les autres intermédiaires de la méthionine, ce qui indique que le transposon s'est intégré sur le gène gouvernant la synthèse de l'homosérine-déshydratase (FIGURE VI).

Par ailleurs, le deuxième groupe, qui concerne les quatre autres mutants, a probablement subi une altération portant soit sur le gène régulateur met j, soit sur le gène responsable de la synthèse de la L : (5 méthyl-tétrahydrofolate homocystéine méthyl.-transférase), parce qu'ils ne se développent qu'en présence de la méthionine ajoutée dans le milieu minimum.

Deux mutants exigeants en acides aminés soufrés ont été isolés au cours de cette transposition. Ils sont capables de croître en présence de cystéine ou de méthionine. Ces mutants peuvent également utiliser les intermédiaires : cysthationine et homocystéine, pour mettre en route le cycle des acides aminés.

L'insertion du transposon Tn5 sur le gène cys K a rendu ces deux mutants (444::Tn5.19) et (444::Tn5.20) incapables de synthétiser la cystéine-synthase [E.C. 4.2.99.8] qui transforme la sérine en cystéine en utilisant le sulfure d'hydrogène comme substrat (FIGURE VI).

Dans le cas des quatre mutants exigeants en leucine, ils sont tous probablement bloqués sur l'un des deux gènes qui suivent le gène gouvernant la synthèse de la leucine déshydrogénase (FIGURE VI),

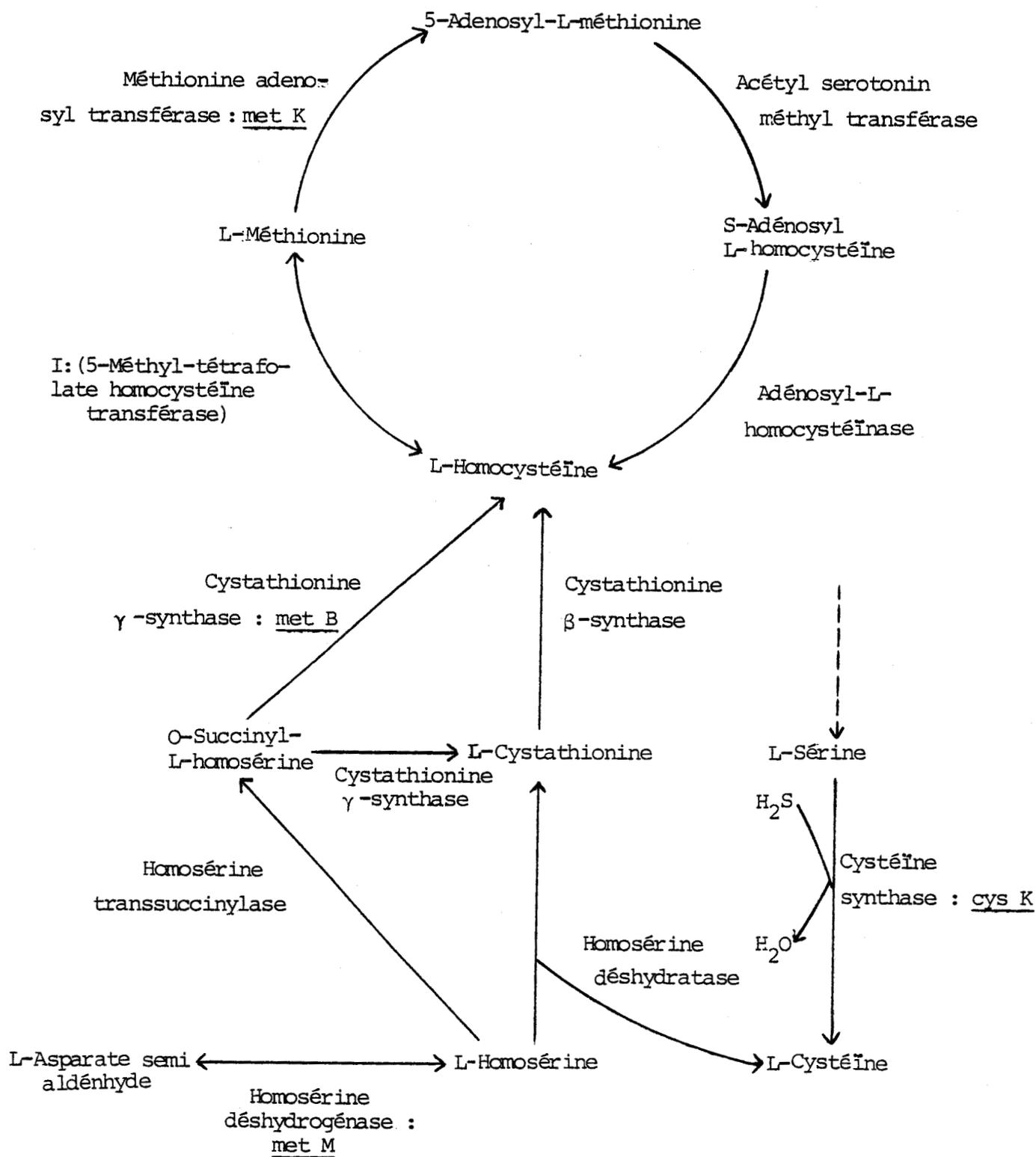


FIGURE VI : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA BIOSYNTHESE DE LA METHIONINE ET DE LA CYSTEINE CHEZ E. coli



car ces mutants se développent en présence d' α -céto isocaproate. Cependant, nous n'avons pas pu tester les croissances des mutants sur les intermédiaires (2-D-thréo hydroxyl 3-carboxyl isocaproate, et 3-carboxyl 3-hydroxy-isocaproate), car ces intermédiaires n'existent pas dans le commerce ou sont instables (FIGURE VII).

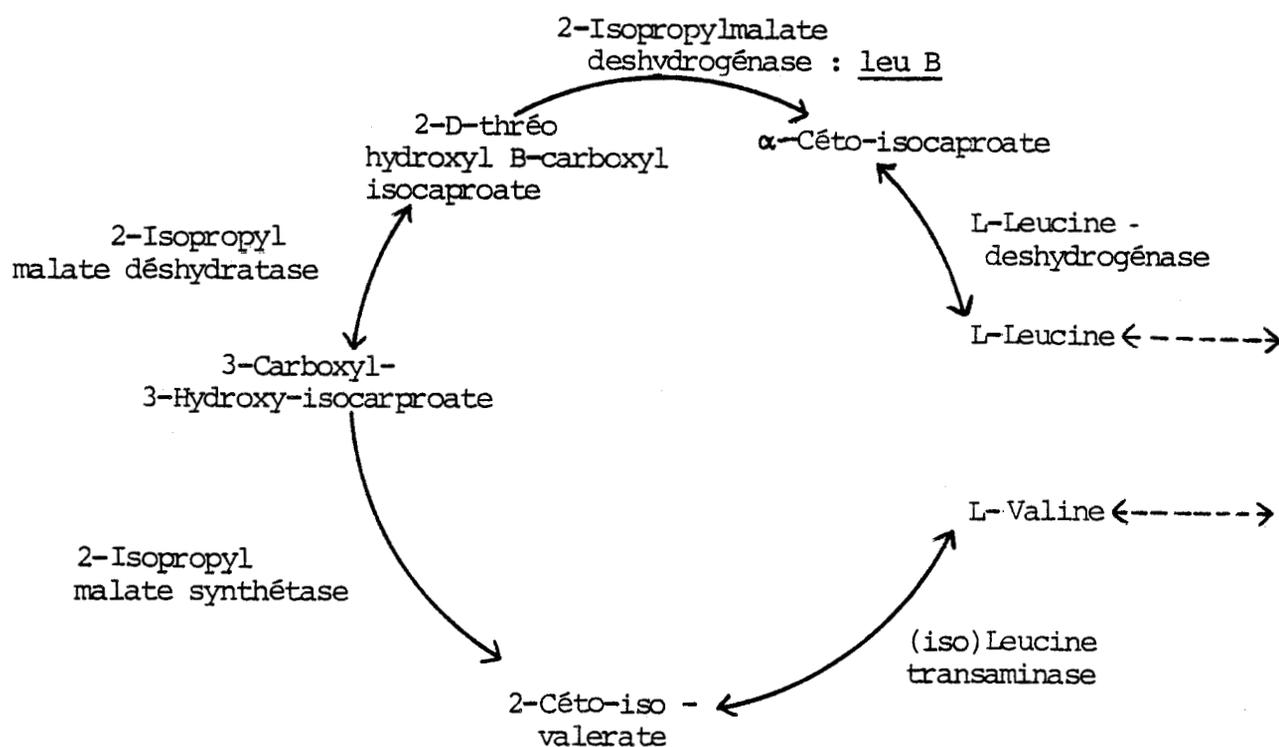


FIGURE VII : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA BIOSYNTHESE DE LEUCINE CHEZ E. coli

Nous avons vérifié la stabilité des caractères des différents mutants obtenus par transposition. Nous remarquons qu'au sein d'une même catégorie, la fréquence de réversion varie d'un mutant à un autre (TABLEAU VII).

b) Transposition avec la souche M28Str :

Nous avons effectué la transposition du Tn5 dans la souche M28Str de R. meliloti, en vue de comparer les caractères des mutants issus chez cette souche avec ceux de la souche précédente R. meliloti 444.

La même technique et les mêmes conditions ont été utilisées pour tester environ 13 000 clones ayant acquis le transposon Tn5, pour leur éventuelle auxotrophie. La purification de 140 mutants auxotrophes présumés donne 28 mutants véritables. Les résultats de l'identification de ces mutants sont résumés dans le TABLEAU VIII.

Nous constatons d'après le tableau qu'on peut distinguer quatre grands groupes de mutants auxotrophes : tryptophane, pyrimidine, adénine, méthionine et trois petits groupes : cystéine/méthionine, arginine, phénylalanine/tryptophane/tyrosine. En ce qui concerne les trois petits groupes, chaque groupe est constitué de deux mutants.

On remarque que quatre nouveaux types de mutants auxotrophes sont apparus : tryptophane, pyrimidine, adénine et Phe/Trp/Tyr. Par ailleurs, les mutants exigeants en méthionine, cystéine/méthionine et arginine se trouvent simultanément chez les souches M28Str et 444.

Ensuite, les mutants ont également été testés pour leur croissance sur les intermédiaires.

Chez les mutants arginine et cystéine/méthionine de la souche M28Str, le transposon Tn5 s'est inséré respectivement sur les gènes arg G et cys K, de la même manière que chez les mutants arginine et cystéine/méthionine de la souche 444. Cependant, chez deux mutants exigeants en

NOM DU MUTANT	EXIGENCE(S)	FREQUENCE DE REVERSION	NOMBRE DE MUTANTS	CROISSANCE SUR MILIEU MINIMUM ADDITIONNE DES INTERMEDIAIRES SUIVANTS :
M28Str::Tn5.3	Tryptophane	1.10^{-8}	5	Shikimate..... - Chorismate..... +
M28Str::Tn5.9	Tryptophane	$2,3.10^{-6}$		
M28Str::Tn5.12	Tryptophane	$9,5.10^{-7}$		
M28Str::Tn5.24	Tryptophane	9.10^{-9}		
M28Str::Tn5.32	Tryptophane	1.10^{-8}		
M28Str::Tn5.4	Pyrimidine (cytosine, uracile)	$4,9.10^{-8}$	4	Uridine-5-phosphate..... + Orotidine-5-phosphate..... + Orotate..... + L-4,5 Dihydro-orotate..... + Carbamyl-L-aspartate..... -
M28Str::Tn5.15	Pyrimidine	$1,8.10^{-7}$		
M28Str::Tn5.23	Pyrimidine	$1,3.10^{-8}$		
M28Str::Tn5.35	Pyrimidine	$< 6,7.10^{-8}$		
M28Str::Tn5.5	Adénine	$5,1.10^{-8}$	4	5-phosphoryl-ribose-1-pyrophosphate. - Inosine-5-phosphate..... +
M28Str::Tn5.29	Adénine	$1,6.10^{-8}$		
M28Str::Tn5.44	Adénine	$< 2,1.10^{-8}$		
M28Str::Tn5.46	Adénine	$< 2 .10^{-8}$		
M28Str::Tn5.7	Méthionine	$1,6.10^{-7}$	2	Homocystéine..... - Cystathionine..... - Homosérine..... -
M28Str::Tn5.45	Méthionine	$1,5.10^{-7}$		
M28Str::Tn5.39	Méthionine	$< 5,9.10^{-9}$	2	Homocystéine..... + Cystathionine..... - Homosérine..... -
M28Str::Tn5.41	Méthionine	$2,2.10^{-8}$		
M28Str::Tn5.37	Cystéine/Méthionine	$< 1,3.10^{-8}$	2	Homocystéine..... + Cystathionine..... + Homosérine..... -
M28Str::Tn5.40	Cystéine/Méthionine	$1,5.10^{-8}$		
M28Str::Tn5.14	Arginine	$4 .10^{-8}$	2	Ornithine..... - Citrulline..... - Argininosuccinate..... +
M28Str::Tn5.33	Arginine	$5,3.10^{-7}$		
M28Str::Tn5.17	Phe/Trp/Tyr	$7,5.10^{-9}$	2	Shikimate..... - Chorismate..... -
M28Str::Tn5.18	Phe/Trp/Tyr	$4,2.10^{-9}$		
M28Str::Tn5.19	Leucine	$1,8.10^{-8}$	1	α -cétio-isocaproate + , α -cétio-isovalérate - , valine - , isoleucine valine -
M28Str::Tn5.27	Lysine	$9 .10^{-9}$	1	N.D.
M28Str::Tn5.34	Cystéine	$< 2,3.10^{-8}$	1	N.D.
M28Str::Tn5.38	ND	$1 .10^{-6}$	1	N.D.
M28Str::Tn5.2	ND	$1,7.10^{-8}$	1	N.D.

TABLEAU VIII : MUTANTS AUXOTROPHES ISSUS PAR INSERTION DU Tn5 SUR LE GENOME DE *R. meliloti* M28Str.

Phe : phenylalanine ; Trp : Tryptophane ; Tyr : Tyrosine

méthionine (M28Str::Tn5.39) et (M28Str::Tn5.41), le gène gouvernant la synthèse de la cystathionine β -synthase a subi une mutation par insertion du Tn5 .

Les mutants exigeants en pyrimidine sont bloqués au niveau du gène pyrC responsable de la synthèse de la dihydro-orotate [E.C. 3.5.2.3] (FIGURE VIII).

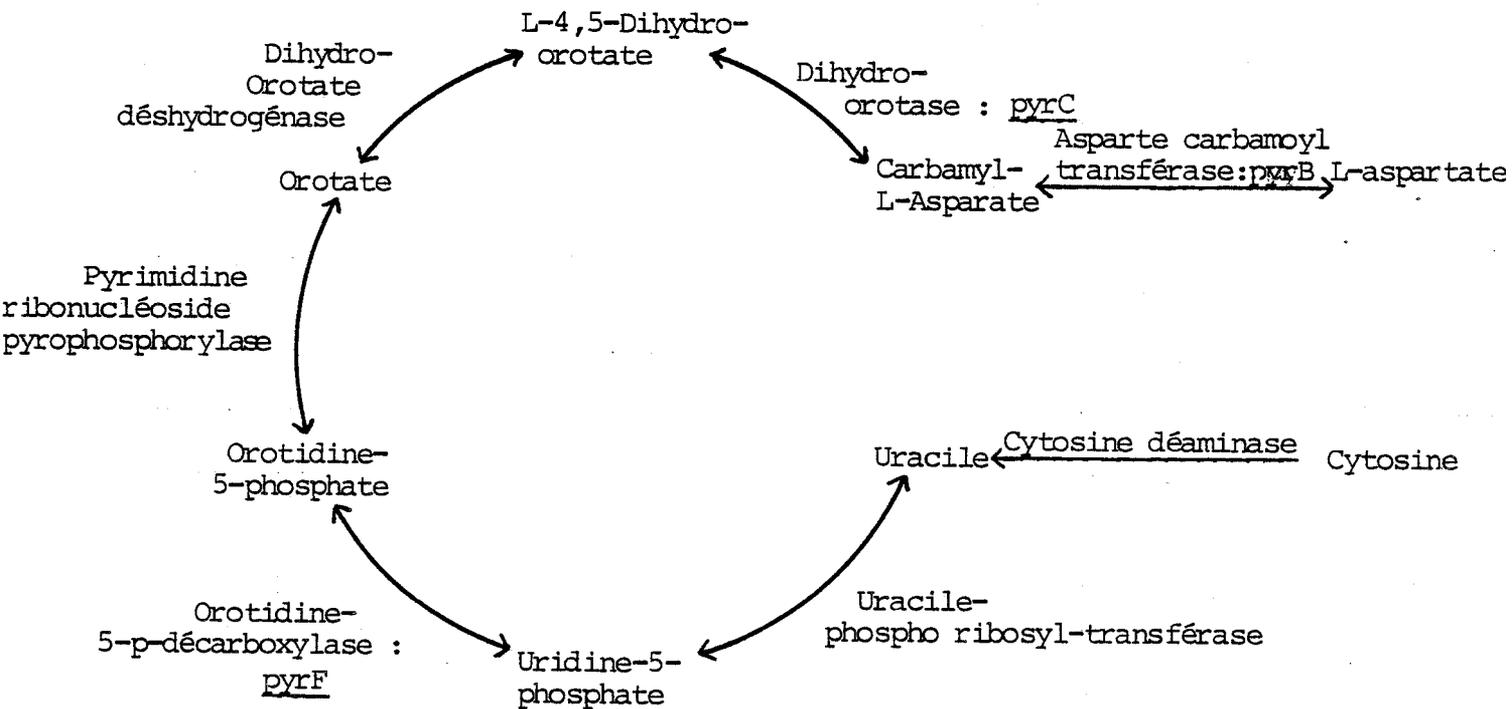


FIGURE VIII : SCHEMA DE LA BIOSYNTHESE DES PYRIMIDINES CHEZ E. coli

Signalons que ces mutants se développent faiblement sur l'orotidine-5-phosphate et sur l'orotate, cela peut s'expliquer par une pénétration difficile de ces produits dans les cellules.

