

50376  
1983  
261

N° d'ordre : 1061

50376  
1983  
261

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE 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

Ahmed LAYACHI

### ETUDE DE LA MOBILITE ET DU CHIMIOTACTISME DANS LA COMPETITIVITE CHEZ *Rhizobium meliloti*



Soutenu le 11 Juillet 1983 devant la Commission d'Examen

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

A toi et à  
ma communauté

Ames!

## RESUME

-----

Le rôle du chimiotactisme et de la mobilité dans la symbiose Rhizobium légumineuse a été mis en évidence par l'étude de mutants non mobiles et non chimiotactiques de la souche de Rhizobium meliloti Ve 26. Les études ont été facilitées par la mise au point d'une "mini-serre" pour la culture des plantes qui permet de contrôler les divers paramètres expérimentaux.

Dans une première partie, nous avons montré, par migration sur milieu semi-solide et "en capillaire", que les exsudats racinaires de jeunes plantules de luzerne ont une action chimiotactique positive sur la souche Ve 26 qui n'est pas observée sur les mutants; de plus les exsudats de graines en germination ont une action inhibitrice de croissance à la fois sur la souche Ve 26 et sur les mutants isolés.

Dans la seconde partie, nous avons étudié la compétitivité de la souche Ve 26 sauvage (mobile et chimiotactique) et des mutants non mobiles et non chimiotactiques, en milieu liquide et en substrat solide (perlite et sol). Nous avons montré qu'en milieu liquide, la mobilité et le chimiotactisme ont peu d'influence sur la compétitivité de Rhizobium pour la formation de nodules sur les racines de légumineuses. Par contre, en substrat solide, ces deux propriétés augmentent considérablement la compétitivité des bactéries qui les possèdent.

A toi et à  
ma communauté

Ames

## REMERCIEMENTS

-----

Ce travail a été effectué au laboratoire de Microbiologie de l'U.S.T. LILLE, sous la Direction de Messieurs les Professeurs J.B. GUILLAUME et R. TAILLIEZ, à qui nous exprimons notre profond respect et nos vifs remerciements pour leurs précieux conseils.

Nous tenons à remercier également, Monsieur OCHIN pour son aide et le soin qu'il a porté à la correction de cet ouvrage.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à Messieurs les Professeurs J.C. DERIEUX et J. KREMBEL pour avoir accepté de juger notre travail et de participer à notre jury.

## INTRODUCTION

L'aptitude intrinsèque d'une souche de Rhizobium à survivre dans un sol donné, à s'y multiplier, à coloniser la rhizosphère et à entrer en symbiose avec la légumineuse - hôte est en relation avec un certain nombre de propriétés caractérisant la souche bactérienne considéré.

La mobilité de Rhizobium et son comportement chimio-tactique constituerait un *avantage* dans la compétition pour coloniser la rhizosphère et infecter les racines.

Nous avons essayé de montrer cet avantage par des études de compétitivité en milieu liquide et en sol.

TABLE DES MATIERES

-----

I MATERIEL

A - MATERIEL VEGETAL ET BACTERIEN

- 1 - Souches bactériennes
- 2 - Légumineuses

B - MILIEUX DE CULTURE ET DE CONSERVATION

- 1 - Milieux complexes
  - a - milieu de Wright
  - b - milieu tryptone Yeast
  - c - milieu Rhizobium complexe
- 2 - Milieux synthétiques
  - a - milieu M9A
  - b - milieu R H B1
  - c - Milieu de NICOL et THORNTON (NT)

C - SOLUTIONS TAMPONS

- 1 - tampon de non prolifération
- 2 - tampon de mutagénèse
- 3 - tampon de lavage pour le chimiotactisme

D - SOLUTION DE COLORATION

E - SOLUTION DE DESINFECTIION ET DE STERILISATION

- 1 - stérilisation des graines
- 2 - Stérilisation du sol
- 3 - désinfection de la "mini-serre"
- 4 - Solutions d'antibiotiques

II METHODES

A - METHODE DE COLORATION DES FLAGELLES



- 1 - En microscopie photonique
- 2 - En microscopie électronique

B - METHODE D'ETUDE DE LA MOBILITE

- 1 - En milieu liquide
- 2 - En milieu semi-solide

C - METHODE D'ETUDE DU CHIMIOTACTISME

- 1 - En milieu semi-solide
- 2 - Par migration en capillaire

D - MODE D'ISOLEMENT DES MUTANTS NON CHIMIOTACTIQUES  
ET NON MOBILES

- 1 - Mutagénèse
- 2 - Mode de sélection par enrichissement
  - a) Isolement de mutants non mobiles
  - b) Isolement de mutants non chimiotactiques

E - TEST DE NODULATION ET TECHNIQUE DE MISE EN CULTURE  
DES LEGUMINEUSES

- 1 - Stérilisation des graines
- 2 - Contrôle de l'asepsie et de la germination des graines
- 3 - Culture des plantules
  - a) mise en culture aseptique in vitro
  - b) simulation des conditions naturelles :  
essais en " mini-serre "
- 4 - Préparation d'exsudats racinaires
- 5 - Isolement des bactéries infectueuses des nodules.

RESULTATS ET COMMENTAIRES

I ISOLEMENT ET ETUDE DE MUTANTS DE RHIZOBIUM MELILOTI. Ve 26

A - MUTAGENÈSE

- 1 - Action des rayons ultra-violetts (J.V.)
- 2 - Action de la N - nitro N - méthyl N - nitro  
soguanidine ( NTG )

B - Isolement des mutants

1 - Enrichissement de la population bactérienne soumise au mutagène, en mutants non mobiles et non chimiotactiques.

2 - Sélection des mutants

- a) Mode de sélection de mutants non mobiles (mob<sup>-</sup> ; fla<sup>-</sup>)

Remarque : Distinction entre migration et multiplication bactérienne

- b) Mode de sélection de mutants non chimiotactiques ( che<sup>-</sup> )

Remarque : Formation des anneaux chimiotactiques.

C - Etude comparative des mutants isolés

1 - Etude sur milieu semi-solide

- a) Développement et migration sur divers milieux
- b) Effet de la concentration en agar du milieu sur le diamètre de migration.
- c) Influence du temps et de la température sur la migration
- d) Influence des exsudats racinaires sur la migration

2 - Etude de la migration en capillaire

- a) Influence de la température sur la " migration en capillaire "
- b) Accumulation des bactéries dans un capillaire en fonction du temps
- c) Influence des exsudats racinaires sur la migration

3 - Etude microscopique de l'appareil flagellaire

- a - microscopie photonique
- b - microscopie électronique

II ETUDE DE L'INFECTIVITE DES MUTANTS ISOLES EN MILIEU LIQUIDE

- 1 - Test de nodulation
- 2 - Coefficient d'infectivité et son évolution en fonction du temps

III ETUDE DE L'INFECTIVITE ET DE LA COMPETITIVITE DES MUTANTS ISOLES EN SUBSTRAT SOLIDE.

- 1 - Mise au point de la culture en "mini-serre" sur substrat solide.
- 2 - Test de nodulation
- 3 - Coefficient d'infectivité
- 4 - Etude de la compétitivité
  - a - entre souche V<sub>e</sub> 26 mobile et son mutant non chimiotactique (ché)
  - b - entre souche V<sub>e</sub> 26 mobile et son mutant non mobile (flā)

IV ETUDE DE COMPETITIVITE EN SOL STERILISE

- la préparation du substrat
- la préparation de l'inoculum
- le test de compétitivité

INTRODUCTION

-----

ET

--

GENERALITES

-----

La base du fonctionnement des êtres vivants est liée à leur capacité à recevoir les informations de l'environnement, de les traiter (computation) et d'y répondre de manière appropriée.

Du moment que les bactéries font presque de même, on peut aisément supposer qu'il y a un lien évolutif entre le comportement bactérien et celui des êtres supérieurs. Selon ORDAL (85) le chimiotactisme bactérien est un système sensoriel primitif. C'est une réponse biologique universelle d'après KOSHLAND (63).

Les organismes réagissent vis à vis de substances nutritives, d'éléments toxiques ou de composés hormonaux. Le chimiotactisme est un phénomène biologique qui pourrait intervenir dans des fonctions telles que la nutrition, la sexualité (66), la prédation, le parasitisme (45) et la symbiose (106).

Le rôle du chimiotactisme et de la mobilité bactérienne dans l'écologie du sol a été signalé par CHET (33) La richesse du sol en éléments nutritifs au niveau de la rhizosphère favorise un pullulement de microorganismes.