A propos des mutants exigeants en tryptophane, ils sont probablement bloqués sur les gènes qui suivent le gène trpE gouvernant la synthèse de l'antranilate synthase [E.C. 4.1.3.27], tandis que chez les mutants exigeants en adénine, le transposon Tn5 est apparemment inséré sur les gènes qui viennent après le gène pyrB synthétisant l'adénylo-succinate synthétase [E.C. 6.3.4.4.] .

6 - Ambiguïté de l'étude des mutants auxotrophes

Parfois, l'analyse des résultats est compliquée par l'apparition sur milieu minimum de colonies translucides provenant de la croissance faible de mutants auxotrophes en absence de leur exigence. Cet artéfact n'a jamais pu être éliminé malgré tous les essais réalisés.

Nous avons constaté au cours de l'identification de ces mutants que les mutants exigeants en méthionine, leucine, adénine et cystéine/méthionine se développent souvent sous forme d'une colonie translucide sur milieu minimum (Rglc HB₁), mais cette croissance faible devient normale si l'on ajoute leurs exigences dans le milieu (PHOTOGRAPHIE II) .

Cependant, les mutants exigeants en tryptophane, pyrimidine et arginine ne manifestent aucune croissance sur milieu minimum ; cela a déjà été remarqué chez des mutants exigeants en tryptophane isolés



PHOTOGRAPHIE II : ASPECT DES COLONIES DE R. meliloti SUR MILIEU MINIMUM
(Rglc HB₁)

- A) A gauche, la croissance de la souche sauvage 444
donne une colonie opaque ;
- B) A droite, la faible croissance de certains mutants
auxotrophes donne une colonie translucide.

après traitement par un agent mutagène classique la N-méthyl N'-nitro N-nitrosoguanidine (M. BECHET, communication personnelle).

Ce phénomène de colonies translucides n'est donc pas lié à la mutation par transposition.

II - MUTANTS INEFFICIENTS

Outre son métabolisme vital, le Rhizobium est doué d'autres fonctions qui lui sont particulières, telles que la sécrétion d'exopolysaccharides, la spécificité d'hôte, l'infectivité et la fixation d'azote.

Nous avons constaté que le transposon Tn5 s'intégrait sur différents gènes de biosynthèse (acides aminés, bases nucléïques) et entraînait des perturbations dans le fonctionnement de ces gènes.

Nous nous sommes proposés d'étudier l'effet de cet agent mutagène sur les caractères symbiotiques du Rhizobium.

1 - Isolement

Un mutant inefficent (44::Tn 5.8) a été identifié après passage sur plante de nombreux mutants ayant acquis le transposon Tn5 ; ceux-ci ont été récoltés sur milieu minimum (R glc HB₁) additionné de kanamycine (ceci après croisement entre E. coli S111 (pSP601) et R. meliloti 44).

Parmi les 27 mutants auxotrophes issus de la souche 444, un mutant exigeant en arginine (444::Tn5.10) a également montré une activité nitrogénasique nulle.

D'autre part, un pseudo-révertant inefficace a été isolé de la même manière à partir d'un mutant de la souche 444 exigeant en méthionine (444::Tn5.29). Ce pseudo-révertant inefficace a été dénommé (29.86).

Le TABLEAU IX montre les propriétés de ces mutants inefficaces par rapport aux souches mères correspondantes.

Inoculation des plantules de luzerne	Poids sec moyen d'une plantule (mg)	Quantité de C ₂ H ₂ transformée en C ₂ H ₄ /plantule en nM/hr	Nombre moyen de nodules/plantules	Isolément des souches à partir de nodules	Caractères des souches isolées	Temps de génération
44	34	34,2	9	+	Sm ^r	4 H 13
44::Tn5.8	6,6	0	3	+	Sm ^r Km ^r	3 H 23
444	27	31,5	9	+	Sm ^r	4 H 03
444::Tn5.10	33	0	8	+	Sm ^r Arg ⁻	5 H 50
44::Tn5.29	33	35,2	6	+	Sm ^r Km ^r Met ⁻	3 H 52
29.86	6	0	13	+	Sm ^r Km ^r	7 H 05
non inoculée	7	0	0			

TABLEAU IX : COMPARAISON DES SOUCHES INEFFICIENTES PAR RAPPORT AUX SOUCHES TEMOINS.

L'efficacité est mesurée deux mois après infection de plantules de luzerne. Les mesures ont été faites sur huit plantules entières.



L'inefficience de ces trois clones se traduit nettement au niveau du poids sec. En effet, le poids sec des plantules inoculés par les souches inefficientes est sensiblement le même que le témoin non inoculé et nettement inférieur à celui des plantules infectées par les souches mères.



PHOTOGRAPHIE III : ASPECT DES PLANTULES DE LUZERNE INFECTÉES PAR :

- A) La souche sauvage efficiente 444 ;
- B) Le mutant auxotrophe efficient 444::Tn5.29 (Met⁻) ;
- C) Le pseudo-révertant inefficent (29.86).

On voit nettement la présence de nodules racinaires.

Nous remarquons que le temps de génération de la souche inefficente (29.86) est environ le double de celui de la souche d'origine, mais le temps de génération de la souche (44::Tn5.8) est semblable à celui de la souche sauvage 44 .

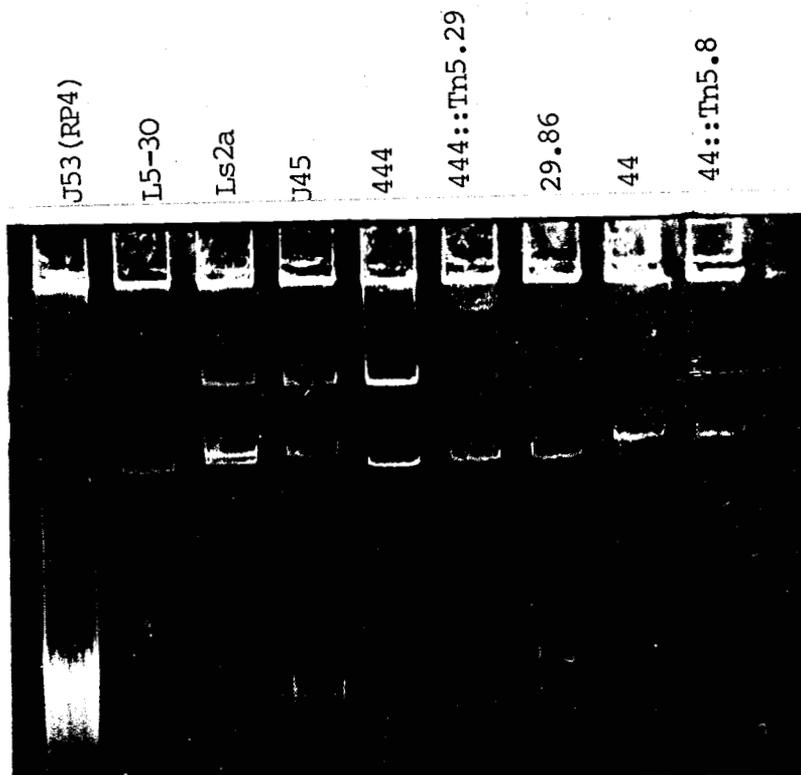
Enfin, le nombre de nodules est intéressant à noter, mais il fait intervenir l'infectivité et non l'efficience.

Signalons que, dans le cas des souches inefficentes, les nodules présentent un aspect déformé, spongieux ; ils sont parfois longs, blancs, ce qui indique que la légghémoglobine est absente dans les nodules.

2 - Electrophorèse

Nous avons, par la suite, effectué une électrophorèse en gel d'agarose dans le but de déterminer si le transposon Tn5 , qui a provoqué l'inefficience chez les clones (44::Tn5.8), (444::Tn5.10) et (29.86) s'est intégré ou non sur les plasmides. Ceci pourrait être prouvé par le fait que les plasmides auraient un poids moléculaire légèrement supérieur (3,8 Md) à celui des souches mères.

L'analyse de la PHOTOGRAPHIE IV montre que les plasmides géants ainsi que ceux de taille moyenne migrent respectivement à égale distance pour le mutant inefficent (44::Tn5.8) et sa souche-mère 44 par rapport à la zone de dépôt. Par contre, les plasmides moyens du mutant (444::Tn5.29) et de ses révertants (29.86) présentent une migration inférieure à celle du plasmide moyen de la souche 444 ; la différence de taille calculée est de + 6.1 Md ; ceci signifie qu'une insertion d'ADN s'est



Souche	Nombre de plasmides	Poids moléculaire des plasmides en Md
444	2	1 : PG (>300) 2 : 85
444::Tn5.29	2	1 : PG (>300) 2 : 91
29.86	2	1 : PG (>300) 2 : 91
44	2	1 : PG (>300) 2 : 101
44::Tn5.8	2	1 : PG (>300) 2 : 101

PHOTOGRAPHIE IV : L'ESTIMATION DU POIDS MOLECULAIRE DES PLASMIDES
DES SOUCHES INEFFICIENTES ET DES SOUCHES
D'ORIGINE

- équation de la droite de régression

$$\log PM : - 2,73 \log MR + 11,94$$

- coefficient de corrélation

$$r : - 0,9996$$

effectuée au niveau du plasmide moyen du mutant (444::Tn5.29) ; cette insertion n'est pas responsable de la perte de l'efficacité chez le révertant (29.86) puisque le mutant correspondant est efficace. Cependant, nous n'avons pas pu déterminer la nature de cette insertion d'ADN. En ce qui concerne le mutant (444::Tn5.10) (Arg⁻) inefficace, aucune différence de taille n'a été observée (voir PHOTOGRAPHIE VI, page 94).

III - MUTANTS AFFECTÉS SUR LE MÉTABOLISME DES EXOPOLYSACCHARIDES

1 - Isolement :

Le clone (M28Str::Tn5.3), obtenu par transposition et incapable de synthétiser le tryptophane a été utilisé pour isoler des mutants prototrophes. Signalons que ce clone donne une fréquence de réversion de l'ordre de 10^{-8} (TABLEAU VIII). Parmi les mutants prototrophes récoltés, deux clones présentent un aspect granuleux, déshydraté et où l'on note également l'absence du halo caractéristique des souches de Rhizobium.

Il faut remarquer que ces clones ont retrouvé leur mucosité après conservation en présence de glycérol (20 %) à - 20° C. Néanmoins, cette mucosité est moins dense que celle des souches de départ.

2 - Dosage d'exopolysaccharides

D'abord, nous avons effectué un dosage chimique d'exopolysaccharides. Ceci a été réalisé pour mesurer les quantités d'exopolysaccharides produites par les cellules bactériennes cultivant en milieu de prolifération jusqu'à ce qu'elles atteignent la phase stationnaire tardive.

Sur le TABLEAU X figurent les résultats suivants :

- Sur milieu TY : aucune différence significative n'a été observée pour les différentes souches analysées ;
- Sur milieu RC fructosé : l'un des deux clones (3.22) donne une quantité d'exopolysaccharides environ moitié plus faible que les souches témoins (M28 str), (M28 str::Tn5.3) ;
- Enfin, sur milieu IS fructosé : les deux clones présumés non-muqueux sont caractérisés par une sécrétion d'exopolysaccharides nettement plus faible que celle des souches parentales.

Pour estimer d'une façon plus précise les quantités d'exopolysaccharides libérés par ces pseudo-révertants, nous nous sommes proposés d'étudier leurs synthèses d'exopolysaccharides en non-prolifération dans le tampon RN⁻ fructosé en présence de fructose marqué en ¹⁴C (2.10⁷ cpm/ml).

Les quantités du fructose transformé en exopolysaccharide indiquent que les pseudo-révertants (3.17) et 3.22) synthétisent environ 3,5 fois moins d'exopolysaccharide que la souche mère (M28 str) et 8 fois moins que le mutant auxotrophe (M28Str::Tn5.3).

Signalons que l'E. coli C600 synthétise une quantité d'exopolysaccharide négligeable.

Par la suite, nous avons contrôlé l'effet de la réversion à l'état de prototrophie sur les résistances de ces pseudo-révertants à l'ampicilline, la kanamycine, le triméthoprime et la tétracycline (voir CHAPITRE II).

Souche	Milieux de prolifération (dosage chimique)			Milieu de non prolifération RN fructosé (1 %)	Phénotype
	TY	RC fructosé (1 %)	IS fructosé (1 %)		
M28Str	46,9	104,1	173,5	63	Sm ^r
M28Str :: Tn5.3	55,9	95,5	252,3	120	Sm ^r Km ^r (200 µg/ml) Trp ⁻
3.17	50,5	80,3	39,6	20	Sm ^r Km ^r (1 500 µg/ml)
3.22	60,6	44,2	37,3	16,3	Sm ^r Km ^r (1 500 µg/ml)
<u>E. coli C600</u>	ND	ND	ND	4,5	Trp ⁻ Leu ⁻ rk ⁻ mk Rec A Rif ^r

TABLEAU X : QUANTITES D'EXOPOLYSACCHARIDES PRODUITES PAR LES PSEUDO-REVERTANTS (3.17), (3.22) ET LES SOUCHES DE DEPART EXPRIMEES EN µg/10⁹ BACTERIES

Les mesures ont été effectuées par deux méthodes :

- 1 - Dosage chimique en prolifération sur milieu TY, RC fructosé et IS fructosé ;
- 2 - Dosage radiochimique en non prolifération dans le tampon RN⁻ fructosé.



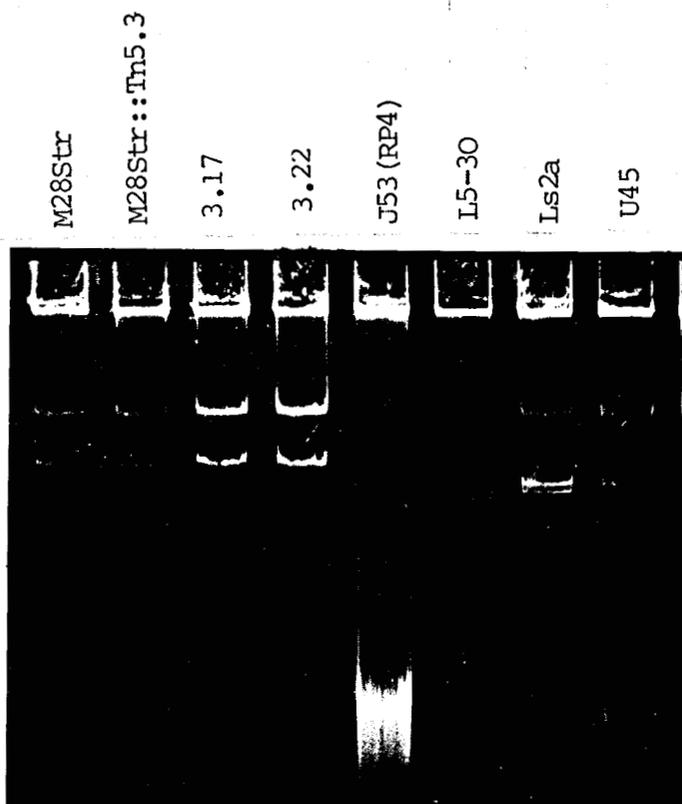
Pour le mutant auxotrophe, la résistance à la kanamycine est acquise pour une concentration égale à 200 µg/ml, tandis que les deux clones issus par réversion de ce dernier se sont avérés résistants à une concentration supérieure en kanamycine (1 500 µg/ml).

3 - Electrophorèse

En principe, le transposon Tn5 inséré sur le gène codant pour la synthèse du tryptophane avait subi une retransposition chez les deux pseudo-révertants. Du fait de l'affinité du transposon Tn5 pour certains gènes, il s'est intégré sur l'un des gènes responsables de la synthèse d'exopolysaccharides chez ces clones peu muqueux.

Une hypothèse a été émise selon laquelle on a pensé que les gènes pour la synthèse d'exopolysaccharides sont localisés sur les plasmides de Rhizobium. Nous avons donc contrôlé cette hypothèse en réalisant une électrophorèse en gel d'agarose de ces deux clones, afin de détecter une éventuelle augmentation de la taille du plasmide.

Cependant, la PHOTOGRAPHIE V montre que le poids moléculaire des plasmides des deux pseudo-révertants est du même ordre que celui de la souche sauvage et de son mutant auxotrophe (133 Md)



Souche	Nombre de plasmides	Poids moléculaire des plasmides en Md
M28Str	2	1 : PG (> 300) 2 : 133
M28Str::Tn5.3	2	1 : PG (> 300) 2 : 132
3.17	2	1 : PG (> 300) 2 : 132
3.22	2	1 : PG (> 300) 2 : 135

PHOTOGRAPHIE V : L'ESTIMATION DU POIDS MOLECULAIRE DES PLASMIDES DES PSEUDO-REVERTANTS AFFECTES SUR LA BIOSYNTHESE D'EXOPOLYSACCHARIDES AINSI QUE DES SOUCHES D'ORIGINE

- équation de la droite de régression

$$\log PM = - 2,73 \log MR + 11,94$$

- coefficient de corrélation

$$r = - 0,9996$$

4 - Propriétés symbiotiques

On a pensé que l'exopolysaccharide excrété par le Rhizobium était l'agent inducteur de l'activité de la polygalacturonase (54), ce qui est possible puisque des mutants non muqueux de Rhizobium leguminosarum perdent leur pouvoir infectieux (72).

Les données précédentes nous ont amenés à étudier les comportements symbiotiques de ces deux clones avec la plante-hôte.

On s'aperçoit dans le tableau suivant (TABLEAU XI), que ces deux pseudo-révertants ne sont pas affectés sur l'infectivité. Ceci se traduit par la présence de nombreux nodules sur les racines secondaires.

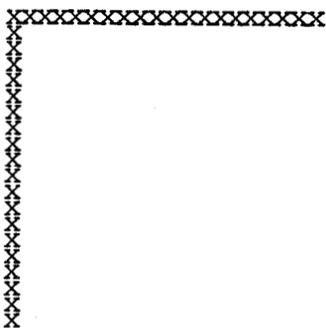
Ils sont également restés efficaces, donc l'expression faible des gènes codant par la synthèse d'exopolysaccharides ne perturbe pas l'efficience de ces mutants.

Inoculation des plantules de luzerne	Poids sec moyen d'une plantule (mg)	Quantité de C ₂ H ₂ transformée en C ₂ H ₄ /plante en nm/hr ⁴	Nombre moyen de nodules par plantule	Isolement des souches à partir de nodules	Caractères des souches isolées
Souche sauvage M28 Str	84	28,4	7	+	Sm ^r
Mutant auxotrophe M28 Str.Tn5.3	77	45,8	6	+	Sm ^r Km ^r (200 µg/ml) Trp ⁻
Pseudo-révertant 3.17	73	18,8	11	+	Sm ^r Km ^r (1 500 µg/ml)
Pseudo-révertant 3.22	75	26,3	11	+	Sm ^r Km ^r (1 500 µg/ml)
Non inoculée	0	0	0		

TABLEAU XI : EVALUATION DE L'INFECTIVITE ET L'EFFICIENCE DES PSEUDO-REVERTANTS AFFECTES SUR LE METABOLISME DES
EXOPOLYSACCHARIDES

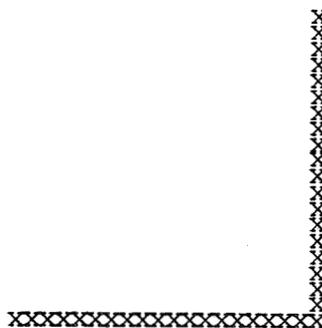


(Mêmes conditions que dans le TABLEAU IX)



CHAPITRE II

ETUDE DES "REVERTANTS PROTOTROPHES"



Dans le CHAPITRE I, paragraphe 5, nous avons estimé la fréquence de réversion des différents mutants de la souche 444 vérifiant ainsi la stabilité de leurs caractères.

Ensuite, nous avons recherché des révertants prototrophes afin de pouvoir isoler de façon indirecte des mutants affectés sur les propriétés symbiotiques, dans le cas où une nouvelle transposition se serait effectuée au niveau de gènes impliqués dans ces propriétés. Ceci correspondrait à une pseudo-réversion.

En effet, un vrai révertant résulte de l'excision du transposon Tn5 ; ceci s'accompagne d'un retour à la prototrophie et de la perte de la résistance à la kanamycine. Nous l'appellerons "vrai révertant".



Cependant, un pseudo-révertant conserve sa résistance à la kanamycine ; le retour à la prototrophie ne provient apparemment pas de la reconstitution du gène altéré par l'insertion du Tn5 , sauf s'il y a retransposition de cet élément à un autre endroit du génome bactérien, suivie d'une excision de la première copie du Tn5 située sur le gène muté. Nous l'appellerons "pseudo-révertant".



(Le terme de "révertants prototrophes" comprend les vrais révertants et les pseudo-révertants).

Nous avons donc, dans un premier temps, procédé à l'étude d'un certain nombre de révertants prototrophes isolés après étalement de différents mutants sur milieu minimum.

I - ISOLEMENT DE RÉVERTANTS PROTOTROPHES ET ÉTUDE DE LEURS RÉSISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES

Nous avons choisi trois mutants auxotrophes portant différentes mutations dues à l'insertion du Tn5 et présentant une fréquence de réversion élevée (TABLEAU VI) : (444::Tn5.10) (444::Tn5.18) et (444::Tn5.27).

Des révertants prototrophes apparaissent sur milieu minimum (Rg1c HB₁) après une dizaine de jours d'incubation ; nous les avons purifiés et ensuite testés afin de déterminer leurs résistances aux antibiotiques.

Nous devons préciser ici que tous les mutants auxotrophes sont résistants à la streptomycine (résistance chromosomique de la souche 444) et à la kanamycine (présence du Tn5 dans leur génome). Cependant, ils sont tous sensibles aux antibiotiques dont la résistance est codée par les trois autres transposons portés par le plasmide "suicide" (Ap : Tn1, Tc : Tn1771, Tp : Tn402).

En cultivant les mutants prototrophes dans un milieu riche contenant 200 ug/ml de kanamycine, nous avons remarqué que quelques mutants prototrophes se développaient pendant 18 heures, tandis que les mutants auxotrophes avaient besoin de trois jours pour dégrader la kanamycine. Ceci nous a fait penser que certains révertants prototrophes étaient plus résistants à la kanamycine que les mutants auxotrophes.

Cependant, nous avons également détecté des révertants prototrophes sensibles à la kanamycine et d'autres résistants à 200 µg/ml de kanamycine.

La majorité de ces révertants issus des trois mutants auxotrophes étudiés sont devenus résistants à de fortes concentrations en kanamycine (supérieures à 1 500 µg/ml).

Quelques pseudo-révertants montrent en plus une résistance à l'ampicilline (100 µg/ml) et au triméthoprime (1 mg/ml). Un seul vrai révertant est issu de la souche (444::Tn5.10), il est sensible à tous les antibiotiques (TABLEAU XII).

A la suite de ces résultats, nous nous sommes proposés de comparer la résistance aux antibiotiques de chaque type de révertants prototrophes par rapport aux souches d'origine (les mutants auxotrophes correspondants R. meliloti 444 et E. coli S111(pSP601)) en milieu liquide sauf dans le cas du triméthoprime où le test est effectué sur milieu solide.

Les résultats sont consignés dans le TABLEAU XIII.

Mutants auxotrophes	Nombre des révertants testés	Résistances aux antibiotiques											
		Ap ^r (300)	Km ^r (1 500)	Tp ^r (1 000)	Tc ^s (10)	Ap ^s (300)	Km ^r (200)	Tp ^s (1 000)	Tc ^s (10)	Ap ^s (300)	Km ^r (1 500)	Tp ^s (1 000)	Tc ^s (10)
444::Tn5.10	37	2				35				33			1
444::Tn5.18	35	8								27			0
444::Tn5.27	34	1								33			0

TABLEAU XII : ETUDE ET REPARTITION DES REVERTANTS PROTOTROPHES EN FONCTION DE LEUR RESISTANCE AUX DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES

Les tests se font par la méthode des "spots" sur milieu solide (RCglc 1 %) dans lequel on ajoute l'antibiotique convenable ; puis incubation à 30° C pendant sept jours. Le chiffre entre parenthèse indique la concentration des antibiotiques exprimée en µg/ml.



Antibiotiques Souche	Ampicilline (300 µg/ml)	Kanamycine	Triméthoprime (1 mg/ml)	Tétracycline (10 µg/ml)
E. coli S111 (pSP601)	R	R (50)	R	R
R. meliloti 444	S	S (200)	S	S
444::Tn5.10	S	R (200)	S	S
10.1	R	R (1 500)	R	S
10.3	S	R (1 500)	S	S
10.20	S	R (200)	S	S
10.29	S	S (200)	S	S
444::Tn5.18	S	R (200)	S	S
18.1	R	R (2 000)	R	S
18.29	S	R (1 500)	S	S
444::Tn5.27	S	R (200)	S	S
27.1	R	R (1 500)	R	S
27.10	S	R (1 500)	S	S

TABLEAU XIII : ETUDE COMPAREE ENTRE LES SOUCHES D'ORIGINE ET LES DIFFERENTS TYPES DE REVERTANTS PROTOTROPHES

Les tests se font en milieu liquide (RCg1c 1 %) additionné de l'antibiotique convenable (sauf dans le cas du triméthoprime où le test est effectué sur milieu solide en méthode des "spots"). L'inoculum est de 10³ bactéries/ml ; incubation à 30° C durant 5 jours. Le chiffre entre parenthèse indique la concentration de la kanamycine exprimée en µg/ml. La concentration en ampicilline et triméthoprime utilisée pour l'E. coli est de l'ordre de 100 µg/ml et 200 µg/ml respectivement.

R = résistant à l'antibiotique
S = sensible à l'antibiotique

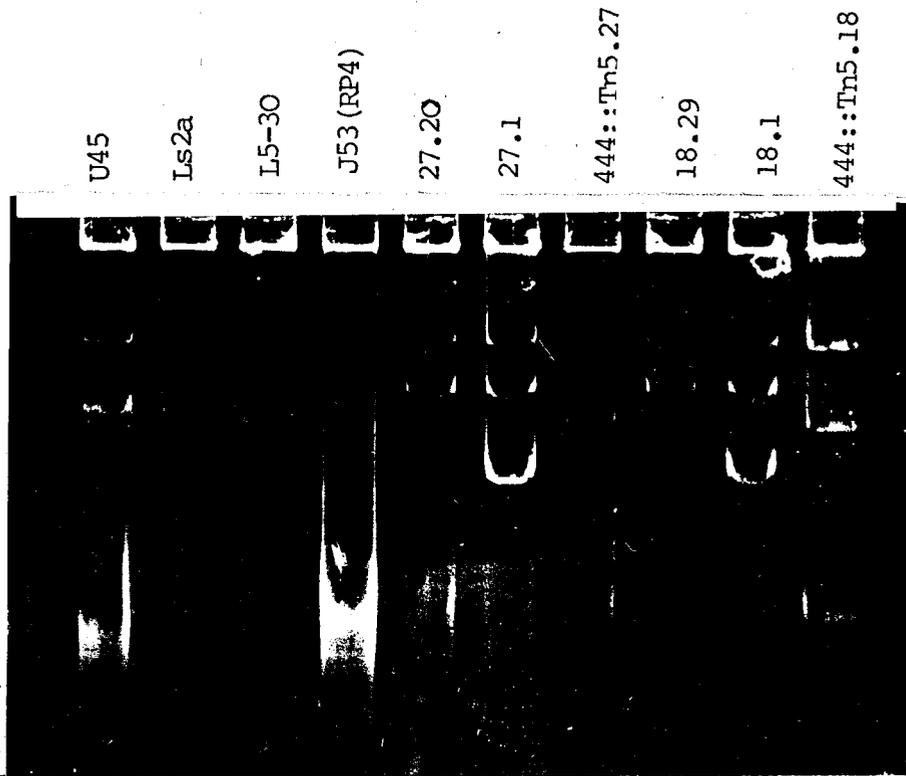


A propos de la kanamycine, certains pseudo-révertants (10.1) (10.3) (18.29) (27.1) et (27.10) se sont avérés environ huit fois plus résistants que les mutants auxotrophes correspondants. Nous remarquons aussi que le pseudo-révertant (18.1) est plus résistant que les autres pseudo-révertants (10.1) et (27.1). Tous ces révertants ont alors été comparés en examinant leur contenu plasmidique.

II - CONTENU PLASMIDIQUE

Nous avons analysé le contenu plasmidique de différents révertants prototrophes isolés précédemment en lysant directement ceux-ci au sommet d'un gel vertical d'agarose, puis en soumettant ces lysats à une électrophorèse, ceci dans le but de rechercher une éventuelle modification de taille des plasmides de ces révertants par rapport à ceux des souches d'origine.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont reproduits dans les PHOTOGRAPHIES VI et VII.



Souche	Nombre de plasmides	Nom et poids moléculaires des plasmides en Md
444::Tn5.18	2	1 : PG (>300) 2 : pM18 (80)
18.1	3	1 : PG (>300) 2 : pM'18.1 (138) 3 : pAB18.1 (43)
18.29	2	1 : PG (>300) 2 : pM'18.29 (139)
444::Tn5.27	2	1 : PG (>300) 2 : pM27 (83)
27.1	3	1 : PG (>300) 2 : pM'27.1 (138) 3 : pAB27.1 (43)
27.20	2	1 : PG (>300) 2 : pM'27.20 (136)

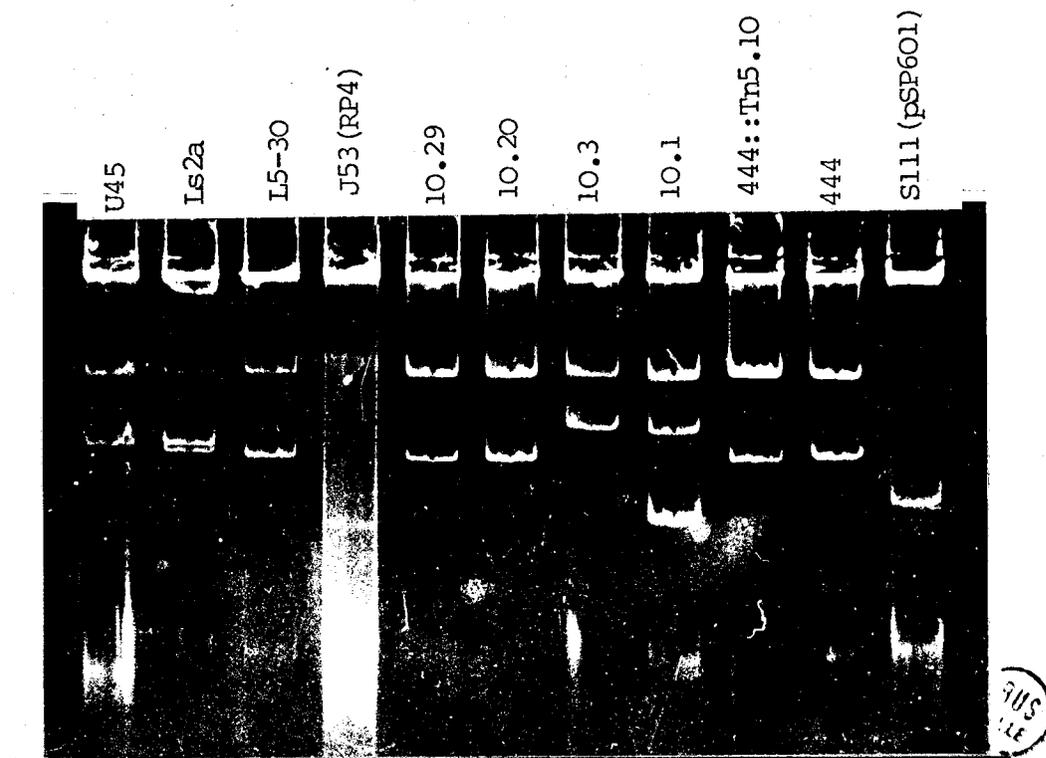
PHOTOGRAPHIE VII : L'ESTIMATION DU POIDS MOLECULAIRE DES PLASMIDES DES PSEUDO-REVERTANTS ISSUS DES MUTANTS AUXOTROPHES 444::Tn5.18 ET 444::Tn5.27

- équation de la droite de régression

$$\log PM = - 2,63 \log MR + 11,6$$

- coefficient de corrélation

$$r = - 0,997$$



Souche	Nombre de plasmides	Nom et poids moléculaires des plasmides en Md
<u>E.coli</u> S111 (pSP601)	1	pSP601 (65)
<u>R. meliloti</u> 444	2	1 : PG (>300) 2 : pM (81)
444::Tn5.10	2	1 : PG (>300) 2 : pM10 (83)
10.1	3	1 : PG (>300) 2 : pM'10.1 (132) 3 : pAB10.1 (45)
10.3	2	1 : PG (>300) 2 : pM'10.3 (139)
10.20	2	1 : PG (>300) 2 : pM10.20 (80)
10.29	2	1 : PG (>300) 2 : pM10.29 (80)

PHOTOGRAPHIE VI : L'ESTIMATION DU POIDS MOLECULAIRE DES PLASMIDES DES REVERTANTS PROTOTROPHES ISSUS DU MUTANT AUTOTROPHE 444::Tn5.10 AINSI QUE CEUX DES SOUCHES D'ORIGINE

- équation de la droite de régression

$$\log PM = - 2,62 \log MR + 11,59$$

- coefficient de corrélation

$$r = - 0,9967$$

Nous avons constaté la présence de deux plasmides moyens chez les trois pseudo-révertants qui présentent trois résistances aux antibiotiques (Km, Ap et Tp). La taille de ces deux plasmides n'est pas identique à celle du plasmide indigène de la souche sauvage et des trois mutants auxotrophes correspondants.