D'après BROUGHTON (29) et CHET (33), cette accumulation résulte à la fois d'une prolifération et d'une migration. Cette accumulation est préférentielle : la plante exercerait une action sélective sur les microorganismes de la rhizosphère (37).

Un exemple typique de cette sélection préférentielle est l'action des plantes de la famille des légumineuses sur les bactéries de la famille des Rhizobiacées.

L'association légumineuse Rhizobium constitue un phénomène complexe, qui par des processus biologiques et biochimiques, permet la fixation de l'azote libre de l'air les légumineuses en symbiose avec Rhizobium permettent le recyclage continu de l'azote par son passage de la forme inorganique à la forme organique.

Tout le monde s'accorde à dire que la symbiose Rhizobium légumineuse est bénéfique pour les cultures céréalières. Seuls les agronomes savent qu'il est très difficile de profiter au maximum de cet avantage, surtout quand le sol considéré ne contient pas une population de Rhizobium indigène. Pour le succès d'une culture de légumineuses il faut que la souche spécifique soit présente à une certaine concentration dans le sol. L'une des premières difficultés est de coloniser un sol par une souche de Rhizobium. La souche choisie doit surmonter tous les facteurs de compétition du sol.

Les recherches en rapport avec les "engrais bactériens" comme la bactérisation des sols et des semences par des microorganismes fixateurs d'azote. Tel Rhizobium, accordent actuellement un rôle important à la mobilité et au chimiotactisme : ces phénomènes constituent un avantage dans la compétition des souches dans le sol par rapport aux bactéries non mobiles et non chimiotactiques.

ROVIRA (93) signale que Rhizobium est en plus grand nombre que les autres microorganismes dans la rhizosphère des légumineuses. Cela peut être considéré comme la première manifestation visible de l'association symbiotique Rhizobium - légumineuse. Elle est due en partie à une migration des bactéries vers les racines de la légumineuse. La mobilité et le chimiotactisme favoriseraient cette association en permettant une meilleure colonisation de la rhizosphère de la légumineuse par la souche de Rhizobium.

## GENERALITE SUR LA MOBILITE ET LE CHIMIO-TACTISME

### Morphologie et structure des flagelles

Toute cellule vivante est capable de mouvements. L'intensité de ces mouvements varie avec l'âge, le type et la différenciation de la cellule.

Certains microorganismes peuvent ramper ou glisser sur le substrat ; d'autres peuvent nager sans contact avec le substrat (au sein d'un liquide). Les premiers se déplacent grâce à un flux protoplasmique avec ou sans émission de pseudopodes, les autres, grâce à des organes externes (cils ou flagelles) ou par des ondulations du corps.

EHRENBERG, en 1836, pensait que les flagelles fonctionnaient comme des muscles permettant le déplacement des bactéries (57) PIJ-  
PER assurait en 1946 que les flagelles ne sont que des excroissances de la membrane cytoplasmique n'ayant aucun rôle dans la locomotion (57). Actuellement il est admis que les flagelles sont partiellement ou totalement responsables du mouvement chez les bactéries flagellées (57).

Les bactéries flagellées ont un ou plusieurs flagelles qui peuvent être en positions polaires, latérales ou situés tout autour de la bactérie.

Les flagelles sont généralement constitués de 3 zones morphologiques distinctes :

- Un long filament qui peut atteindre 25  $\mu$ m
- Une crosse ou crochet 80 à 90 nm et de diamètre légèrement supérieur à celui du filament.

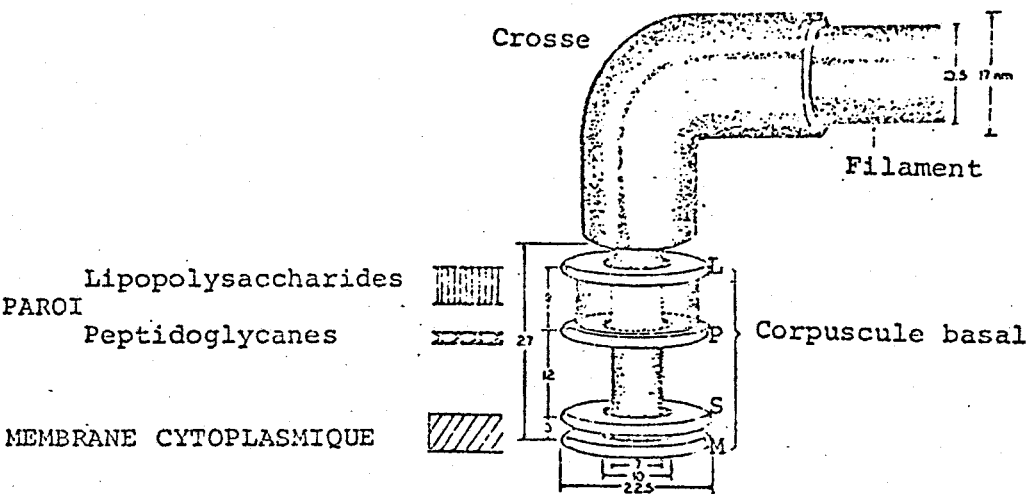


FIGURE 1 Schéma d'insertion du flagelle  
chez les bactéries Gram(-). (108)

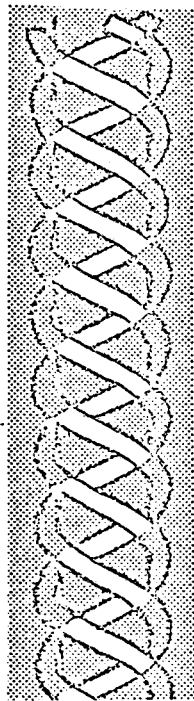


FIGURE 2 Model d'un filament flagellaire  
de type complexe .

Illustration de l'aspect d'un fragment de flagelle après coloration négative .Le contraste de la région centrale montre les trois brins enroulés en hélice .

D'après SCHMITT et al. (94)

BUS  
LILLE



- Une structure basale qui est le point d'insertion du flagelle dans l'enveloppe bactérienne (67).

L'étude en microscopie électronique des flagelles montre qu'ils sont semblables chez la plupart des bactéries (97). Le détail de la structure du flagelle est obtenu par la technique de coloration négative ou par l'étude de diffraction des rayons X (69, 99).

Le filament flagellaire est formé de trois unités fibrillaires constituées par un enchainement de molécules globulaires : la flagelline. Les filaments de flagelline peuvent être au nombre de trois enroulés (69) autour d'un axe creux (98) ou au nombre de cinq alignés parallèlement (69).  
Fig 2.

Ces études en microscopie électronique à haute résolution ont confirmé les résultats biochimiques. Le filament flagellaire est formé d'un seul type de protéines de poids moléculaire compris entre 30 000 et 40 000 (55). MARUYAMA (73) rapporte lui un poids moléculaire entre 30 000 et 60 000.

Le crochet a une structure différente de celle du flagelle. De 90 nm de long, il a un diamètre légèrement plus grand que celui du filament. La protéine constitutive est plus stable que celle du filament aux conditions de pH et de température des expériences de dépolymérisation des protéines flagellaires (55). SILVERMAN (97) suppose que le crochet, vu sa rigidité permet la transmission du mouvement au filament.

La structure basale apparait la plus complexe partie du flagelle. Elle est constituée d'une série de quatre anneaux chez les bactéries à gram négatif(97). Deux anneaux externes (désignés par L et P) servent à l'ancrage de la structure dans la couche externe de la paroi bactérienne et deux internes (M et S) attachés à la membrane cytoplasmique (fig : 1). Les anneaux internes joueraient un rôle dans le mouvement (99).