L'évaluation du poids moléculaire de ces deux derniers nous permet de constater que l'un possède un poids moléculaire beaucoup plus élevé de celui du plasmide moyen de la souche 444 et que l'autre présente un poids moléculaire environ égal à la moitié de ce dernier.

Cependant, les pseudo-révertants résistants à 1 500 µg/ml de kanamycine (10.3), (18.29) et (27.10) renferment un seul plasmide moyen ayant un poids moléculaire qui n'est pas homologue à celui des souches de départ, mais qui correspond au poids moléculaire de la deuxième bande plasmidique chez les trois pseudo-révertants précédemment notés.

Enfin, on trouve que le poids moléculaire du plasmide moyen chez le pseudo-révertant (10.20) [résistant à 200 µg/ml de kanamycine] et le vrai révertant (10.29) [sensible aux quatre antibiotiques] est identique à celui de la souche 444.

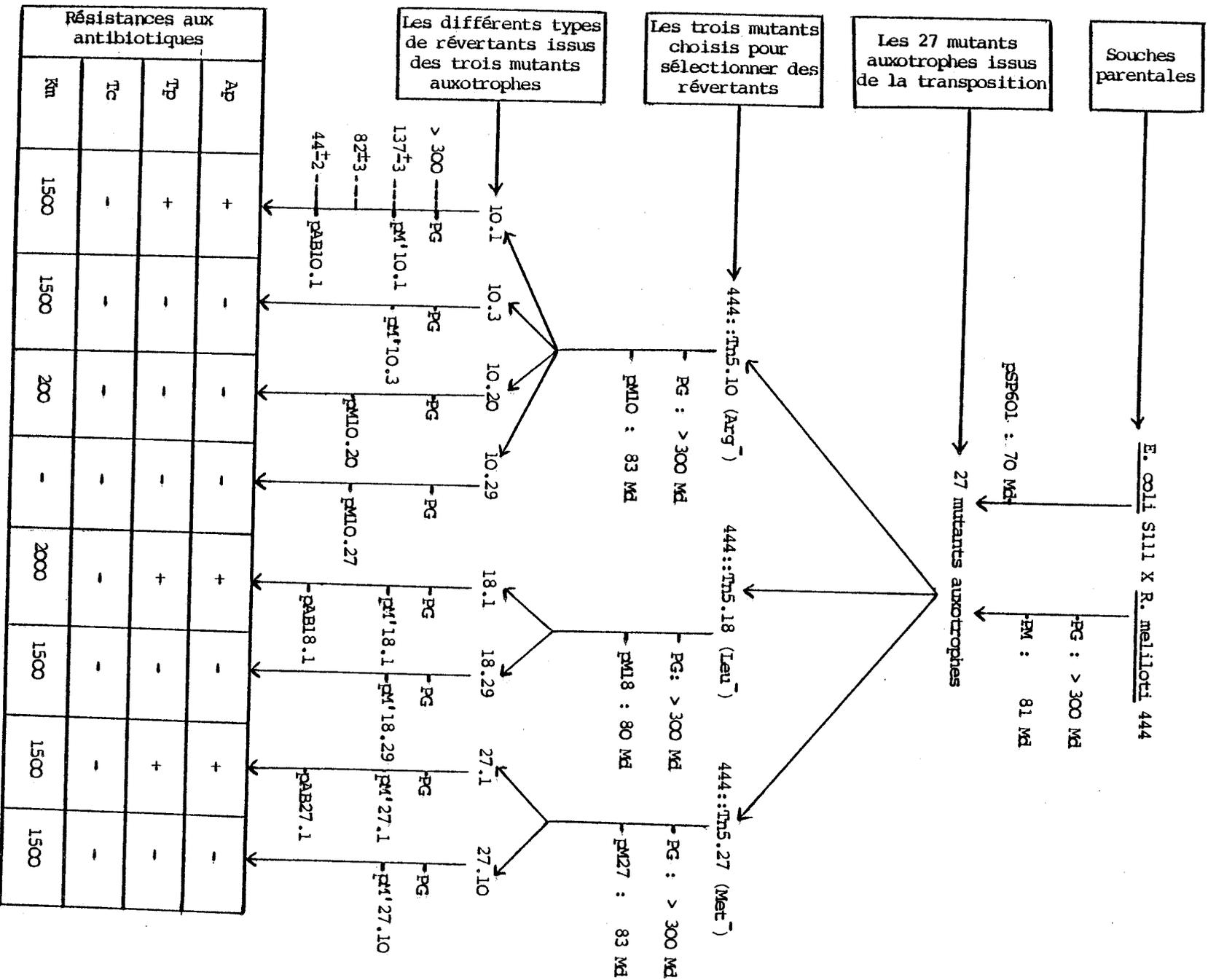
En bref, ces résultats montrent qu'il y a un rapport entre les résistances aux antibiotiques et les contenus plasmidiques de ces révertants prototrophes.

D'autre part, l'apparition du plasmide de taille (137 ± 3 Md), chez les pseudo-révertants résistants à 1 500 $\mu\text{g/ml}$ de kanamycine, est indépendante de celle du plasmide de taille (44 ± 2 Md), qui est caractéristique des pseudo-révertants redevenus résistants à l'ampicilline et au triméthoprime.

Afin de simplifier la suite, nous nous sommes proposés d'immatriculer les différents plasmides selon leur taille chez ces révertants ainsi que chez les souches d'origine.

- Les plasmides chez les pseudo-révertants Ap^{r} Tp^{r} Km^{r} (1 500 $\mu\text{g/ml}$) qui ont un poids moléculaire de l'ordre de 44 ± 2 Md : pAB10.1, pAB18.1 et pAB27.1 ;
- Les plasmides indigènes chez la souche sauvage, les mutants auxotrophes et les révertants prototrophes qui possèdent un poids moléculaire de l'ordre de 82 ± 3 Md : pM, pM10, pM18, pM27, pM10.20 et pM10.29 ;
- Les plasmides chez les pseudo-révertants résistants à 1 500 $\mu\text{g/ml}$ de kanamycine qui ont un poids moléculaire de l'ordre de 137 ± 3 Md : pM'10.1, pM'10.3, pM'18.1, pM'18.29, pM'27.1 et pM'27.10 ;
(Le chiffre du plasmide correspond à celui de la souche).
- Les plasmides géants (PG) existants chez toutes les souches et possédant un poids moléculaire supérieur à 300 Md; celui-ci n'a pu être évalué, ne disposant pas de témoins du même ordre de grandeur.

Nous représentons ici de façon schématisée, les différents plasmides détectés chez les souches étudiées, ainsi que leurs résistances aux antibiotiques.



505
11/15

III - SÉLECTION DE MUTANTS RÉSISTANTS À 1 500 µg/ml DE KANAMYCINE

Dans les résultats précédemment donnés, nous avons remarqué des phénomènes importants chez les différents pseudo-révertants.

D'une part, l'apparition des plasmides (pM') et (pAB) dont les poids moléculaires ne sont pas homologues à celui du plasmide moyen de la souche sauvage ; d'autre part, la résistance importante à la kanamycine de ces révertants.

Toutes ces données nous font penser à la question suivante ; est-ce qu'on peut retrouver les mêmes modifications génétiques par sélection inverse ? c'est-à-dire, est-ce que la mutation de résistance à 1 500 µg/ml de kanamycine pourrait provoquer l'apparition de l'un ou des deux plasmides observés précédemment, ou bien le retour à la prototrophie des mutants auxotrophes ?

Pour répondre à ceci, nous nous sommes proposés de sélectionner des clones résistants à concentration élevée en kanamycine à partir des mêmes mutants auxotrophes (444::Tn5.10 ; arg), (444::Tn5.18 ; leu) et (444::Tn5.27 ; met).

La sélection de ces clones a été faite sur milieu riche (Rglc 1 %) et sur milieu minimum (Rglc HB₁) additionnés de 1 500 µg/ml en kanamycine.

Dans le premier cas, nous avons isolé de nombreux clones résistants à 1 500 µg/ml de kanamycine. A la suite de cet isolement, cinq clones issus de chaque mutant auxotrophe ont été analysés.

Les résultats indiquent que ces clones sont restés auxotrophes pour leur exigence originale et ils ont également gardé leurs sensibilités à l'ampicilline, au triméthoprimine et à la tétracycline.

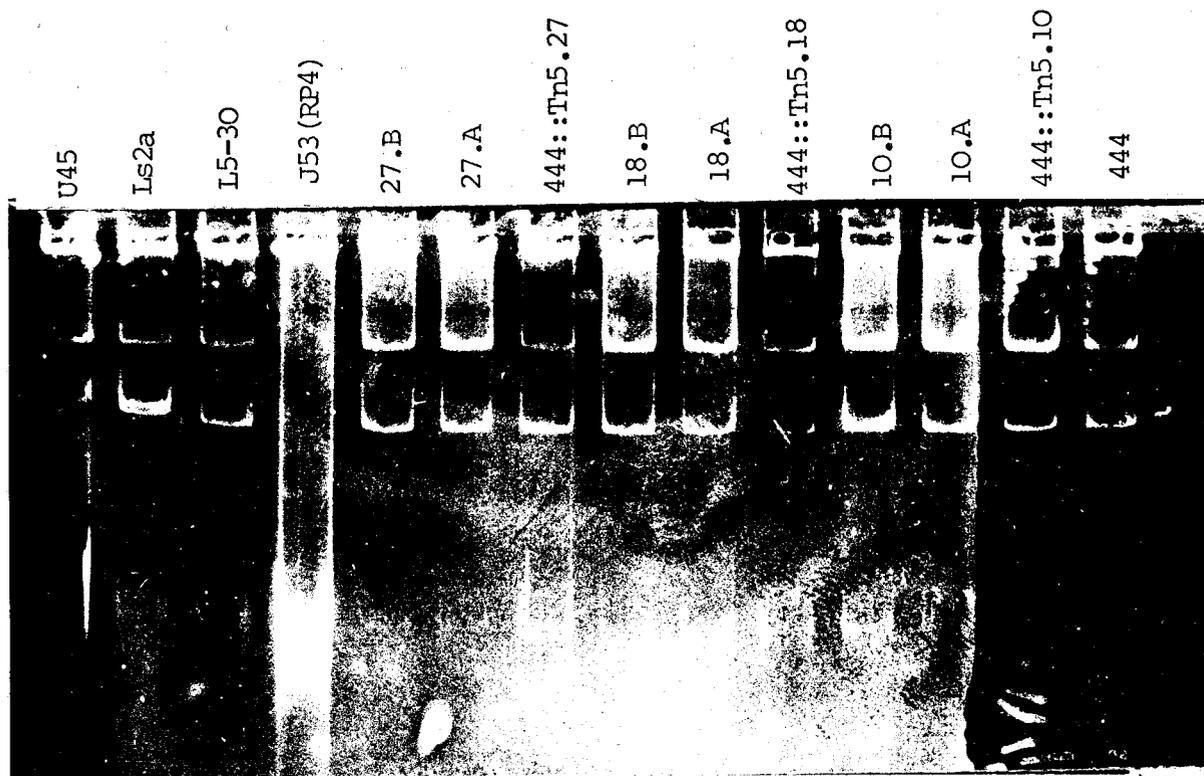
Enfin, nous avons contrôlé l'effet de l'augmentation élevée de la résistance à la kanamycine sur le contenu plasmidique. On note dans la photographie suivante que le poids moléculaire du plasmide moyen des six clones analysés (10.A) (10.B) (18.A) (18.B) (27.A) et (27.B) est identique à celui des mutants auxotrophes correspondants, donc cette résistance élevée à la kanamycine n'apparaît pas forcément liée à une modification du contenu plasmidique.

Néanmoins, la sélection sur milieu minimum de mutants résistants à 1 500 µg/ml de kanamycine a donné une réponse négative, ce qui était prévisible.



IV - TRANSFERT DU PLASMIDE (pAB) À E. coli C600 Rif^r

Nous avons effectué un croisement entre un pseudo-révertant (18.1) résistant à Km, Ap, Tp et qui possède les plasmides (pM^r18.1) et (pAB18.1) et une souche d'E. coli C600 qui est dépourvue de plasmide, afin de savoir si le plasmide (pAB18.1) était transférable et quels gènes de résistance il portait.



Souche	Nombre de plasmides	Poids moléculaire des plasmides en Md
444	2	1 : PG (>300) 2 : 85
444::Tn5.10	2	1 : PG (>300) 2 : 83
10.A	2	1 : PG (>300) 2 : 83
10.B	2	1 : PG (>300) 2 : 84
444::Tn5.18	2	1 : PG (>300) 2 : 81
18.A	2	1 : PG (>300) 2 : 82
18.B	2	1 : PG (>300) 2 : 81
444::Tn5.27	2	1 : PG (>300) 2 : 83
27.A	2	1 : PG (>300) 2 : 84
27.B	2	1 : PG (>300) 2 : 84

PHOTOGRAPHIE VIII : L'ESTIMATION DU POIDS MOLECULAIRE DES PLASMIDES DES MUTANTS RESISTANTS A 1500 µg/ml EN KANAMYCINE ET DES SOUCHES DE DEPART

- équation de la droite de régression

$$\log PM = - 2,13 \log MR + 10,84$$

- coefficient de régression

$$r = - 0,99$$

La souche réceptrice est rendue résistante à la rifamycine SV afin de sélectionner les transconjugants éventuels sur milieu riche (RCglc 1 %) auquel on a ajouté de l'ampicilline (100 µg/ml) et de la rifamycine (100 µg/ml).

Les fréquences obtenues à la suite de ce croisement sont significatives :

- La fréquence de transfert de la résistance à l'ampicilline est de l'ordre de $8,7 \cdot 10^{-6}$.

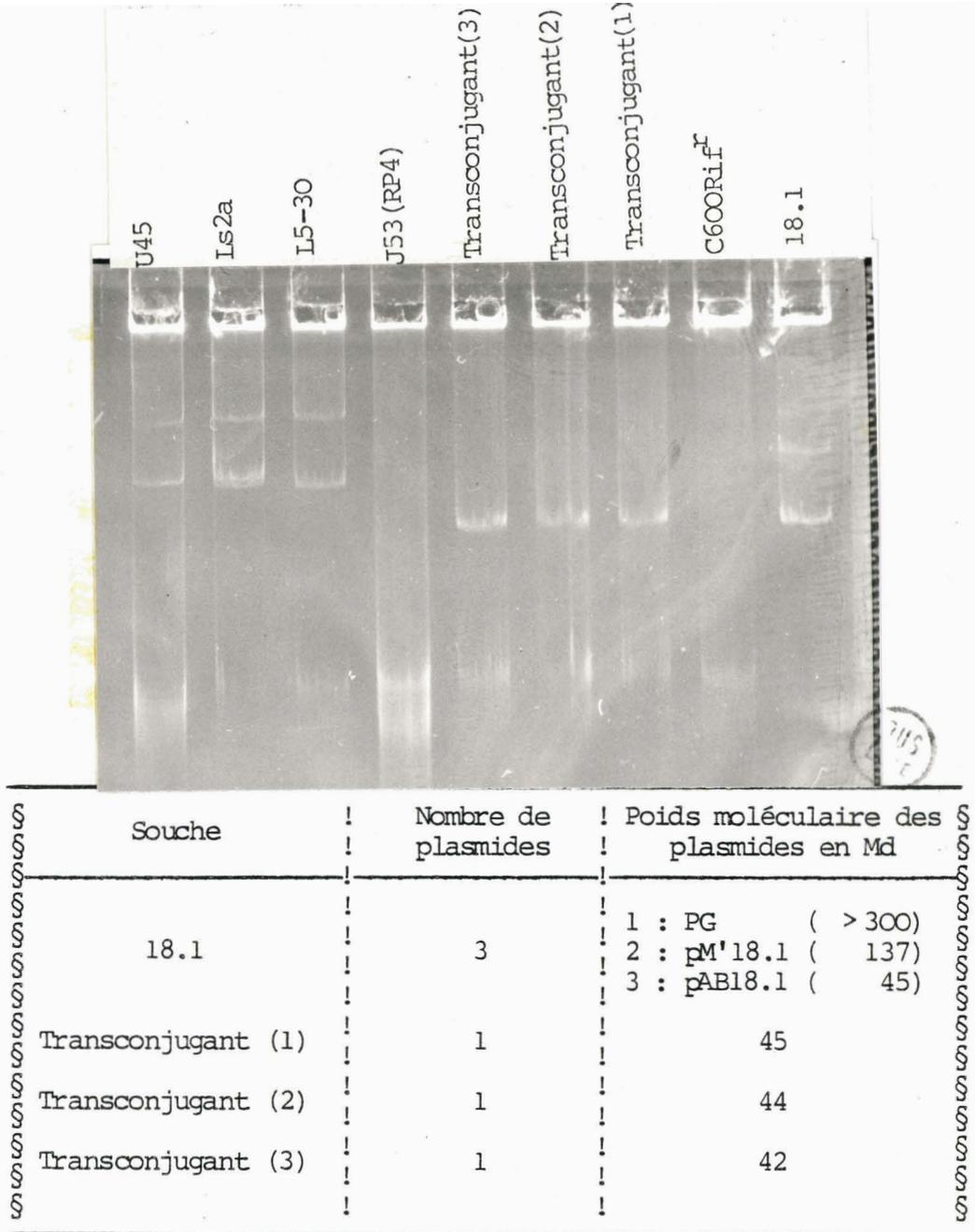
- La fréquence des mutants spontanés de la souche E. coli C600 résistants à 100 µg/ml d'ampicilline est inférieure à $1,8 \cdot 10^{-8}$.

L'analyse de trois transconjugants montre qu'ils ont acquis les caractères de résistance à l'ampicilline et au triméthoprime. Par contre, ils n'ont pas reçu les caractères de résistance à la kanamycine et à la tétracycline.

Nous avons par la suite effectué une électrophorèse pour savoir lequel des deux plasmides est transféré à E. coli. Les résultats sont indiqués dans la PHOTOGRAPHIE IX.

Nous remarquons la présence d'une bande plasmidique chez les trois transconjugants analysés qui correspond à celle occupée par le plasmide (pAB18.1) de la souche donatrice.

L'évaluation du poids moléculaire de ce plasmide transféré est d'environ 44 ± 2 Md, qui correspond approximativement à celui du pseudo-révertant (18.1).



PHOTOGRAPHIE IX : L'ESTIMATION DU POIDS MOLECULAIRE DU PLASMIDE (pAB18.1) ACQUIS PAR LES TROIS TRANSCONJUGANTS ISSUS DU CROISEMENT ENTRE LE PSEUDO-REVERTANT (18.1) et E. coli C600 Rif^r

- équation de la droite de régression

$$\log PM = - 2,83 \log MR + 12,08$$

- coefficient de corrélation

$$r = - 0,9981$$

D'après l'étude de ces données, nous pouvons dire que :

- Le plasmide (pAB) est conjugatif ;
- Il porte la résistance à l'ampicilline et au triméthoprime ;
- Cependant la résistance à la kanamycine n'est pas portée par ce plasmide.

Cette résistance élevée à la kanamycine est supposée portée par le plasmide (pM') qui n'a pas été transféré (non conjugatif).

V - INDUCTION DU PHAGE Mu

Le poids moléculaire du plasmide (pAB) observé chez les pseudo-révertants est d'environ 44 ± 2 Md. Or, le poids moléculaire théorique du plasmide "suicide" (pSP601) correspond à la somme des poids moléculaires du plasmide R751 contenant le transposon Tn402 (30 Md), l'ADN du bactériophage Mu_{C+} (25 Md), des transposons Tn1 (3,1 Md), Tn5 (3,8 Md) et Tn1771 (7,1 Md), soit un total de 69 Md (nous trouvons environ 70 Md en électrophorèse).

Le transfert du plasmide (pAB) à E. coli C600 rif ne s'accompagne pas de l'acquisition des résistances à la kanamycine et à la tétracycline ; cela signifie que les transposons correspondants ne sont pas portés par ce plasmide.

Il en ressort que si on additionne les poids moléculaires du plasmide R751 (Tn402) soit 30 Md, de l'ADN du bactériophage Mu_{C^+} (25 Md) et du Tn1 (3,1 Md), on obtient un total de (58,1 Md) qui est supérieur de 14,1 Md au poids moléculaire du plasmide transférable des pseudo-révertants.

Celui-ci doit donc contenir : soit une partie de l'ADN du bactériophage Mu_{C^+} soit un fragment d'ADN provenant du génome du Rhizobium où le plasmide (pAB) était inséré chez les mutants auxotrophes.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tenté d'induire le phage Mu_{C^+} en se basant sur les résultats de BOUCHER et coll. (14). Ces auteurs ont réussi à induire le phage Mu_{C^+} intégré sur le R facteur chez R. meliloti 2011.

Après induction du phage Mu_{C^+} à l'aide du chloroforme, on n'a pas observé de plages de lyse dans le cas des pseudo-prototrophes (10.1), (18.1), (27.1) ainsi que chez les mutants auxotrophes correspondants et la souche-mère 444.

Par contre, l'induction de ce phage a été réalisée chez les souches témoins d'E. coli S111 (pSP601) Mu_{C^+} Mu_{C^r} et 220-20 Mu_{C^+} Mu_{C^r} . Ceci a provoqué la formation de petites plages de lyse sur la souche indicatrice E. coli W3350 étalée sur milieu de LURIA gélosé additionné de tryptophane, 0,1 mM ; $CaCl_2$, 2,5 mM ; $MgSO_4$, 1 mM, ces éléments étant nécessaires à l'adsorption du phage Mu sur la souche indicatrice (89).

de l'année 1900

absent de la liste des personnes autorisées et

ou qui ne s'exprime pas.

10 DE 01

En outre les personnes autorisées

révisées

de l'année

A la lumière de ces données, on peut constater que le phage μ_{c+} est absent chez les mutants auxotrophes et les pseudo-révertants, ou qu'il ne s'exprime pas.

VI - TEMPS DE GÉNÉRATION

En cultivant les révertants prototrophes en milieu liquide, nous avons remarqué que certains pseudo-révertants se développent plus rapidement que la souche mère 444 ou que les mutants auxotrophes correspondants.

Ensuite, nous nous sommes proposés d'établir leurs courbes de croissance (FIGURES IX, X, XI) afin de déterminer leurs temps de génération de façon précise. Les densités optiques des cultures en milieu riche (RCglc 1 %) ont été suivies au moyen d'un biophotomètre (I.N.S.E.R.M.).

On constate, d'après le TABLEAU XV que le temps de génération des trois pseudo-révertants (10.1), (18.1) et (27.1) est plus court que ceux de la souche sauvage et 444 et des trois mutants auxotrophes originaux.

Cette réduction du temps de génération pourrait être due à une modification du métabolisme chez ces révertants ; cependant, le révertant (18.29), qui possède le même contenu plasmidique et la même résistance à la kanamycine que ces derniers, peut pousser plus vite que la souche sauvage. Donc le faible taux de croissance observé chez les révertants (10.3) et (27.10) ne dépend pas du contenu plasmidique, et du niveau élevé de résistance à la kanamycine.

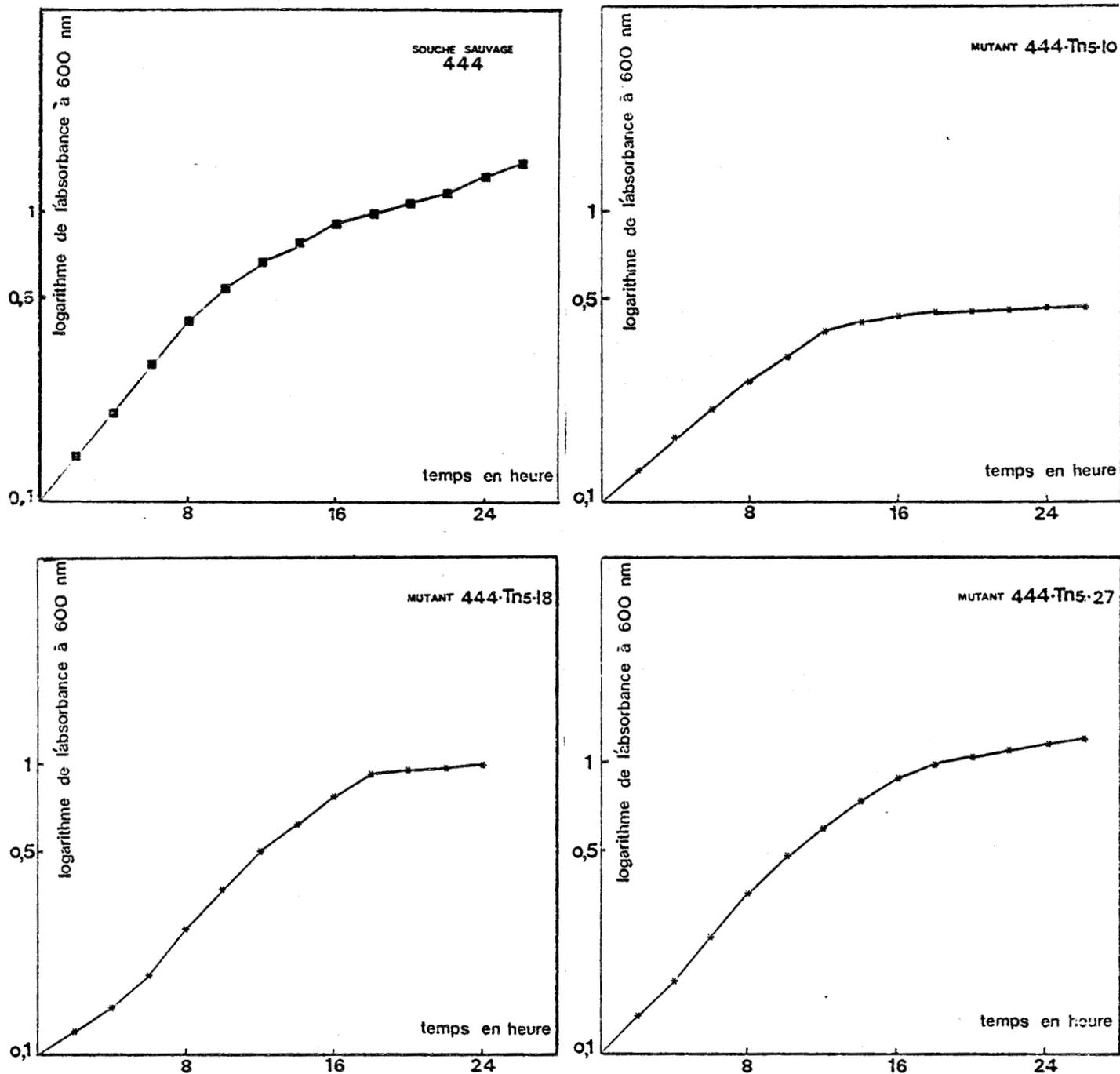


FIGURE IX : EVOLUTION DE LA CROISSANCE DE LA SOUCHE SAUVAGE 444 ET LES
 TROIS MUTANTS AUXOTROPHES

Cultures suivies au biophotomètre I.N.S.E.R.M. (voir les conditions
 expérimentales dans Matériel et Méthodes).



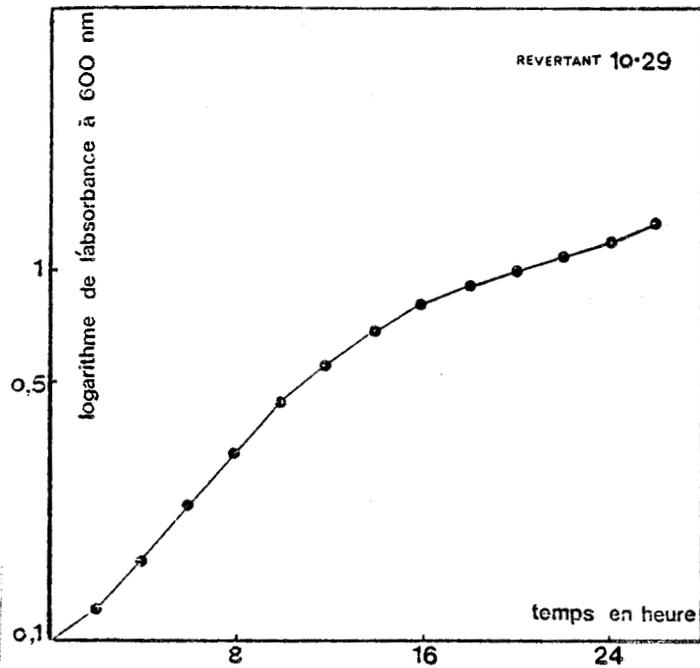
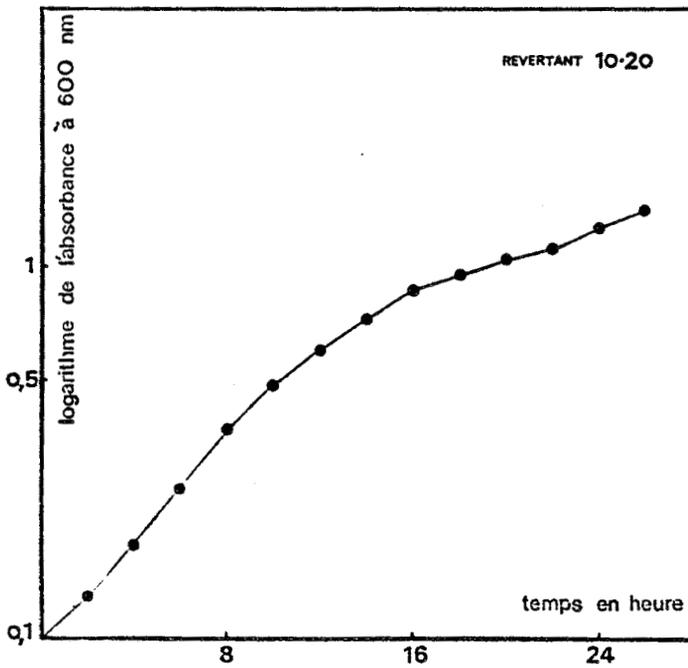
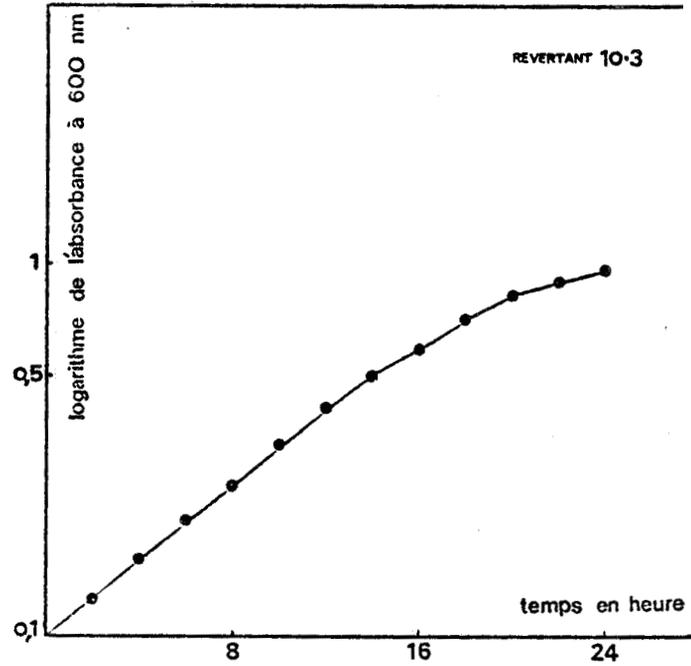
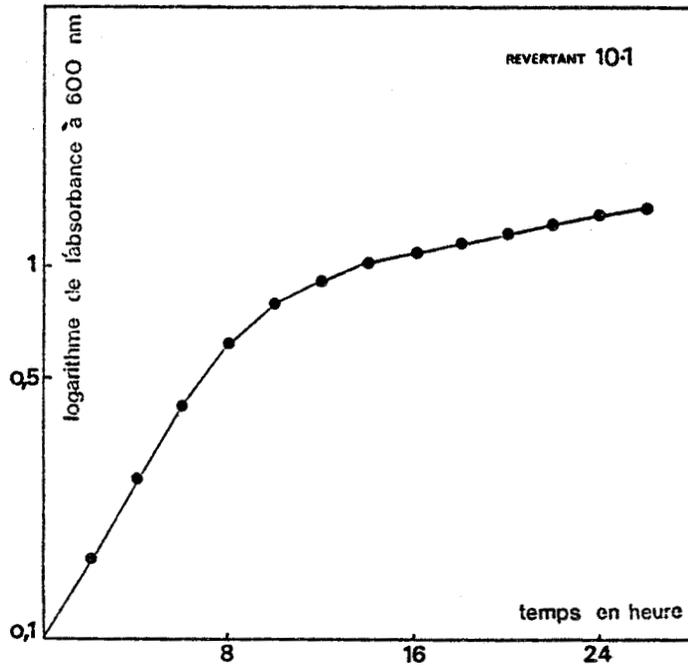