#### Le mouvement bactérien

La bactérie pour se déplacer imprime à son flagelle

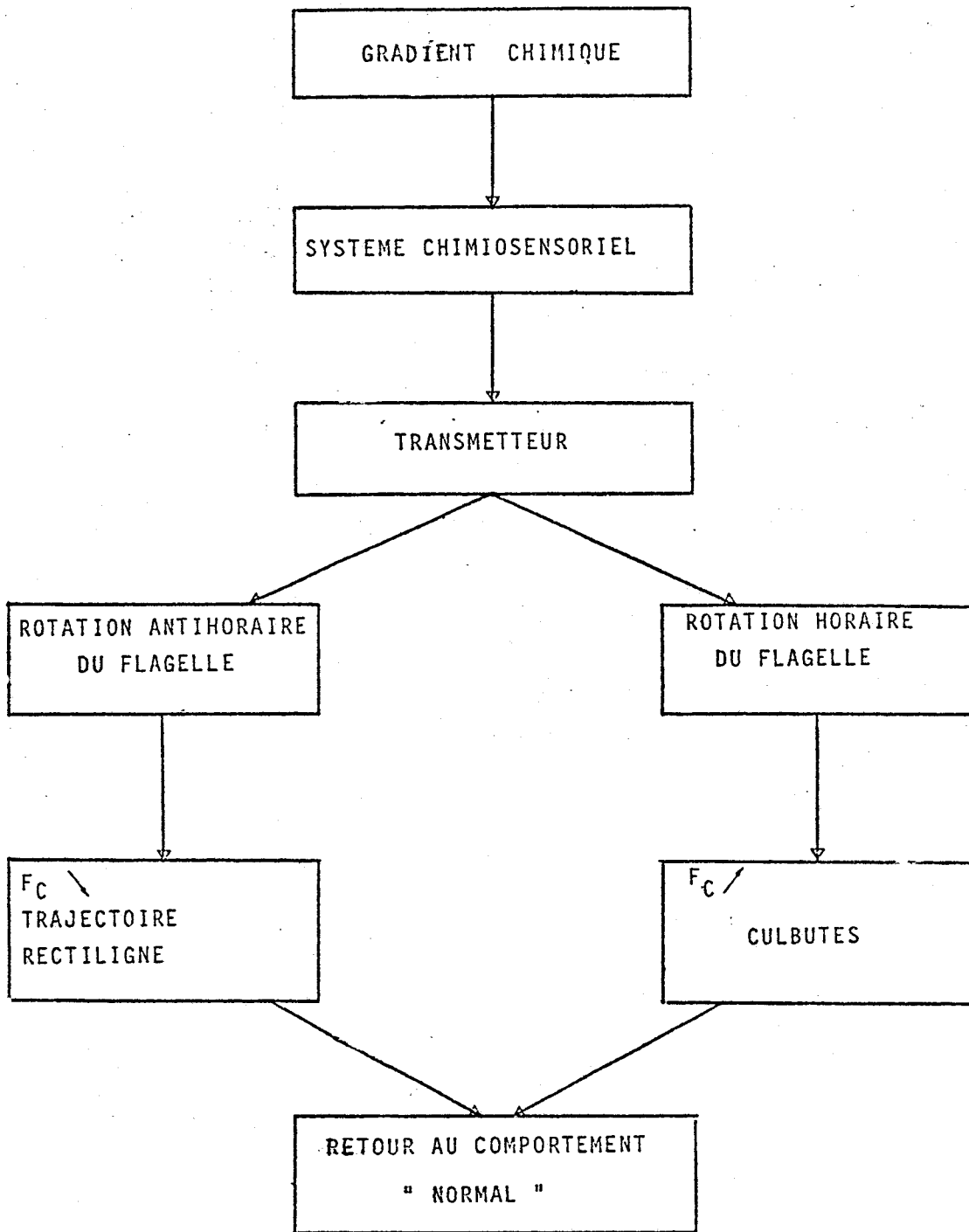


FIGURE 3 SCHEMA DU FONCTIONNEMENT CHIMIO-TACTIQUE  
 $F_c$  ; fréquence des culbutes  
 D'après BURG(30).

BIS  
LILLE

Un mouvement de rotation (17). Le flagelle en forme d'hélice rigide en tournant dans le sens de rotation des aiguilles d'une montre (= sens horaire) ou dans le sens contraire (= sens anti-horaire)\* déplace la bactérie soit vers l'avant soit vers l'arrière.

Le flagelle ne contient pas de système enzymatique qui permettrait la transformation de l'énergie chimique en énergie mécanique. La structure basale est à l'origine du mouvement : l'anneau interne (M) au niveau de la membrane cytoplasmique relativement fluide servirait de "rotor", le mécanisme qui entraîne ce mouvement est peu connu (56) ; l'anneau (P) situé dans la couche de peptidoglycane relativement rigide servirait de "stator" (97) fig. 1.

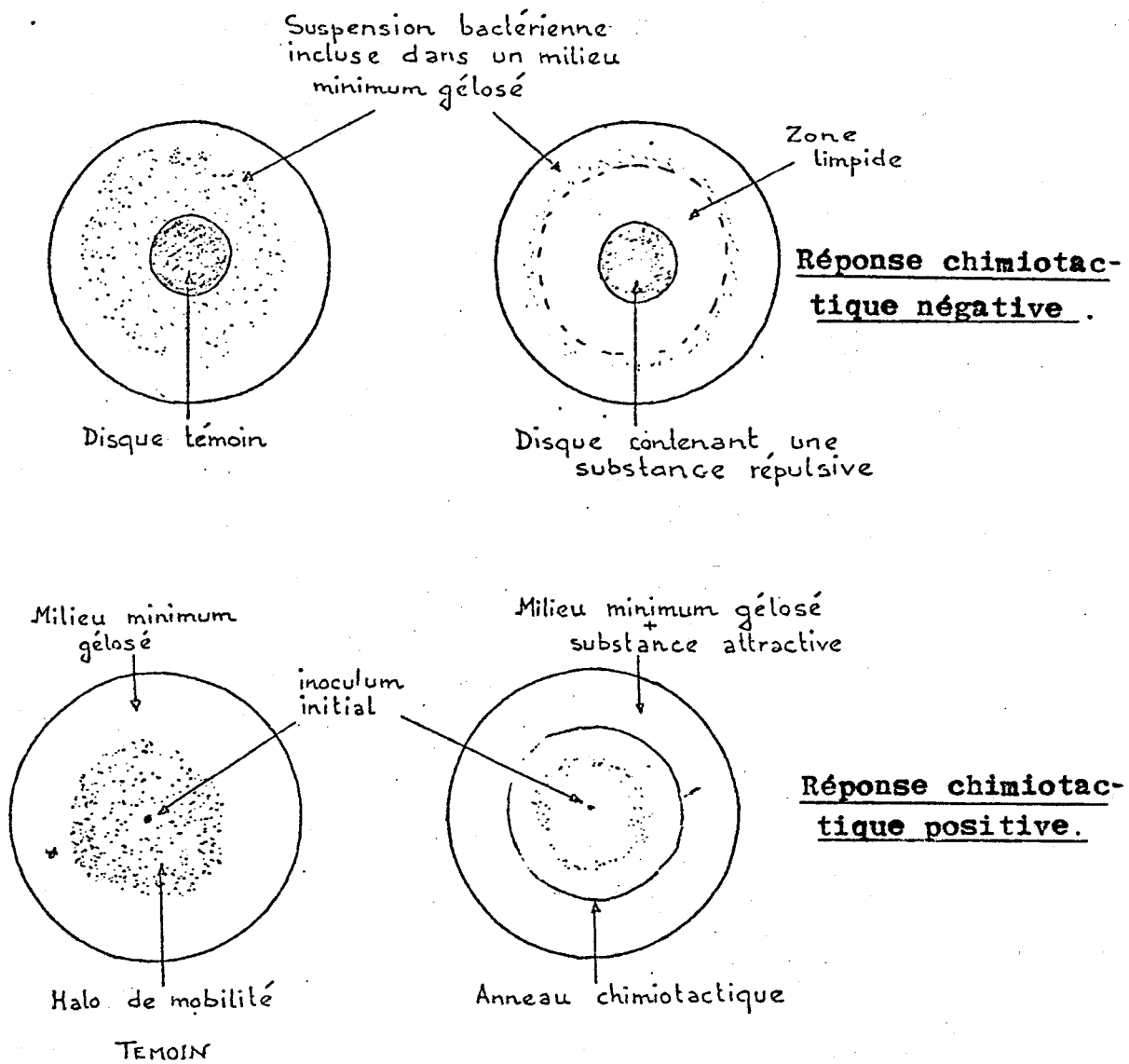
En l'absence d'un effecteur chimiotactique, les bactéries mobiles se déplacent selon une succession de trajectoires rectilignes et de basculement. SYLVERMAN et SIMON (97) ont montré que le sens de rotation des flagelles est différent dans les deux phases (de nage calme et de basculement). Une bactérie monoflagellée piégée par son flagelle sur une lame de microscope (à l'aide d'anticorps antiflagelline) tourne autour d'un axe passant par le point d'attache du flagelle. La bactérie tourne dans le sens horaire puis de temps en temps inverse cette rotation. Les rotations dans le sens horaire, de longue durée, correspondent à la phase de nage rectiligne ; les rotations de courte durée dans le sens anti-horaire correspondent aux basculements (ou culbutes) (fig. 3).