FIGURE X : EVOLUTION DE LA CROISSANCE DES REVERTANTS PROTOTROPHES ISSUS
DU MUTANT AUXOTROPHE 444::Tn5.10



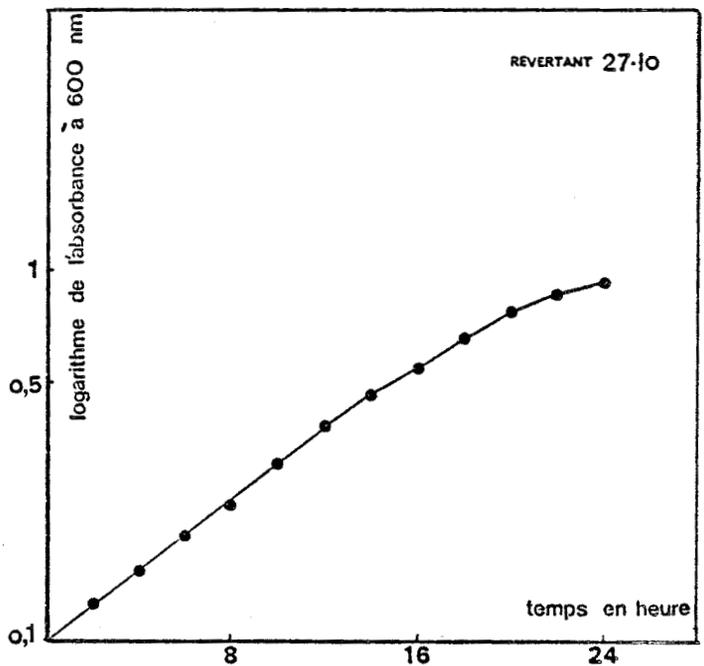
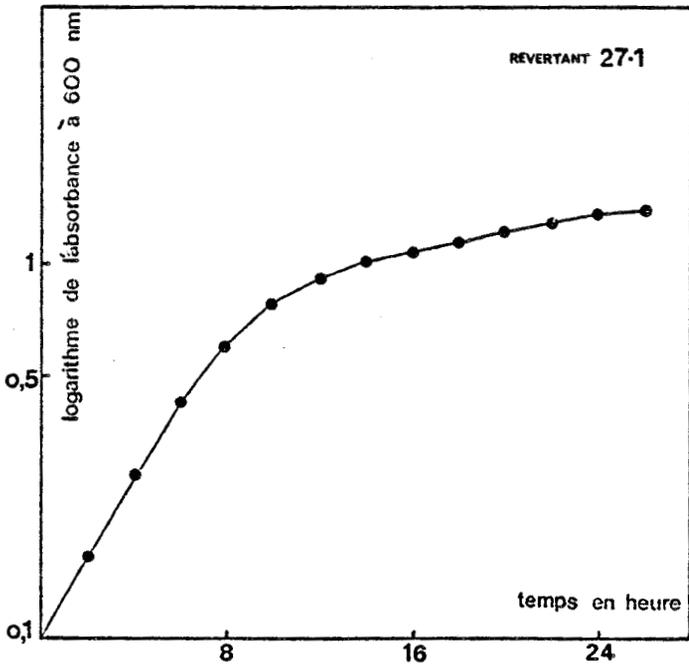
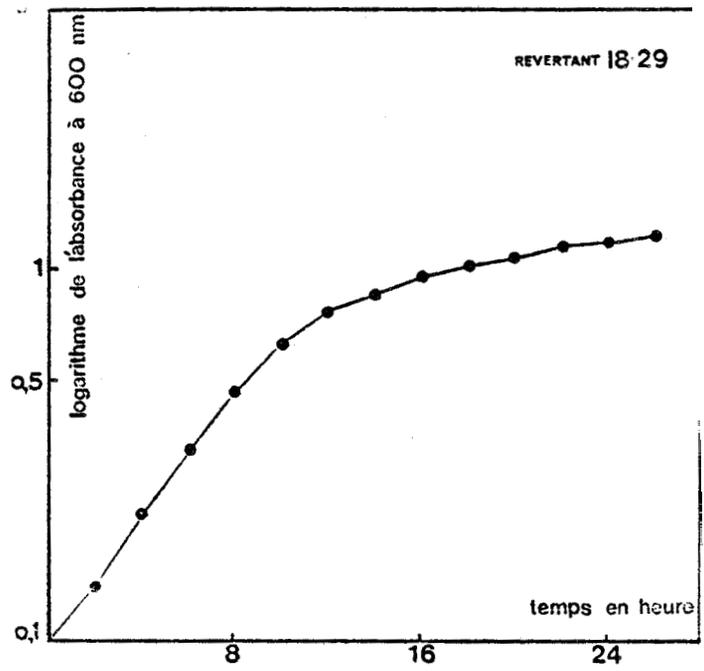
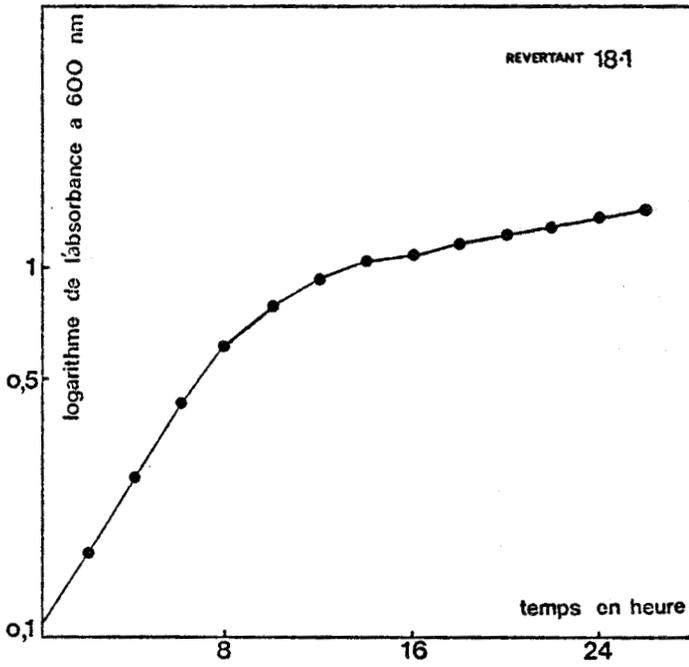


FIGURE XI : EVOLUTION DE LA CROISSANCE DES PSEUDO-REVERTANTS ISSUS DES
 MUTANTS AUXOTROPHES 444::Tn5.18 ET 444::Tn5.27



Souche	Taux de croissance numérique	Temps de génération
444	0,247	4 H 03
444::Tn5.10	0,171	5 H 50
10.1	0,324	3 H 05
10.3	0,167	6 H 00
10.20	0,244	4 H 06
10.29	0,237	4 H 15
444::Tn5.18	0,234	4 H 17
18.1	0,320	3 H 08
18.29	0,294	3 H 24
444::Tn5.27	0,243	4 H 07
27.1	0,320	3 H 07
27.10	0,155	6 H 26

TABLEAU XIV : ETUDE COMPAREE DES REVERTANTS PROTOTROPHES ET DES SOUCHES
D'ORIGINE EN FONCTION DU TEMPS DE GENERATION



Enfin, nous voyons que le taux de croissance est semblable chez le pseudo-révertant (10.20) et le vrai révertant (10.27), ainsi que la souche d'origine ; on remarque qu'ils correspondent aux seuls types des révertants qui n'ont pas subi une modification du contenu plasmidique.

VII - PROPRIÉTÉS SYMBIOTIQUES

Dans l'introduction de ce travail, nous avons exposé les différents arguments en faveur de la localisation des gènes codant pour les propriétés symbiotiques sur les plasmides de Rhizobium.

Les pseudo-révertants que nous avons isolés résultant probablement de la retransposition du Tn5 à un autre endroit du génome de la souche de R. meliloti 444, il nous a semblé indispensable de tester les propriétés symbiotiques de ces pseudo-révertants, afin de voir si le transposon Tn5 ne s'était pas intégré dans l'un des gènes contrôlant ces fonctions.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Inoculation des plantules de luzerne	Poids sec moyen d'une plantule (mg)	Quantité de C ₂ H ₂ transformée en C ₂ H ₄ /plante en nm/hr	Nombre moyen de nodules par plantule	Isolément des souches à partir de nodules	Caractères des souches isolées	Phénotype
444	27	31,5	9	+	Sm ^r	
444::Tn5.10	33	0	8	+	Sm ^r	Arg ⁻
10.1	82	29,8	11	+	Sm ^r , Ap ^r , Tp ^r , Km ^r (1500 µg/ml)	
10.3	30	30,7	4	+	Sm ^r , Km ^r (1500 µg/ml)	
444::Tn5.18	14	N.D.	21	-		
18.1	57	36,4	12	+	Sm ^r , Ap ^r , Tp ^r , Km ^r (1500 µg/ml)	
444::Tn5.27	22	17,1	8	+	Sm ^r , Km ^r (1500 µg/ml)	
27.1	68	64,7	11	+	Sm ^r , Ap ^r , Tp ^r , Km ^r (1500 µg/ml)	
Non inoculée	7	0	0			

TABLEAU XV : EVALUATION DE L'EFFICACITE DES PSEUDO-REVERTANTS, DES MUTANTS AUXOTROPHES CORRESPONDANTS ET DE LA SOUCHE SAUVAGE

(Mêmes conditions que dans le TABLEAU IX)

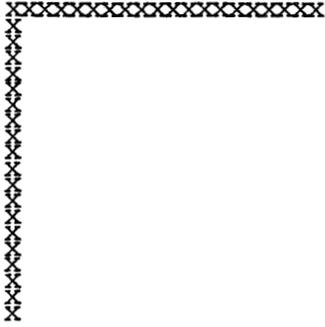


On constate dans l'ensemble de ces données, que le poids sec moyen des plantules infectées par les trois pseudo-révertants nommés : (10.1), (18.1) et (27.1) est deux à trois fois plus élevé que celui de la souche mère, bien que les activités nitrogénasiques exprimées par les gènes nif soient sensiblement proches de celle de la souche 444. Cependant, le pseudo-révertant (27.1) montre une activité nitrogénasique deux fois plus importante que celle de la souche parentale.

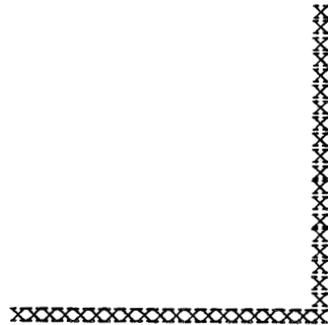
Par contre, le mutant exigeant en arginine (444::Tn5.10) montre une activité de la nitrogénase nulle (revoir le TABLEAU VIII). Cette activité est deux fois moindre dans le cas du mutant (444::Tn5.27).

Enfin, pour vérifier si les souches inoculées avaient bien conservé leurs caractères initiaux, nous avons isolé les souches à partir de leurs nodules pour les identifier.

Nous remarquons que le mutant (444::Tn5.27) a perdu son exigence en méthionine et que la souche (444::Tn5.10) est devenue sensible à la kanamycine à 200 µg/ml, tandis que les autres souches ont gardé leurs marqueurs génétiques d'origine.



DISCUSSION



Ce travail a d'abord consisté à isoler des mutants auxotrophes par l'insertion du transposon Tn5 dans le génome de R. meliloti.

Dans un premier temps, nous avons effectué des transpositions entre l'E. coli S111 (pSP601) et vingt souches de R. meliloti, afin de sélectionner les souches présentant les meilleures fréquences d'acquisition du transposon Tn5 .

Les résultats indiquent que certaines souches sont capables de l'acquérir à une fréquence satisfaisante. L'incapacité des autres souches à la recevoir peut être expliquée par plusieurs hypothèses :

- Le plasmide "suicide" portant le transposon Tn5 est soumis à une restriction importante de la part de la souche réceptrice d'où une fréquence d'insertion du Tn5 très faible ;

- La résistance à la kanamycine codée par le transposon Tn5 ne peut s'exprimer à cause d'une régulation ou d'une répression variable selon les souches.

Il est apparu au fil des études que la fréquence de transfert du transposon Tn5 est de 10^{-6} en moyenne.

Ces résultats concordent avec ceux trouvés chez R. leguminosarum, R. phaseoli et R. trifolii (12, 92) en utilisant aussi un plasmide du groupe d'incompatibilité P1 comme support de ce transposon, tandis que cette fréquence est mille fois plus élevée (10^{-3}) chez

E. coli, lors de la transposition du Tn5, véhiculé par le bactériophage λ (81). Le mécanisme de transfert du vecteur du transposon Tn5 doit jouer un rôle important dans ce phénomène.

En ce qui concerne la spécificité de l'intégration du transposon Tn5 sur les séquences d'ADN, elle se traduit par le fait que son insertion provoque deux mutations dont l'une rend la souche réceptrice résistante à la kanamycine. Parmi les bactéries mutées, 0,3 % sont des mutants auxotrophes.

Nous sommes en mesure de lier cette spécificité par rapport aux mutants auxotrophes selon deux paramètres : le nombre et le type de ces mutants.

Dans l'ensemble des résultats, on constate que le nombre des mutants exigeants en méthionine, arginine, leucine, tryptophane, adénine et pyrimidine est plus important que les autres.

D'autre part, en faisant une comparaison de nos résultats avec ceux déjà obtenus par BERINGER (12) et par WALTON (92) à la suite de leurs travaux sur R. leguminosarum, R. phaseoli et R. trifolii (il est à noter que le même transposon a été employé pour l'obtention des mutants auxotrophes), on constate que l'élément transposable Tn5 montre une grande affinité pour les séquences de gènes gouvernant la synthèse de la méthionine. Ceci se traduit par la présence de mutants déficients pour la synthèse de cet acide aminé chez les différentes espèces (TABLEAU XVI).

Exigences	<u>R. meliloti 444</u>	<u>R. meliloti M28Str</u>	<u>R. leguminosarum</u> utilisé par BERINGER (12)	<u>R. phaseoli</u> utilisé par BERINGER (12)	<u>R. trifolii</u> utilisé par WALTON (92)	<u>R. trifolii</u> utilisé par BERINGER (12)
Méthionine	8	4	2	1	2	0
Leucine	4	1	2	1	0	0
Tryptophane	0	5	0	2	1	2
Adénine	0	4	5	2	0	0
Cystéine/Méthionine	2	2	0	2	0	0
Arginine	10	2	0	0	0	0
Histidine	1	0	0	0	2	0
Uracile	0	0	0	1	1	0
Pyrimidine	0	4	0	0	0	0
Serine	0	0	2	0	0	0
Phe/Trp/Tyr	0	2	0	0	0	0
Phe/Tyr	0	0	1	0	0	0
Phénylalanine	0	0	0	1	0	0
Tyrosine	1	0	0	0	0	0
Adénine ou guanine	0	0	1	0	0	0
Adénine ou hypoxathine	0	0	0	0	1	0
Arginine/Pyrimidine	1	0	0	0	0	0
Cystéine	0	1	0	0	1	0
Lysine	0	1	0	0	0	0
Leu/Ile/Val	0	0	0	0	0	1
RiboFlavine	0	0	1	0	0	0

TABLEAU XVI : REPARTITION DES MUTANTS AUXOTROPHES OBTENUS JUSQU'A PRESENT PAR L'INSERTION DU TRANSPOSON Tn5 SUR LE GENOME DES DIFFERENTES ESPECES DE Rhizobium

Le chiffre représente le nombre de mutants.

Phe : phénylalanine ; Trp : tryptophane ; Tyr : tyrosine ; Leu : leucine ; Ile : isoleucine ; Val : valine

En revanche, la mutation portant sur le caractère arginine se manifeste particulièrement chez R. meliloti, tandis que la mutation concernant la leucine se répète chez toutes les espèces, sauf dans le cas de R. trifolii. Les mutants exigeant en adénine existent chez toutes les espèces et peuvent faire défaut dans la même espèce (R. meliloti 444) d'une souche à l'autre. Par ailleurs, la mutation relative à la cystéine/méthionine apparaît chez les deux souches de R. meliloti ainsi que chez R. phaseoli. Enfin, les R. meliloti M28Str, R. phaseoli et R. trifolii sont touchés au niveau des gènes du tryptophane.

Ces données indiquent que le transposon Tn5 peut s'intégrer en de multiples sites sur le génome de Rhizobium, mais cette intégration ne se fait pas tout-à-fait au hasard. Certaines régions d'ADN sont des "points chauds", puisqu'on y trouve un certain nombre de séquences communes reconnues par ce transposon comme celles codant pour la synthèse de la méthionine, leucine, tryptophane, adénine et cystéine/méthionine. Ceci se réalise vraisemblablement grâce à une certaine homologie entre les séquences d'ADN des deux extrémités de ce transposon et les sites génétiques précédemment notés; cela permet également de constater une certaine parenté génétique entre les mêmes gènes de différentes espèces de Rhizobium.

De plus, MILLER (62) et coll. ont prouvé que le transposon Tn5 montre une forte corrélation avec les régions riches en bases nucléiques A + T de l'opéron lactose.

Comme le transposon Tn5 perturbe la continuité des gènes, il peut, lors de son excision, rendre les gènes capables de s'exprimer

à nouveau, donc le phénomène est réversible. Mais il peut aussi provoquer des délétions irréparables. Ceci se ferait au cours de la division cellulaire, lorsque le réplicon subit une erreur de réplication (35).

La fréquence de réversion des mutants auxotrophes (retour à la prototrophie) s'échelonne entre 10^{-6} et 10^{-9} . Le fait que cette fréquence varie d'un mutant à un autre au sein d'une même catégorie suggère que cette variation est indépendante du site d'insertion.