#### La fonction chimiotactique

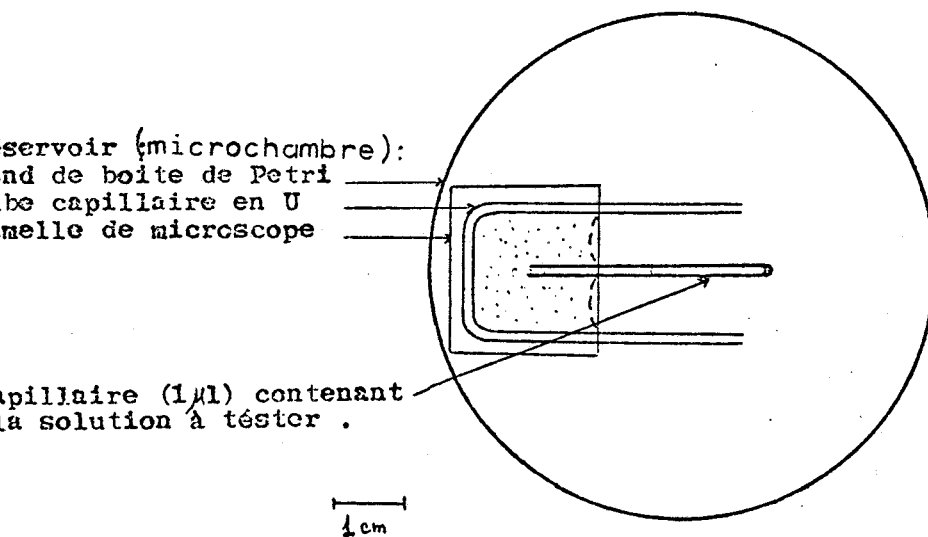
Le chimiotactisme, mouvement d'approche ou de fuite à l'encontre de produits chimiques, a été découvert il y a un siècle par ENGELMAN et PFEFFER. Les travaux menés jusqu'en 1966 sont assez subjectifs. ADLER (1) a mis au point deux techniques principales permettant la définition des conditions de mobilité et de chimiotactisme, ainsi que l'évaluation quantitative de la réponse chimiotactique (fig 4 et 5).

La première est une méthode dite en "boîte de Petri". La migration se déroule en milieu semi-solide. Pour la visualisation d'une réponse chimiotactique positive (attraction), un inoculum bactérien est déposé au centre d'une boîte de Petri contenant un milieu minimum de croissance faiblement gélifié et

\*(Il est admis par convention que l'observateur détermine le sens de rotation du flagelle lorsque la bactérie s'éloigne de lui.)



**FIGURE 4 : Principe de mise en évidence d'une réponse chimiotactique.**



BUS  
LILLE

**Figure 5** Dispositif expérimental utilisé pour la mise en évidence de la réponse chimiotactique par la technique de migration en capillaire d'ADLER(3)

la substance attractive choisie. En consommant cette substance, les bactéries créent elles même un gradient. Il se forme un anneau de densification bactérienne autour du point d'inoculation (Fig 4).

La deuxième technique est appelée " méthode de migration en capillaire ". Elle consiste en un dénombrement des bactéries ayant migré d'une microchambre dans un capillaire contenant la substance à tester. Elle permet donc une évaluation quantitative de la réponse chimiotactique (fig 5).

Grâce à ces deux techniques complémentaires, ADLER (1,3,4,6) a établi l'essentiel des connaissances actuelles sur la " perception " bactérienne.

La méthode en milieu semi-solide sert à l'étude systématique de substances variées, permet une première estimation du domaine de concentrations appropriées, et l'isolement de diverses classes de mutants.

La technique de migration en capillaire est utilisée pour la définition des conditions physicochimiques du chimiotactisme, l'évaluation quantitative de la réponse chimiotactique, la détermination des concentrations optimales et liminaires, l'étude du comportement bactérien en présence de deux substances actives.

Ces deux techniques sont très utilisées dans l'analyse du comportement chimiotactique à cause de leur facilité et leur souplesse d'utilisation (16,27,48,57,63).

La mobilité est due à la rotation des flagelles, la chimiotaxie est réalisée par une régulation du sens de rotation des flagelles. La réponse chimiotactique en tant que " réponse à une sensation " comprend une détection, une analyse et une réponse.

Des récepteurs situés à la périphérie de la bactérie reçoivent des " signaux ". Ceux-ci sont alors traités et l'information est transmise ensuite aux flagelles, provoquant la

PROTEINE	GENES OPERON	MUTATION ET PHENOTYPE	FONCTION
Du filament	HAG	Mob <sup>-</sup> Flagelles linéaires	SYNTHESE ET
Du crochet	Fla	Fla <sup>-</sup> non flagellé	FUNCTIONNEMENT
De la structure basale	Fla	Mob <sup>-</sup> flagelle paralysé Fla <sup>-</sup> non flagellé	DÉS FLAGELLES
situées dans la membrane interne	MOB	mob <sup>-</sup> flagelle non fonctionnelle (rotation incontrôlée)	FUNCTIONNEMENT
Libres dans le cytoplasme	Che	ché culbutes incessantes culbutes rares	
situées dans la membrane interne	ché		CONTROLE DE LA FREQUENCE DES CULBUTES
chimiorécepteurs	Tra Tsr Tig Tap	ché culbutes rares	

} Kocha

TABLEAU I - RESUME SUCCINCT DES GENES DU CHIMIOFACTISME ET DE LA MOBILITE, LEURS PRODUITS ET LES PHENOTYPES DES MUTATIONS CORRESPONDANTES CHEZ B. SUBTILIS D'APRES SILVERMAN (97).



maintien, l'augmentation ou la diminution des fréquences d'inversion du sens de leur rotation.

Du point de vue moléculaire, le mécanisme chimio-tactique comprend :

+ Des chimiorécepteurs qui détectent la présence et la concentration des effecteurs chimiotactiques. Il existe des chimiorécepteurs spécifiques (2,5 , 52). et des chimiorécepteurs qui peuvent détecter plusieurs substances différentes (77,104).

Ces chimiorécepteurs sont des protéines membranaires ou des protéines libres dans l'espace périplasmique.

+ Des protéines méthylables de la membrane interne, qui, lors d'une stimulation, sont contactées par le complexe effecteur-chimiorécepteur (59 , 52 , 100). Ces protéines entraînent deux actions :

- Une action rapide (excitation) qui a pour effet de modifier immédiatement le comportement des flagelles ; le signal qui entraîne cette modification est mal connu (  $Ca^{++}$ , potentiel de membrane, complexes protéiques ? ) (10,70,82,83).

- Une action lente (adaptation) qui fait contre-poids à l'excitation et entraîne un retour du comportement du flagelle à l'état qui existait avant la stimulation (9,100). Le support moléculaire de l'adaptation est la méthylation des protéines membranaires (9, 63, 85).

+ Des protéines qui réalisent l'intégration de l'information provenant des récepteurs et qui contrôlent le sens de rotation des flagelles.

+ Des protéines nécessaires à la synthèse et la rotation des flagelles (97,72).

Le tableau 1 indique quelques gènes producteurs de ces diverses protéines (97,90,101).

.../...

S. typhimurim.

E. coli.

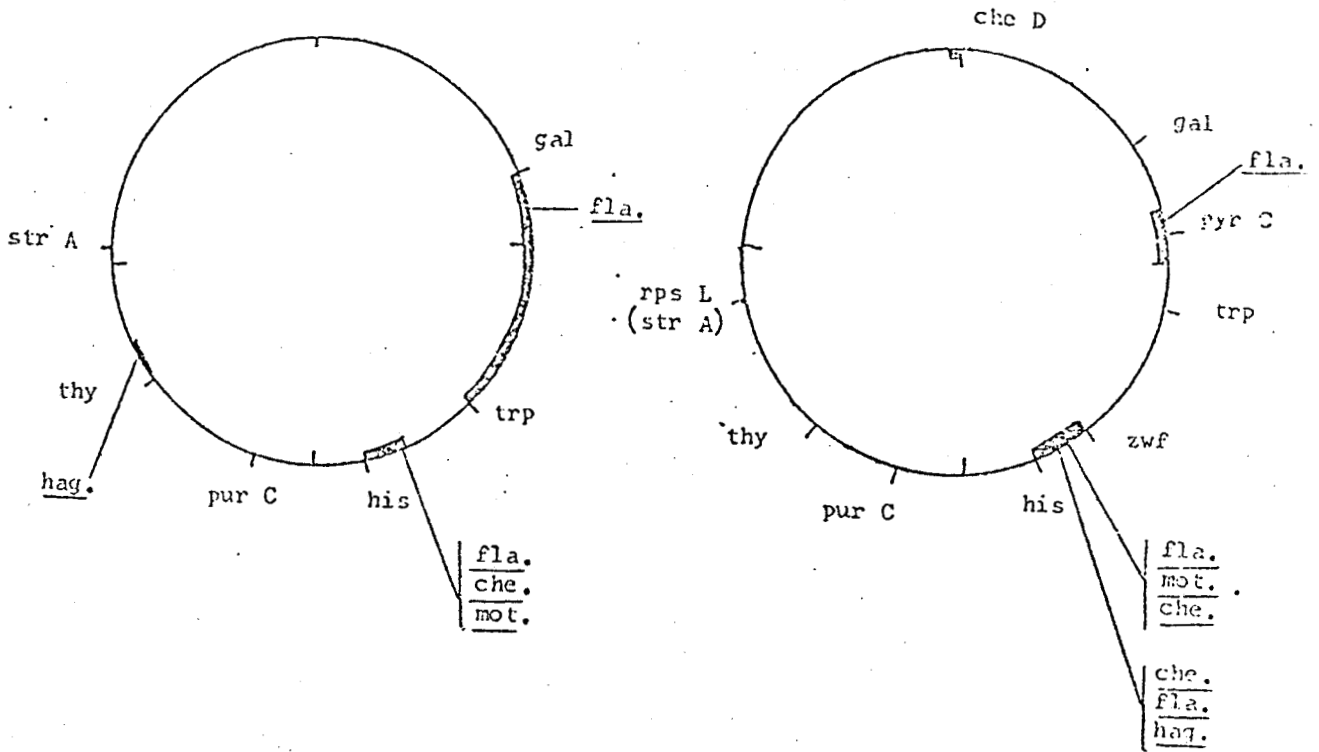


FIGURE 6 : Localisation sur les cartes génétiques de *S. typhimurium* et *E. coli* des différents gènes correspondant à la mobilité (mob), la synthèse des flagelles (fla), au chimiotactisme (che) et à l'antigène antflagellaire (hag) .

D'après SILVERMAN et SIMON (97).

BHS  
LITE



La figure 6 indique la localisation sur les cartes génétiques de *S. typhimurium* et *E. coli* des gènes correspondant à la mobilité et au chimiotactisme (16,97).

L'étude de ces cartes génétiques montre que les gènes correspondants au chimiotactisme, mobilité et synthèse des flagelles sont regroupés. On note aussi une certaine homologie dans la distribution des gènes codants pour les flagelles sur le génome des deux bactéries.

#### Le comportement chimiotactique

En présence d'un effecteur chimiotactique la fréquence des culbutes varie. Quand la bactérie détecte une augmentation de concentration d'un attractif - ou une diminution de concentration d'un répulsif - elle supprime temporairement ses basculements de sorte qu'elle continue à se déplacer dans une direction qui lui est favorable. Contrairement, dans une diminution de concentration d'un attractif - ou une augmentation de concentration d'un répulsif - les bactéries " culbutent " plus souvent (18,71,73).

La caractéristique principale du chimiotactisme est cette régulation de la fréquence des culbutes. Le déplacement, qui en apparence est fortuit, est en réalité orienté en présence d'un effecteur : Les trajets rectilignes sont prolongés lorsque les bactéries évoluent vers un environnement favorable, et sont raccourcis dans le cas contraire.

Les bactéries mobiles en contrôlant ainsi leurs déplacements, peuvent améliorer leur environnement. Elles sont en effet capables de nager vers des composés, tels des nutriments favorables à leur survie et de fuir ceux qui peuvent leur être nocifs. Elles contrôlent donc les conditions de leur environnement selon un processus analogue au comportement " essai-erreur " des êtres supérieurs (62).

LAUFFENBURGER (66) dans une étude dynamique des populations bactériennes a montré que le chimiotactisme et la mobilité jouent un rôle déterminant dans la survie des bacté-

ries pendant la phase stationnaire d'une culture invitro en milieu liquide.

Le rôle écologique du chimiotactisme bactérien a été signalé par CHET (33). Dans leur habitat naturel les microorganismes interagissent aussi bien avec l'environnement abiotique qu'entre eux. Les " informations chimiques " jouent un rôle important dans ce cadre.

Dans le sol il est généralement accepté, qu'au niveau de la rhizosphère des plantes il y a pullulement de microorganismes. Le principal facteur de cette prolifération est une stimulation par les exsudats racinaires. ROVIRA (92) a montré que la richesse de la rhizosphère en composés organiques résulte à la fois de produits d'excrétion et de produits résultant de l'éclatement et la destruction des cellules végétales. La rhizosphère est donc d'une composition complexe : Elle contient des sucres, des acides aminés, des vitamines, des hormones (93) ; (30).

Dans la rhizosphère l'optimum de croissance d'un genre bactérien donné dépend du type de plante considérée (12) (14). La richesse de la plante en éléments nutritifs constitue un pôle attractif pour les microorganismes. Selon DATE (37) il semble que la plante exerce une action sélective dans cette action.

ROVIRA (91) limite la rhizosphère entre 10 à 20 mm au delà du système racinaire de la plante et signale chez les légumineuses un optimum de croissance pour les bactéries de la famille des rhizobiacées (92).

Cette accumulation préférentielle de Rhizobium au niveau de la racine des légumineuses s'explique aisément quand on sait qu'ils sont les deux partenaires d'une association symbiotique. Cette symbiose permet la fixation de l'azote libre de l'air que ni la légumineuse, ni Rhizobium ne peuvent réaliser indépendamment.

Selon CHET (33) et BROUGHTON (29) le nombre de Rhizobium au niveau de la racine d'une légumineuse ne peut s'expliquer par le seul fait de la prolifération. Il résulterait

.../...

aussi de la migration de Rhizobium vers les racines.

Cette accumulation préférentielle des Rhizobia au niveau des racines des légumineuses constitue une première manifestation visible de la symbiose Rhizobium-légumineuse.

Depuis longtemps une spécificité d'hôte pour la formation des nodosités (infectivité) et la fixation de l'azote gazeux (efficacité) a été mise en évidence. Une systématique du genre Rhizobium fondée sur les groupes d'inoculation croisée a été établie. Cette classification selon les critères de spécificité pourrait être remise en question par la découverte chez Rhizobium du DNA plasmidique contrôlant la spécificité (13, 58) et par le fait que les groupes d'inoculation croisée assimilés à des espèces ne s'excluent pas mutuellement (23).

Il existe de nombreuses preuves de la contribution de la plante à la spécificité (24, 82) mais aussi de la contribution de la bactérie (82, 95, 68, 96).

Les étapes conduisant à la formation de nodosités fonctionnelles sont au nombre de huit (29). L'essentiel des travaux sur la spécificité porte sur les étapes antérieures à la formation du cordon d'infection, sur la phase d'adhésion de la bactérie au poil racinaire (39, 103).

Le mécanisme de base est en cours d'étude. Plusieurs hypothèses ont été avancées :

- Les bactéries à la surface des légumineuses pourraient se lier spécifiquement à des pôles d'attachement constitués par des lectines (24).

- Les bactéries produiraient des substances qui hydrolysent spécifiquement les cellules des poils racinaires permettant la pénétration des bactéries (68 ; 78).

- La légumineuse produirait au niveau de la rhizos-

phère un effecteur chimiotactique qui conduit à une accumulation spécifique de Rhizobium à la surface des racines (37).

Cette dernière hypothèse est rarement retenue pour la spécificité d'hôte. L'effecteur chimiotactique est surtout considéré dans une étape dite " présymbiotique " qui est la phase d'accumulation des Rhizobium au niveau des racines (37) ; (50) ; (81).

A ce stade de l'infection les Rhizobium mobiles et chimiotactiques seraient plus aptes à rencontrer un site d'infection au niveau de la racine que d'autres non mobiles. C'est-à-dire plus compétitifs (66) (45).