Le passage des mutants auxotrophes sur les intermédiaires de biosynthèse des acides aminés et des bases nucléiques nous a indiqué les sites précis de l'intégration du transposon Tn5 sur l'un des gènes correspondants. Ceci nous a permis de regrouper les mutants exigeants en un même acide aminé.

On peut parallèlement tirer la conclusion que les voies de biosynthèse des métabolites chez R. meliloti (surtout arginine, méthionine, cystéine et pyrimidine) présentent vraisemblablement une similitude avec celles d'E. coli.

D'autres mutants peuvent être isolés à l'aide de cet agent mutagène comme des souches inefficaces et des mutants affectés sur la biosynthèse d'exopolysaccharides. Ceci montre que le transposon Tn5 est capable également de se greffer au niveau des gènes impliqués dans la symbiose.

En effet, l'inefficience des clones (44::Tn5.8) et (444::Tn5.10) est provoquée par l'insertion du transposon Tn5 directement sur l'un des gènes en rapport avec la symbiose, tandis que l'inefficience du pseudo-révertant (29.86) résulte de la retransposition de ce transposon intégré sur un des gènes de la méthionine vers l'un des gènes de la fixation d'azote. Le retour à la prototrophie provient apparemment de l'excision de la première copie du Tn5 située sur ce gène de la méthionine.

Signalons qu'il nous a été impossible de déterminer la fréquence d'apparition des mutants inefficients parmi les bactéries ayant acquis le transposon Tn5 puisqu'à ce jour, il n'existe pas de milieu sélectif permettant leur isolement. Celui-ci nécessite un passage sur plante pour tester la fixation d'azote ; ceci demande beaucoup de temps (2 mois) et de travail : en effet, pour déterminer cette fréquence, nous aurions dû tester au moins 10^6 clones, puisque ces mutants ont une probabilité faible.

La sensibilité de la méthode d'estimation des poids moléculaires des plasmides par la technique d'électrophorèse en gel d'agarose, ne nous a pas permis de savoir si le transposon Tn5, qui a provoqué l'inefficience chez ces clones, s'est installé ou non sur les plasmides moyens, car cette méthode donne une erreur de l'ordre de ± 4 Md (67), soit la taille du transposon Tn5 (3,8 Md). Cependant, chez le mutant 444::Tn5.29 (Met⁻) et son révertant Fix⁻ (29.86), une augmentation de taille d'environ 6.1 Md a été observée, correspondant à l'insertion d'un fragment d'ADN dont nous n'avons pas pu déterminer la nature.

En plus, par cette technique, on peut estimer le poids moléculaire des plasmides dont la taille est inférieure à 140 Md (19), ce qui n'est pas le cas des plasmides géants (supérieure à 300 Md).

Deux techniques pourraient être ultérieurement employées pour vérifier l'hypothèse de la localisation des gènes nif sur les deux plasmides de la souche 444 :

- L'hybridation de ces deux plasmides avec, par exemple, le plasmide pSA30 portant les gènes nif de K. pneumoniae ;

- La mobilisation de ces plasmides (un plasmide à la fois) et leur transfert chez une autre souche inefficente de R. meliloti sensible à la kanamycine.

En ce qui concerne les mutants peu muqueux, on n'a pas pu faire la relation entre la synthèse d'exopolysaccharides et l'infectivité comme cela a été trouvé chez R. leguminosarum, puisqu'un mutant non muqueux de cette espèce avait perdu son pouvoir infectieux (72). Il semble donc qu'on peut conclure que l'expression faible des gènes codant pour la synthèse d'exopolysaccharides chez ces mutants n'aboutit pas à la perte du pouvoir infectieux.

L'étude de révertants prototrophes nous a permis d'observer des phénomènes intéressants se traduisant par le fait que plusieurs évènements génétiques se sont produits chez ces révertants.

D'après les résultats, on peut constater qu'il y a un rapport entre les résistances aux antibiotiques et les contenus plasmidi-

diques chez les révertants prototrophes. Nous résumons cette relation en trois points :

- Le plasmide indigène, chez le vrai révertant et le pseudo-révertant résistant à une concentration normale en kanamycine, n'a pas subi de modification de taille ;

- Les pseudo-révertants montrant une résistance élevée à la kanamycine (1 500 µg/ml) renferment un plasmide de taille 137 ± 3 Md qui ne correspond pas au plasmide indigène de la souche d'origine ;

- Mais, en ce qui concerne les pseudo-révertants qui sont résistants à l'ampicilline, au triméthoprime et à la kanamycine (1500 µg/ml), ils possèdent en plus du plasmide (pM') observé ci-dessus, un plasmide (pAB) de taille 44 ± 2 Md.

Dans l'expérience consistant au transfert du plasmide (pAB), les transconjugants d'E. coli C600 Rif^r ayant acquis ce plasmide sont devenus résistants à l'ampicilline et au triméthoprime.

Il semble donc que ce plasmide conjugatif soit un morceau du plasmide "suicide" qui était bloqué sur le génome bactérien, ou plutôt sur le plasmide géant, car parmi les différentes expériences concernant l'estimation du poids moléculaire des plasmides, nous avons remarqué une seule fois que le plasmide géant des trois pseudo-révertants possédant les trois types de résistances, présentait une migration légèrement inférieure par rapport à celui qui existe chez les trois mutants auxotrophes correspondants, ce qui implique une certaine diminution de

taille pouvant être provoquée par une délétion, lorsque le plasmide (pAB) a retrouvé son autonomie chez les révertants. Malheureusement, on n'a pas pu reproduire ce résultat, car si l'on augmente le temps de migration des plasmides pour augmenter cette légère différence de migration, ces plasmides géants se fractionnent et deviennent invisibles.

De plus, la non-expression de deux transposons (Tn1 et Tn402) chez les mutants auxotrophes suggère que ce plasmide s'est intégré sur une région d'ADN réprimée et qui pourrait être le plasmide géant en faisant l'hypothèse que ce plasmide s'exprime seulement lorsque la bactérie est à l'état symbiotique.

En effet, une étude a confirmé que les gènes localisés sur un plasmide de R. leguminosarum ne s'expriment que dans le bactéroïde (49) ; ceci a été prouvé par des hybridations entre l'ADN plasmidique et l'ARN messager synthétisé d'une part par la bactérie libre et d'autre part par le bactéroïde endosymbiotique. L'expression des gènes du plasmide est faible quand le Rhizobium est à l'état libre. Par contre, cette expression est normale quand le Rhizobium est à l'état de bactéroïde.

En outre, ces données élucident l'impossibilité de sélectionner directement des clones ayant reçu les transposons Tn1 et Tn402 .

Il semble donc que l'apparition d'une partie du plasmide (pSP601) élimine partiellement le terme "suicide" utilisé par les auteurs (42 , 82), mais le devenir du transposon Tn1771 (Tc) chez R. meliloti est encore inconnu.

L'apparition du plasmide (pAB:44[±]2 Md) est indépendante de celle du plasmide (pM':137[±]3 Md) chez les pseudo-révertants prototrophes résistants à 1 500 µg/ml de kanamycine.

L'absence de transfert du plasmide (pM') chez E. coli C600 Rif^r montre que ce plasmide n'est pas conjugatif, ou ne se réplique pas chez cette bactérie. Ceci suggère que le plasmide (pM') provient du plasmide indigène de la souche sauvage ayant subi une augmentation importante (environ 53 Md) de poids moléculaire chez divers pseudo-révertants.

Ceci nous a amené à penser que le transposon Tn5 pouvait probablement être inséré sur le plasmide moyen et subirait par la suite une amplification, provoquant ainsi une augmentation de la taille du plasmide.

Cette hypothèse est vraisemblable, puisque ces révertants sont résistants à une concentration élevée en kanamycine. Nous pensons utiliser deux techniques pour prouver ultérieurement l'existence et l'amplification de ce transposon sur le plasmide moyen.

- L'exclusion du plasmide (pM') par traitement à la température ou à l'acridine orange pourrait rendre ces révertants sensibles à la kanamycine ;

- L'emploi d'enzymes de restriction spécifiques comme BamH I et Sal I (93) pour couper ce transposon en un point serait intéressant, afin de vérifier l'hypothèse précédente.

On obtiendrait ainsi plusieurs fragments : ceux correspondant aux fragments du plasmide de la souche de départ, et un fragment sous forme d'une bande intense dans le gel, dont le poids moléculaire serait celui du transposon Tn5 .

En principe, il y aurait 14 copies, si l'on fait l'estimation en divisant le supplément de taille (53 Md) observé au niveau du plasmide moyen par la taille du transposon Tn5 (3,8 Md).

Il semble donc que le retour à la prototrophie des mutants auxotrophes provoque l'amplification de cet élément transposable chez certains pseudo-révertants.

SCHÖFFL et PUHLER (77) ont amplifié le transposon Tn1771 porté par le plasmide pFS202 d'E. coli UR12644 en cultivant cette souche en présence de fortes concentrations en tétracycline (100-200 µg/ml) ; notre cas est différent, puisque l'augmentation de la taille du plasmide moyen est observée sans culture préalable des pseudo-révertants en présence de concentrations élevées en kanamycine. Donc il n'y a pas de relation entre retour à la prototrophie et Km^R (1 500 µg/ml).

Cependant, les mutants sélectionnés sur un milieu riche renfermant une concentration élevée de kanamycine n'ont montré aucune modification du plasmide moyen et ils ne sont pas redevenus prototrophes. Il est cependant possible que le transposon Tn5 ait été amplifié sur un autre endroit du génome bactérien.

Le fait que ces révertants soient restés efficaces implique que le transposon amplifié ne s'est pas greffé sur les gènes Fix ou que ces gènes ne sont pas situés sur le plasmide moyen de R. meliloti 444.

Par des expériences d'hybridations avec les gènes nif K, D, H de K. pneumoniae clonés sur le plasmide pSA30, PRAKASH et coll. (69) n'ont pas trouvé d'hybridation avec les plasmides moyens des souches de R. meliloti V 7 et L5-30, ce qui confirme nos résultats.

L'augmentation du taux de croissance de trois pseudo-révertants nous a fait penser que le plasmide géant est dérégulé : ainsi plusieurs gènes peuvent se mettre en route dont les gènes nif qui sont déjà localisés sur ce plasmide chez R. meliloti 41 (3), RCR2011, A145, S26 et CC2013 (74).

On pourrait obtenir alors des bactéries fixatrices libres d'azote en présence de faibles concentrations d'oxygène, et ceci pourrait expliquer pourquoi le poids sec des plantes inoculées par ces révertants est 2 ou 3 fois plus élevé que les souches d'origine.

Nous avons effectué des essais de fixation de l'azote pour ces révertants en vie non-symbiotique, en employant le R. cowpea 32H1 (une souche fixatrice libre d'azote) comme témoin. Malheureusement, les résultats sont négatifs pour la souche témoin et tous les révertants.

Donc, on ne peut rien conclure de ces derniers résultats car il s'agit d'un problème de technique.

Enfin, l'importance de la taille du plasmide géant, de l'ordre d'un cinquième de chromosome (environ 600 Md, en estimant la taille du chromosome autour de 3 000 Md) nous fait poser la question suivante :

Est-ce que tous les artéfacts, la reproductibilité des résultats, les microcolonies, les colonies translucides sont dus à la présence de ce plasmide ?

Tous ces artéfacts ont rendu la génétique de cette bactérie assez difficile par rapport aux autres bactéries comme K. pneumoniae, E. coli, etc...

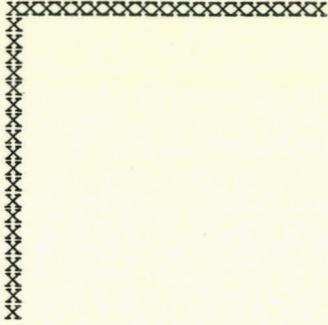
Est-ce que les nombreux gènes portés par le plasmide géant jouent un rôle dans l'ambiguïté des mutants auxotrophes ?

Est-ce que les gènes de biosynthèse de certains acides aminés sont en double ? : l'un sur le chromosome et l'autre sur ce plasmide, ce qui se traduit par le fait que certains mutants auxotrophes se développent faiblement en absence du substrat indispensable donnant ainsi des colonies translucides ?

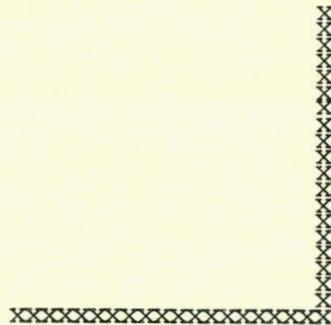
Est-ce que la faible expression de ce plasmide en vie végétative est responsable du phénomène des microcolonies ?

Des réponses ne peuvent être apportées à tous ces problèmes que lorsque les plasmides de différentes tailles observées chez R. meliloti seront extraits et étudiés en détail par les techniques de clonage, d'hybridation et de transferts génétiques.

En conclusion, divers mutants auxotrophes ont été obtenus à l'aide du transposon Tn5 ; son intégration sur le génome de R. meliloti ne se fait pas tout-à-fait au hasard ; certains gènes sont des "points chauds" ; des mutants Fix⁻ et des mutants affectés sur la synthèse d'exopolysaccharides peuvent être isolés grâce au même transposon. Des phénomènes intéressants ont été constatés chez les différents révertants prototrophes et il serait nécessaire de compléter et relier ces résultats afin de pouvoir élucider le mécanisme du plasmide "suicide", l'amplification du transposon Tn5 , le rôle du plasmide géant chez les différentes souches de R. meliloti.



BIBLIOGRAPHIE



- 1 - ALI H., C. NIEL and J.B. GUILLAUME (1981)
The pathways of ammonium assimilation in Rhizobium meliloti.
Arch. Microbiol., 129 : 391-394.

- 2 - BACHMAN B.J. and K.B. LOW (1980)
Linkage map of Escherichia coli K-12.
Microbiol. Rev., 44 : 1-56.

- 3 - BANFALVI Z., V. SAKANYAN, C. KONCZ, A. KISS, I. DUSHA and
A. KONDOROSI (1981)
Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high
molecular weight plasmid of R. meliloti.
Mol. Gen. Genet., 184 : 318-325.

- 4 - BECHET M. et J.B. GUILLAUME (1978)
Mise en évidence d'ADN extrachromosomique chez Rhizobium meliloti.
Can. J. Microbiol., 24 : 960-966.

- 5 - BERG D.E., J. DAVIES, B. ALLET and J.D. ROCHAIX (1975)
Transposition of R factor genes to bacteriophage λ .
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 72 : 3628-3632.

- 6 - BERG D.E. (1977)
Insertion and excision of the transposable kanamycin resistance
determinant Tn5.pp.205-212.
Dans : DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes.
Edited by BUKHARI A.I., J.A. SHAPIRO and S.L. ADHYA Cold Spring
Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New-York.

- 7 - BERG D.E., R. JORGENSEN and J. DAVIES (1978)
Transposable kanamycin-neomycin resistance determinants.
In : Microbiology (D. SCHLESSINGER, ed pp. 13-15 - WASH D.C. :
Amer. Soc. Micro., 1978).
- 8 - BERG D.E., C. EGNER, B.J. HIRSCHL, J. HOWARD, L. JOHNSRUD,
R.A. JORGENSEN and T.D. TLSTY (1980)
Insertion, excision, and inversion of Tn5.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 45 : 115-124.
- 9 - BERG D.E., A. WEISS and L. CROSSLAND (1980)
Polarity of Tn5 insertion mutations in Escherichia coli.
J. Bacteriol., 142 : 394-446.
- 10 - BERINGER J.E., A.W.B. JOHNSTON and B. WELLS (1977)
Isolation of conditional ineffective mutants of Rhizobium leguminosarum.
J. Gen. Microbiol., 98 : 339.
- 11 - BERINGER J.E., S.A. HOGGAN and A.W.B. JOHNSTON (1978)
Linkage mapping in Rhizobium leguminosarum by means of R.plasmid
mediated conjugation.
J. Gen. Microbiol., 104 : 201-208.
- 12 - BERINGER J.E., J.L. BEYNON, A.V. BUCHANAN-WOLLASTON and
A.W.B. JOHNSTON (1978)
Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to Rhizobium.
Nature, 276 : 633-634.

- 13 - BEYNON J.L., J.E. BERINGER and A.W.B. JOHNSTON (1980)
Plasmids and host-range in Rhizobium leguminosarum and
Rhizobium phaseoli.
J. Gen. Microbiol., 120 : 421-429.
- 14 - BOUCHER C., B. BERGERON, M.B. de BERTALMIO and J. DENARIE (1977)
Introduction of bacteriophage Mu into Pseudomonas solanacearum
and Rhizobium meliloti using the R factor RP4.
J. Gen. Microbiol., 98 : 253-263
- 15 - BREWIN N.J., J.E. BERINGER; A.V. BUCHANAN-WOLLASTON, A.W.B. JOHNSTON
and P.R. HIRSCH (1980)
Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in
Rhizobium leguminosarum.
J. Gen. Microbiol., 116 : 261-270.
- 16 - BREWIN N.J., J.E. BERINGER and A.W.B. JOHNSTON (1980)
Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two
strains of Rhizobium leguminosarum.
J. Gen. Microbiol., 120 : 413-420.
- 17 - BUKHARI A.I., E. LJUNQUIST, F. de BRUIJN and H. KHATOON (1967)
The mechanism of bacteriophage Mu integration.
pp. 249-261. Dans : DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes.
Edited by BUKHARI A.I., J.A. SHAPIRO and S.L. ADHYA Cold Spring
Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New-York.