La mobilité et le chimiotactisme jouent un rôle important dans la colonisation du sol. bien que leur rôle dans l'infection soit peu évident, pour NAPOLI (80) ce rôle est nul, plusieurs chercheurs s'accordent à dire que la mobilité et le chimiotactisme confèrent un avantage non négligeable au Rhizobium en compétition avec des souches non mobiles et non chimiotactiques (7,36,43,46,76,80).

Selon AMES (8) les variants non mobiles ou peu mobiles ont une moins bonne aptitude à la nodulation. Ne pouvant manifester leur propriété chimiotactique, ils sont de ce fait moins compétitifs dans le sol.

Cette propriété peut être d'un grand intérêt économique quand on veut établir artificiellement dans un sol une souche particulière de Rhizobium.

Selon FRED (cité par PETERSON(86)) avant l'isolement de Rhizobium à partir des nodules par BEIJERINCK en 1888, la bactérisation des champs se faisait par un " transfert de sol " de champs ayant servi à la culture de légumineuses. La première production industrielle d'inoculum et les premiers essais d'inoculation du sol date de 1895.

La bactérisation des sols utilisée par les agronomes permet dans certains cas d'augmenter la production végétale en introduisant dans le sol une souche plus efficiente que la souche indigène ; dans d'autres cas la bactérisation permet de cultiver une légumineuse dans un sol dépourvu de Rhizobium compatible. Jusqu'à maintenant lors de

L'élaboration des inoculats commerciaux, l'intérêt était porté sur les qualités d'infectivité et d'efficacité des souches choisies de Rhizobium. Il apparaît maintenant que la mobilité est aussi un facteur limitant, et qu'un inoculum serait bien plus efficace et bien plus rentable si la souche choisie est chimiotactique.

Afin d'essayer de montrer ce rôle, une étude de compétitivité en sol, entre bactéries chimiotactiques et mobiles et bactéries non mobiles doit être menée.

Dans l'état actuel de nos connaissances les divers essais réalisés dans ce but l'ont été in vitro en milieu liquide ou solide avec le dépôt d'inoculat au pied de plantes.

Nous nous proposons l'isolement de mutants de Rhizobium affectés sur la mobilité et le chimiotactisme et l'étude de leur capacité à noduler en présence de la souche mère Ve 26 mobile et chimiotactique.

Afin de montrer le rôle éventuel de la mobilité et du chimiotactisme les études de compétitivité sont réalisées en milieu liquide et sur substrat solide.

Les études sur substrats solides - grains de perlite, puis sol - sont réalisés dans une "mini-serre" que nous avons mise au point pour cette étude et qui impose aux bactéries un déplacement pour atteindre les racines.

## MATERIEL ET METHODE

-----

## MATERIELS ET METHODES

### I MATERIEL

#### A - MATERIEL VEGETAL ET BACTERIEN

##### 1 - souche bactérienne

La majorité des expériences ont été faites sur Rhizobium meliloti, souche Ve 26 isolée par OJ ATUN et reçue du laboratoire de recherche sur les symbiontes des racines (INRA, centre de Montpellier)

Nous avons également utilisé les souches de Rhizobium suivantes : R. japonicum J5 ; R. phaseoli P15 ; R. leguminosarum L 25 ; R. tripolii T 15.

##### 2 - légumineuses

Pour les expériences d'infectivité et de compétition nous avons utilisé des graines de Luzerne, Medicago sativa variété Magali.

Nous avons également utilisé les légumineuses suivantes : soja, haricot, pois, trèfle.

#### B - MILIEUX DE CULTURE ET DE CONSERVATION

##### 1 - Milieux complexes

###### a - Milieux de WRIGHT (W) - (109)

###### - composition

$K_2 HPO_4$	0,5 g
$Mg SO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
$NaCl$	0,2 g
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,1 g
$CaCO_3$	0,1 g
Mannitol	10 g
Extrait de levure fraîche	100 ml
$H_2O$ distillée qsp	1 l

La stérilisation se fait par autoclavage à 120° C, 20 mn, le pH est de 7

L'extrait de levure fraîche est obtenu par autoclavage à 120° C pendant 20 mn, de 100 g de levure de boulangerie dans 1 l d'eau distillée. La suspension obtenue est filtrée à chaud sur papier filtre jusqu'à obtention d'un filtrat jaune limpide (qui est l'extrait de levure fraîche)

- Utilisation

Ce milieu gélosé à 12 g par litre, est utilisé pour les isollements et la conservation des souches de Rhizobium en boîte de Petri à 4° C pendant six semaines. Il peut aussi être utilisé en " gélose inclinée " pour une conservation de plusieurs mois.

b - Milieu tryptone Yeast ( TY )

- composition

Bactotryptone	5 g
Extrait de levure	3 g
* Ca Cl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	8,88 g
H <sub>2</sub> O distillée qsp	1 l

Le pH est de 7,2. La stérilisation se fait par autoclavage à 120° C pendant 20 mn.

\* Le Ca Cl<sub>2</sub> est autoclavé séparément sous forme d'une solution à 8,88 g p. 100 ;

- Utilisation

Nous avons réalisé dans ce milieu les subcultures de Rhizobium. Leur conservation est possible pendant 3 semaines à 4° C.

Les cultures de Rhizobium dans du TY, glycérolées à 20 % peuvent se conserver à - 20° C pendant plusieurs années.

.../...



Gélosé à 3 g / l ( Agar Difco ) et à différentes dilutions, ce milieu nous a servi pour des études de mobilité et de chimiotactisme.

c - Milieu Rhizobium complexe (RC)

- composition

$K_2 HPO_4$	1 g
$Mg SO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
Extrait de levure	1 g
$H_2O$ distillée qsp	1 l

Le pH entre 7,2 et 7,5. Une source de carbone ( fructose ) est rajoutée stérilement, après autoclavage à 120° C pendant 20 mn.

- Utilisation

Ce milieu modifié par DELATTRE (38) a été conçu par LAIRD (65) pour la culture de Rhizobium. Nous l'avons utilisé, gélosé à 12 g / l pour les dénombrements de population de Rhizobium pour vérifier la stérilité des graines de Luzerne et l'obtention de semis.

Gélosé à 3 g / l (Agar Difco) nous l'avons utilisé dans certaines expériences de sélections et d'étude de mobilité.

2 - Milieus synthétiques

a - Milieu M9 A - UCKER (195)

Composition

$KH_2 PO_4$	3 g
$N_a HPO_4 \cdot 12H_2O$	5,8 g
$NH_4 Cl$	1 g
$Hg SO_4$	0,12 g
$H_2O$ distillée qsp	1 l

.../...

Le pH est ajusté à 7,2. La stérilisation à l'autoclave (120° C , 20 mn), avant utilisation on rajoute stérilement de la biotine à 3 g / l et une source de carbone (fructose) à 2 g / l.

- Utilisation

Ce milieu a servi exclusivement à la culture de Rhizobium meliloti Ve 26 en vue de la mise en évidence et l'étude du chimiotactisme.

b - Milieu RHB 1

Composition

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
H <sub>2</sub> O distillée q.s.p.	1 l

Après autoclavage ( 120° C , 20 mn)

Avant utilisation on ajoute selon le cas :

- du fructose à 10 g / l , de la biotine à 0,5 10<sup>-5</sup> g / l et la thiamine à 10<sup>-5</sup> g / l

- des hydrolysats de protéines.

- des exsudats racinaires.

- Utilisation

Gélosé à 3 g / l (Agar Difco) nous l'avons utilisé pour des tests de chimiotactisme et de mobilité.

c - Milieu NT de NICOL et THORNTON (81)

- composition

$K_2HPO_4$	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
NaCl	0,1 g
$Ca_3(PO_4)_2$	2 g
$FePO_4$	1 g
$FeCl_3$	0,01 g
Eau distillée Q.S.P.	1 l

Milieu à pH7, stérilisé par autoclavage à 105° C pendant 30 mn.

- Utilisation

Nous l'avons utilisé pour la culture de plantules de luzerne en milieu liquide ou en substrat solide.

C - Solutions tampons

1 - Tampon de lavage pour le chimiotactisme

" Chem Wash " (C.W.) - ADLER (3)

C'est un tampon phosphate  $10^{-2}$  Molaire à pH = 7 ,  
additionné d'acide ethylène - diamine tetraacétique  
(E.D.T.A.) à  $10^{-4}$  ( concentration finale).