- 18 - CALOS M.P. and J.H. MILLER (1980)
Transposable elements.
Cell, 20 : 579-595
- 19 - CASSE F., C. BOUCHER, J.S. JULLIOT, M. MICHEL and J. DENARIE (1979)
Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis.
J. Gen. Microbiol., 113 : 229-242.
- 20 - CHADWELL H., H.J. FRITZ, P. HABERMANN, R. KLAER, S. KÜHNS and P. STARLINGER (1979)
Studies with IS1 and IS4.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43 : 1187-1192.
- 21 - CLOWES R.C. (1972)
Molecular structure of bacterial plasmids.
Bacteriol. Rev., 36 : 261-405.
- 22 - COHEN S.N. (1976)
Transposable genetic elements and plasmid evolution.
Nature, 263 : 731-738.
- 23 - CORNELIS G., D. GHOSAL and H. SAEDLER (1978)
Tn951 : a new transposon carrying a lactose operon.
Mol. Gen. Genet., 160 : 215-224.

- 24 - COURTOIS B., J.P. HORNEZ, R. TAILLIEZ, J. COURTOIS et
J. C. DERIEUX (1981)
Méthode rapide de dosage des exopolysaccharides solubles produits
par Rhizobium meliloti.
C.R. Acad. Sci. (Paris) Sér. D, (sous presse).
- 25 - CURRIER T.C. and E.W. NESTER (1976)
Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular
weight from bacteria.
Anal. Biochem., 76 : 431-441.
- 26 - CUTTING J.A. and H.M. SCHULMAN (1977)
The biogenesis of leghemoglobin. The determinant in the Rhizobium
legume symbiosis for leghemoglobin specificity.
Biochim. Biophys. Acta, 229 : 58-62.
- 27 - DENARIE J. (1969)
Une mutation provoquant l'auxotrophie pour l'adénine et la perte
du pouvoir fixateur d'azote chez Rhizobium meliloti.
C.R. Acad. Sci. (Paris), 269 : 2464-2466.
- 28 - DENARIE J., G. TRUCHET and B. BERGERON (1976)
Effects of some mutations on symbiotic properties of Rhizobium.
Dans : Symbiotic nitrogen fixation in plants (D.S. NUTMAN , Editor ;
Cambridge University Press) : 3-24.

- 29 - DENNIS C.G., A.K. VIDAVER and R.V. KLUCAS (1979)
Plasmids, biological properties and efficacy of nitrogen fixation
in Rhizobium japonicum strains indigenous to alkaline soils.
J. Gen. Microbiol., 114 : 257-266.
- 30 - DILLWORTH M.J. (1966)
Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from
Clostridium pasteurianum.
Biochem. Biophys. Acta, 127 : 285-294.
- 31 - DIXON R.A. and J.R. POSTGATE (1971)
Transfer of nitrogen-fixation gene by conjugation in Klebsiella
pneumoniae.
Nature, 234 : 47-48.
- 32 - DIXON R.A. and J.R. POSTGATE (1972)
Genetic transfer of nitrogen-fixation from Klebsiella pneumoniae
to Escherichia coli.
Nature, 237 : 102-103.
- 33 - DUNICAN L.K. and F.C. CANNON (1971)
Genetic control of symbiotic properties in Rhizobium : evidence for
plasmid control.
Plant and soil, special volume : 73-79.

- 34 - DUNICAN L.K., F. O'GARA and A.B. TIERNEY (1976)
Plasmid control of effectiveness in Rhizobium : transfer of nitrogen-fixing genes on a plasmid from Rhizobium trifolii to Klebsiella aerogenes.
Dans : Symbiotic Nitrogen Fixation in plants (P.S. NUTMAN, Editor ; Cambridge University press) : 77-90.
- 35 - EGNER C. and D.E. BERG (1981)
Excision of transposon Tn5 is dependant on the inverted repeats but not on the transposase function of Tn5.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 78 : 459-463.
- 36 - GILL R.E., F. HEFFRON and S. FALKOW (1979)
Identification of the transposase and transposon-specific repressor encoded by Tn3.
Nature, 282 : 797-801.
- 37 - HEDGES R.W. and A.E. JACOB (1974)
Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons.
Molec. Gen. Genet., 132 : 31-40.
- 38 - HENNECKE H. (1981)
Recombinant plasmids carrying nitrogen fixation genes from Rhizobium japonicum.
Nature, 291 : 354-355.

- 39 - HERNALSTEENS J.P., F. VAN VLIET, M. DE BEUCKELEER, A. DEPICKER,
G. ENGLER, M. LEMMERS, M. HOLSTERS, M. VAN MONTAGU and J. SCHELL (1980)
The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vector system
for introducing foreign DNA in plant cells.
Nature, 287 : 654-656.
- 40 - HIGASHI S. (1967)
Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium
phaseoli* as mediated by an episomic factor.
J. Gen. Appl. Microbiol. 13 : 391-403.
- 41 - HOOYKAAS P.J.J., P.M. KLAPWIJK, M.P. NUTI, R.A. SCHILPEROORT and
A. RÖRSCH (1977)
Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent
agrobacteria and to *Rhizobium ex planta*.
J. Gen. Microbiol., 98 : 477-484.
- 42 - HOOYKAAS P.J.J., A.A.N. VAN BRUSSEL, H. DEN DULK-RAS, G.M.S. VAN
SLOGTEREN and R.A. SCHILPEROORT (1981)
Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial
species and *Agrobacterium tumefaciens*.
Nature, 291 : 351-353.
- 43 - JOBANPUTRA R.S. and N. DATTA (1974)
Trimethoprim R factors in enterobacteria from clinical specimens.
J. Med. Microbiol., 7 : 169.

- 44 - JULLIOT J.S. and BOISTARD P. (1979)
Use of RP4-prime plasmids constructed in vitro to promote a polarized transfer of the chromosome in Escherichia coli and Rhizobium meliloti.
Molec. gen. Genet., 173 : 289-298.
- 45 - JOHNSON P.H. and L.I. GROSSMAN (1977)
Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separation of conformational isomers of double and single-stranded DNAs.
Biochemistry, 16 : 4217-4224.
- 46 - KLECKNER N. (1977)
Translocatable elements in procaryotes.
Cell, 11 : 11-23.
- 47 - KLECKNER N., J. ROTH and D. BOTSTEIN (1977)
Genetic engineering in vivo using translocatable drug-resistance elements (New methods in bacterial genetics).
J. Mol. Biol., 166, 125-159.
- 48 - KONDOROSI A., G.B. KISS, T. FORRAI, E. VINCZE and BANFALVI (1977)
Circular linkage map of Rhizobium meliloti chromosome.
Nature, 268 : 525-527.
- 49 - KROL A.J.M., J.G.J. HONTELEZ, R.C. VAN DEN BOS and A. VAN KAMMEN (1980)
Expression of large plasmids in the endosymbiotic form of Rhizobium leguminosarum.
Nucleic Acids Research, 8 : 4337-4347.

- 50 - KOWALSKI M. (1971)
Transduction in Rhizobium meliloti.
Plant and soil, Special volume, 63-66.
- 51 - KOWALSKI M. and J. DENARIE (1972)
Transduction d'un gène contrôlant l'expression de la fixation de l'azote chez Rhizobium meliloti.
C.R. Acad. Sci. (Paris). Sér. D, 275 : 141-144.
- 52 - LEDEBOER A.M. (1978)
Large plasmids in Rhobiaceae.
Ph D , thesis, Leiden University, Leiden, The Netherlands.
- 53 - LEDERBERG J. and E.M. LEDERBERG (1952)
Replica plating and indirect selection of bacterial mutants.
J. Bacteriol., 63 : 399-406.
- 54 - LJUNGGREN H. and G. FAHRAEUS (1959)
Effect of Rhizobium polysaccharide on the formation of polygalacturonase in lucerne and clover.
Nature, 184 : 1578-1579.
- 55 - LUDWIG R.A. and E.R. SIGNER (1977)
Glutamine synthetase and control of nitrogen fixation in Rhizobium.
Nature, 267 : 245-248.

- 62 - MILLER J.H., M.P. CALOS, D. GALAS; M.H.D.E. BÜCHEL and B. MÜLLER-HILL (1980)
Genetic analysis of transpositions in the lac region of Escherichia coli.
J. Mol. Biol., 144 : 1-18.
- 63 - NASH H.A., K. MIZUUCHI, R.A. WEISBERG, Y. KIRUCHI and M. GELLERT (1967)
Integrative recombination of bacteriophage lambda. The biochemical approach to DNA insertions.
pp. 249-261. Dans : DNA Insertion Elements, plasmids and Episomes.
Edited by BUKHARI A.I., J.A. SHAPIRO and S.L. ADHYA. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New-York.
- 64 - NUTI M.P., A.A. LEPIDI, R.K. PRAKASH, R.A. SCHILPEROORT and F.C. CANNON (1979)
Evidence for nitrogen fixation nif genes on indigenous Rhizobium plasmids.
Nature, 282 : 533-535.
- 65 - PAGE W.J. (1978)
Transformation of Azotobacter vinelandii strain unable to fix nitrogen with Rhizobium spp. DNA.
Canad. J. Microbiol., 24 : 282-288.
- 66 - PARKER R.C., R.M. WASTON and J. VINOGRAD (1977)
Mapping of closed circular DNAs by cleavage with restriction endonucleases and calibration by agarose gel electrophoresis.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 74 : 851-855.

- 56 - MALAMY M.H. (1966)
Cold Spring Harbor Symp., Quant Biol., 31 : 189-201.
- 57 - MAIER R.J. and W.J. BRILL (1976)
Ineffective and non-nodulating mutant strains of Rhizobium japonicum.
J. Bacteriol., 127 : 763.
- 58 - MAIER R.J., P.E. BISHOP and W.J. BRILL (1978)
Transfer from Rhizobium japonicum to Azotobacter vinelandii of
genes required for nodulation.
J. Bacteriol., 134 : 1199-1201.
- 59 - MEADE H.M. and E.R. SIGNER (1977)
Genetic mapping of Rhizobium meliloti.
Proc. Natl. Acad. Sci., 74 : 2076-2078.
- 60 - MEYERS J.A., D. SANCHEZ, L.P. ELWELL and S. FALKOW (1976)
Simple agarose gel electrophoretic method for the identification
and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid.
J. Bacteriol., 127 : 1529-1537.
- 61 - MEYER R., G. BOCH and J.A. SHAPIRO (1979)
Transposition of DNA inserted into deletions of the Tn5 kanamycin
resistance element.
Mol. Gen. Genet., 171 : 7-13.

67 - PINET X. (1980)

Mise en évidence de plasmides chez Rhizobium meliloti par électrophorèse en gel d'agarose.

Diplôme d'Etudes Approfondies. Université des Sciences et Techniques de Lille.

68 - PRAKASH R.K., P.J.J. HOOYKAAS, A.M. LEDEBOER, J.W. KLJNE, R.A. SCHILPEROORT, M.P. NUTI, A.A. LEPIDI, F. CASSE, C. BOUCHER, J.S. JULLIOT and J. DENARIE (1980)

Detection, isolation, and characterization of large plasmids in Rhizobium-Nitrogen Fixation, Volume II : 193-163.

69 - PRAKASH R.K., R.A. SCHILPEROORT and M.P. NUTI (1981)

Large plasmids of last-growing Rhizobia : homology studies and location of structural nitrogen fixation nif genes.

J. Bacteriol., 145 : 1129-1136.

70 - PTASHNE K., S.N. COHEN (1975)

Occurrence of insertion sequence (IS) region on plasmid deoxyribonucleic acid as direct and inverted nucleotide sequence duplications.

J. Bacteriol., 122 : 776-781.

71 - RASIKA M.H. and A.I. BUKHARI (1981)

A mechanism of DNA transposition.

Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 78 : 1090-1094.

- 72 - RICHARD E.S., W.C. RUSSELL, and A. PETER (1978)
A Rhizobium mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion.
Nature, 271 : 240-242.
- 73 - ROSENBERG C., F. CASSE-DELBART, P. BOISTARD, G. TRUCHET and J. DENARIE (1981)
Dans "Current perspectives in Nitrogen Fixation". (A.H. Gibson W.E. Newton, eds.), pp 137-141. Griffin Press, Netley, S. Australia.
- 74 - ROSENBERG C., P. BOISTARD, J. DENARIE and F. CASSE-DELBART (1981)
Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in Rhizobium meliloti.
Mol. Gen. Genet., 184 : 326-333.
- 75 - SCHALLER H. (1978)
The intergenic region and the origins for filamentous phage DNA replication.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43 : 401-408.
- 76 - SCHERRER A. and J. DENARIE (1971)
Symbiotic properties of some auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti and of their prototrophic revertants.
Plant and soil, Special volume : 39-45.

- 77 - SCHÖFFL F. and A. PÜHLER (1979)

Intramolecular amplification of the tetracycline resistance determinant of transposon Tn1771 in Escherichia coli.

Genet. Res., Camb., 33 : 253-260.

- 78 - SCHÖLLHORN R. and R.H. BURRIS (1967)

Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation.

Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 58 : 213-216.

- 79 - SCHWINGHAMER E.A. (1968)

Loss of effectiveness and infectivity in mutants of Rhizobium resistant to metabolic inhibitors.

Can. J. Microbiol., 14 : 355-367.

- 80 - SHAPIRO J.A. (1969)

Mutations caused by the insertion of genetic material into the galactose operon of Escherichia coli.

J. Molec. Biol., 40 : 93-105.

- 81 - SHAW K.J. and C.M. BERG (1979)

Escherichia coli K-12 auxotrophs induced by insertion of the transposable element Tn5.

Genetics, 92 : 741-747.

- 82 - SIMON R. (1979)

Construction and use of "suicide-plasmids".

pp. 58-67. Dans EMBO Course, plasmids, A course in advanced techniques, Course manual, Institut für Mikrobiologie und Biochemie Universität Erlangen-Nürnberg, Germany.

- 83 - SKOTNICKI M.L. and B.G. ROLFE (1978)

Transfer of nitrogen fixation genes from a bacterium with the characteristics of both Rhizobium and Agrobacterium.

J. Bacteriol., 133 : 518-526.

- 84 - STANISICH V.A., P.M. BENNETT and M.H. RICHMOND (1977)

Characterization of a translocatable unit encoding resistance to mercuric ions that occurs on a non conjugative plasmid in Pseudomonas aeruginosa.

J. Bacteriol., 129 : 1227-1233.

- 85 - STANLEY J. and L.K. DUNICAN (1979)

Intergeneric mobilization of Rhizobium nif genes to Agrobacterium and Klebsiella.

Molec. Gen. Genet., 174 : 211-220.

- 86 - STARLINGER D. (1980)

IS elements and transposons.

Plasmid, 3 : 241-259.

- 87 - TAKEYA T., H. NOMIYAMA, J. MIYOSHI, K. SHIMADA and Y. TAKAGI (1979)

DNA sequence of the integration sites and inverted repeated structure of transposon Tn3.

Nucleic Acid Res., 6 : 1831-1841.

- 88 - TAYLOR A.L. (1963)
Detection of specific sequences among DNA fragments.
J. Mol. Biol. 98 : 503.
- 89 - TAYLOR A.L. (1963)
Bacteriophage induced mutations in E. coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 50 : 1043-1051.
- 90 - UMEZAWA H., H. YAMAMOTO, M. YAGISAWA, S. KONDO, T. TAKEUCHI (1973)
Kanamycin phosphotransferase I : mechanism of cross resistance between kanamycin and lividomycin.
J. Antibiotics, 7 : 407-410.
- 91 - VAN VLIET F., B. SILVA, M. VAN MONTAGU and J. SCHELL (1978)
Transfer of RP4::Mu plasmids to Agrobacterium tumefaciens.
Plasmid, 1 : 446-455.
- 92 - WALTON D.A. and B.E.B. MOSELEY (1981)
Induced mutagenesis in Rhizobium trifolii.
J. Gen. Microbiol., 124 : 191-195.
- 93 - YAMAMOTO T. and T. YOKOTA (1980)
Construction of a physical map of a kanamycin (Km) transposon, Tn5, and a comparison to another Km transposon, Tn903.
Molec. gen. Genet. 178 : 77-83.

94 - ZURKOWSKI W., M. HOFFMAN and Z. LORKIEWICZ (1973)

Effect of acriflavine and sodium-dodecyl sulphate on infectiveness of Rhizobium trifolii.

Acta Microbiol. polon. Ser. A, 5 : 55-60.

95 - ZURKOWSKI W. and Z. LORKIEWICZ (1976)

Plasmid deoxyribonucleic acid in Rhizobium trifolii.

J. Bacteriol., 128 : 481-484.

96 - ZURKOWSKI W. (1981)

Conjugational transfer of the nodulation-conferring plasmid pWZ2 in Rhizobium trifolii.

Mol. Gen. Genet., 181 : 522-524.