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

Le tampon CW est utilisé à la réalisation de suspension bactériennes pour des tests de migration en capillaire.

Gélosé à 3 ‰ et fructosé à 2 ‰ sert à des tests de migration en boîte de Petri.

### 2 - Tampon de mutagénèse tris / maléique pH = 6,6

Ce tampon est constitué par un mélange de 9 ml d'une solution molaire d'hydroxyméthylaminoéthane ( tris ) et de 5 ml d'acide maléique M.

Ce tampon est préparé juste avant utilisation. Il est stérilisé par passage surfiltre SARTORIUS 0,22  $\mu$ m

Nous avons utilisé ce tampon pour la dissolution de l'agent mutagène et aussi pour laver la suspension bactérienne (avant et après action de la NTG (N - méthyl N - nitro N - nitrosoguanidine)).

### 3 - Tampon de non prolifération T.N.P.

Le T.N.P. est une solution dans l'eau distillée de  $K_2 HPO_4$  à 1 g/l et  $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$  à 0,2 g / l .

Le tampon - stérilisé à l'autoclave (120° C , 20 mn ) sert à laver les suspensions bactériennes des milieux de cultures ainsi qu'aux diverses dilutions en vue de dénombrer les population de Rhizobium.

D - Solution de coloration

1 - L'acide phosphotungstique en solution dans l'eau distillée à 0,5 g P. 100, au pH 7 est utilisé pour la coloration négative en microscopie électronique.

2 - Pour la microscopie photonique (KODAKA, (60))

Solution 1 : mordant

A 10 ml d'une solution d'ammoniaque à 5 % sont rajoutés 2 g d'acide tannique et 10 ml d'une solution d'alum potassique saturée.

Solution 2 : colorant

Solution saturée de crystal violet dans l'éthanol.

La solution de coloration est préparée en mélangeant mordant et colorant dans le rapport 10 : 1; se conserve sans précaution particulière (à l'ambiante et à la lumière)

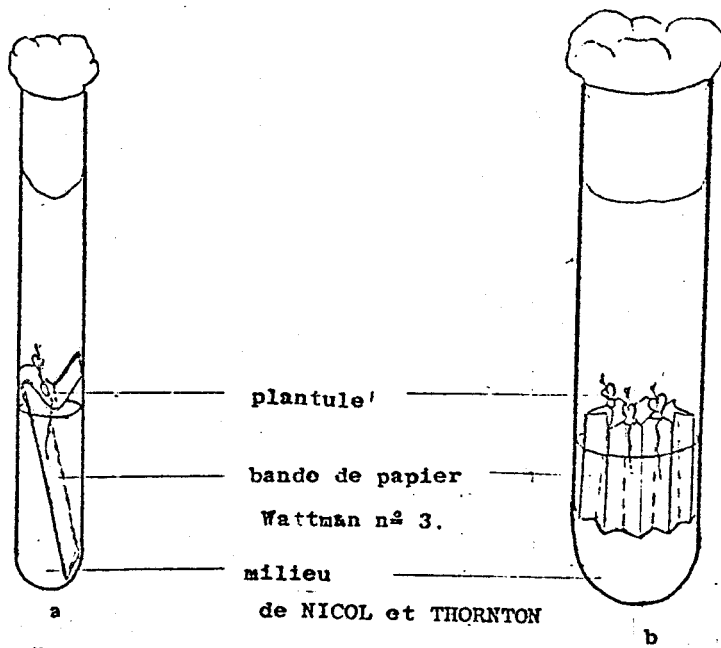
E - Solution de stérilisation et de désinfection

1 - Solution de bichlorure de Mercure à 2,5 p. 100 dans l'eau distillée avec une goutte de Teepol comme " mouillant " pour les graines de Luzerne, trèfle, soja.

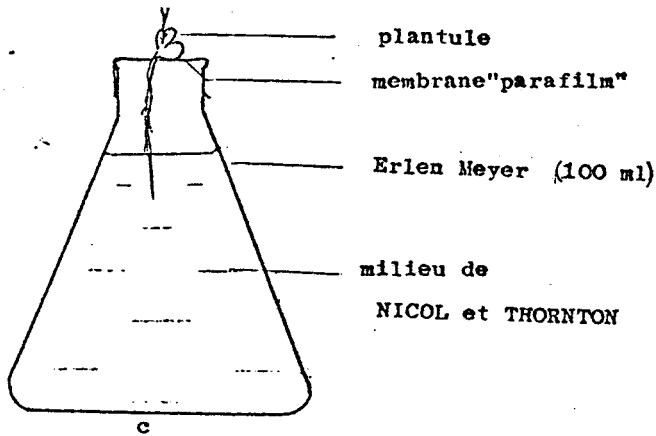
2 - Solution d'hypochlorite de calcium à 10 % pour la stérilisation des graines de pois, d'haricot. Dans ce cas les graines sont dégraissées pendant quelques secondes dans un bain de Mercryl Laucrylé.

3 - Solution  $\beta$  propiolactone à 0,25 % dans l'eau distillée stérile pour l'asepsie d'échantillon de sol.

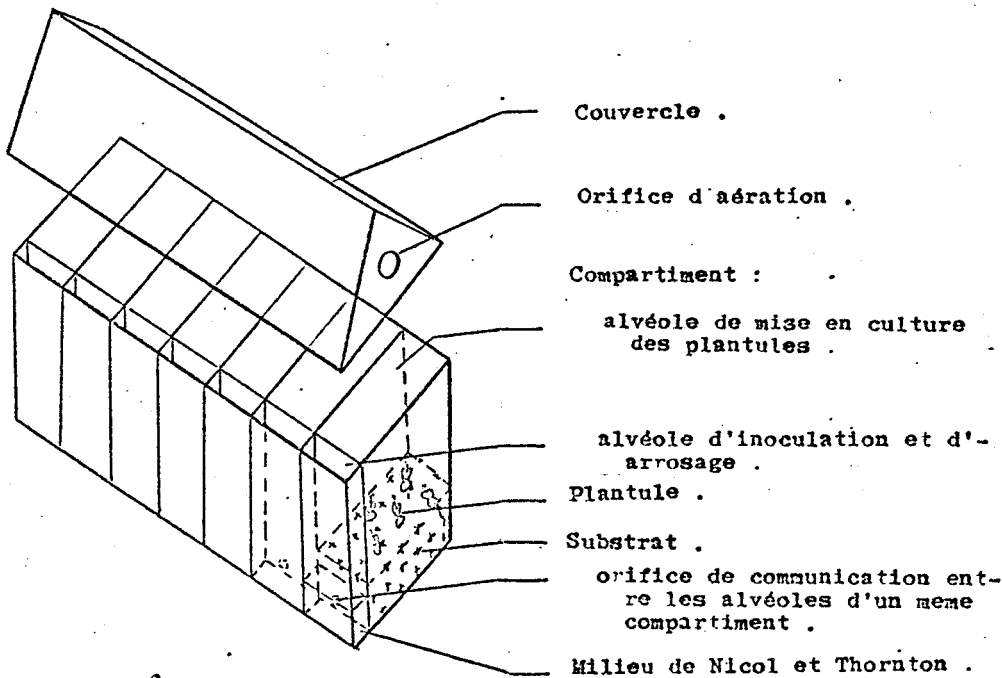
4 - Solution de " Mucapur " à 1 % dans l'eau distillée portée à 70° C pour la " mini-serre "



plantule  
 bande de papier  
 Wattman n° 3.  
 milieu  
 de NICOL et THORNTON



plantule  
 membrane "parafilm"  
 Erlen Meyer (100 ml)  
 milieu de  
 NICOL et THORNTON



Couvercle .  
 Orifice d'aération .  
 Compartiment :  
 alvéole de mise en culture  
 des plantules .  
 alvéole d'inoculation et d'-  
 arrosage .  
 Plantule .  
 Substrat .  
 orifice de communication ent-  
 re les alvéoles d'un meme  
 compartiment .  
 Milieu de Nicol et Thornton .

Echelle : 6cm.

d Schéma de la "mini-serre"



FIGURES 7 (a, b, c, d) : Matériel expérimental pour la culture in vitro des légumineuses .

5 - Solution d'antibiotique tetracycline à  $5 \mu\text{g} / \text{ml}$  ;  
Kanamycine à  $50 \mu\text{g} / \text{ml}$  et Ampicilline  $75 \mu\text{g} / \text{ml}$ .

#### F - Matériel pour culture de légumineuse

1 - Des tubes 20 x 200 mm contenant 16 ml de milieu NT et une bande de papier Watman n° 3 de 1 cm x 10 cm pliée comme indiqué ( fig. 7a ) comme support permettant le maintien de la graine hors de l'eau.

2 - Des tubes 40 x 200 mm contenant 50 ml de NT et une bande de papier Watman n° 3 pliée comme indiqué ( figure 7b ) sert de support au graine.

3 - Une " mini-serre " réalisée en plexiglas 50 x 20 x 12 cm comprend 7 alvéoles égales divisées chacune en 2 compartiments de taille inégale comme indiqué figure 7d par une cloison comportant un orifice permettant la circulation du milieu et des bactéries.

Pour la " mini-serre " nous avons utilisé comme support pour les plantules des billes de verre de 2 mm, Perlite 0,2 à 2 mm vermiculite 2 à 4 mm et un mélange 2/5 : 2/5 : 1/5 : tourbe + sable + argile.

Les tubes avec support et milieu, cotonés, sont passés à l'autoclave à  $130^{\circ} \text{C}$  pendant 30 mn à 2 reprises ( on homogénéise les substrats entre les autoclavages )

La " mini-serre " est désinfectée par un bain de Mucapur d'une heure puis exposée pendant 30 mn aux rayons UV (une lampe de 15 W) pour stérilisation.

## II Méthodes

### A - Méthode de coloration

## 1 - Coloration négative

C'est une technique de coloration pour les observations en microscopie électronique. Sur une grille porte objet membrée au Parlodion à 1 % dans l'acétate d'isoamyle on dépose successivement une goutte de KCL 0,1 M et une goutte de suspension bactérienne. L'excès de liquide est éliminé à l'aide d'un papier filtre. La coloration négative est obtenue par addition d'une goutte de phosphotungstate 0,5 % au pH 7. Après un temps de contact d'une minute, on essore la grille sur un papier filtre et on l'observe après dessiccation complète (en laissant une heure à l'ambiante et à l'abri de la poussière).

## 2 - Coloration pour microscopie photonique

Parmi les diverses techniques essayées, nous avons adopté celle de KODAKA (60) un faible inoculum prélevé à l'ose, d'une colonie, est déposé dans une goutte d'eau bidistillée sur une lame de microscope. Sans essayer d'homogénéiser la suspension ni d'étaler la goutte de liquide on laisse la lame à la température ambiante jusqu'à dessiccation complète. 3 gouttes de colorant sont déposées et laissées sur la lame pendant 5 mn. La solution de coloration est lavée à grande eau. On laisse secher à l'air après avoir essuyer le dos de la lame des traces de colorant.

L'observation est effectuée au fort grossissement, à l'immersion.

## B - Méthode d'étude de la mobilité

### 1 - Observation en contraste de phase du déplacement de Rhizobium

Pour une simple vérification de la mobilité des clones une observation au microscope photonique entre lame et lamelle en contraste de phase au grossissement moyen suffit.

L'observation des séquences de mouvement est mal aisée entre lame et lamelle. Les bactéries ne peuvent évoluer librement, l'espace entre lame et lamelle étant restreint.



Si on observe une goutte de suspension bactérienne déposé sur une lame non dégraissée sans la recouvrir d'une lamelle, les mouvements des bactéries sont plus amples, l'observation se fait à l'aide d'un microscope muni d'une bague multiplicatrice permettant d'avoir un grossissement 100 à l'aide d'un objectif moyen.

## 2 - Observation macroscopique de la mobilité

Pour une démonstration macroscopique de la migration d'une population bactérienne nous avons utilisé la méthode de migration en boîte de Petri sur milieu semi-solide (gélifié à 3 g/l) BODN (25).

Un inoculum prélevé d'un clone, d'une suspension bactérienne ou d'un culot de centrifugation, est déposé au centre d'une boîte de Petri, à la surface d'un milieu nutritif gélifié à 3 g/l (Agar Difco). L'inoculum est mis à incuber à 30° C sur une surface bien plane. Après 18 heures, la migration radiale de la population bactérienne donne une nappe circulaire dont le diamètre est fonction de la mobilité de la souche.

## C - Méthode d'étude du chimiotactisme

### 1 - mise en évidence

Elle peut se faire par simple observation microscopique en contraste de phase d'une suspension bactérienne. Une souche est dite chimiotactique si les bactéries présentent un type de nage avec des déplacements linéaires entrecoupés de voltes faces. Des mutants affectés sur la fonction chimiotactique peuvent présenter une nage calme sans voltes faces (disparition des culbutes) ou des culbutes incessantes (disparition des trajets rectilignes). D'autre part la présence entre la lame et la lamelle d'une bulle d'air peut provoquer un déplacement orienté des bactéries vers les bulles. Un microcapillaire rempli d'une substance attractive peut montrer le même phénomène.

## 2 - Etude du chimiotactisme

Nous avons utilisé deux techniques décrites par ADLER (1,3), l'une dite en boîte de Petri se fait sur milieu semi-solide, l'autre en milieu liquide est dite technique en capillaire.

### a - Préparation de la suspension bactérienne à tester

Elle est la même pour la technique en capillaire et celle en boîte de Petri. Un inoculum de la souche bactérienne R.m.Ve 26 prélevé d'un étalement sur gélose inclinée de Wright est mis en culture dans 10 ml de milieu TY, à 30° C sous agitation. A une D.O. de 0,4 à 600 nm (correspondant à  $4 \cdot 10^8$  bactéries/ml), la culture est conservée à 4° C.

Pour chaque expérience un inoculum est prélevé dans ce stock et mis en incubation dans 5ml de milieu M9A fructosé à 0,2 % afin d'obtenir  $OD = 0,2$

Cette suspension est ensuite centrifugée à 300 g pendant 15 mn à la température ambiante. Après élimination du surnageant, on laisse le culot se remettre tout seul en suspension à la température ambiante avant de réaliser les dilutions nécessaires dans du tampon C W.

### b - Technique en boîte de Petri

Un inoculum de 0,02 ml, prélevé dans le culot de centrifugation, à l'aide d'une pipette 0,1 ml graduée au 100°, est déposé au centre d'une boîte de Petri contenant 30 ml de milieu TY diluée au 100e et gélosé à 3 g/l (Agar Difco).

Après une incubation de 24 à 48 h sur une surface bien plane à 30° C on peut observer à la surface du milieu des anneaux concentriques de densification bactérienne. L'observation se fait sur un fond noir éclairé.

Cette technique sert à la mise en évidence d'une réponse chimiotactique vis à vis d'un composé donné ; Elle est très approximative. Pour une étude quantitative précise nous utilisons " la technique en capillaire "

#### C - Technique de migration en capillaire

Nous avons utilisé la méthode mise au point par ADLER (3) modifiée par BURG (30) (fig. 5)

Des bactéries en suspension dans un réservoir peuvent migrer sous l'effet d'une attraction chimiotactique et pénétrer dans un capillaire contenant une substance à effet chimiotactique positif sur la bactérie.

Le réservoir est constitué d'une pipette de 10 ml courbée en U (l'écartement est de 1 cm, les branches de 2,5 cm) recouverte d'une lamelle 24 x 24. Cette microchambre peut avoir une contenance de 0,3 ml.

Pour éviter les chocs thermiques et l'évaporation le dispositif est mis dans une boîte de Petri stérile. Le maintien de la température voulue se fait sur une plaque chauffante régulée.

Après dépôt de la suspension bactérienne, on introduit dans la microchambre des capillaires de 1  $\mu$ l rempli de la substance à tester pour son action chimiotactique, et fermé à l'une des extrémités.

Dans une même microchambre on introduit des microcapillaires contenant les substances à tester et des microcapillaires témoins ne contenant que le tampon C.W. ou le milieu NT ayant servi à la suspension des bactéries.

Après une heure, les capillaires sont prélevés et rincés par jets d'eau distillée stérile. Après ouverture du bout scellé, leur contenu est dilué dans du TNP, le dénombrement est réalisé sur milieu R C gélosé à 12 g/l.

Nous avons exprimé les résultats en nombre de bactérie / capillaire.

D - Mode d'isolement des mutants

1 - Mutagénèse

a - Action des rayons ultra-violets

Nous l'avons fait selon les conditions utilisés par WALTON (107) pour l'isolement d'un mutant de Rhizobium sensible aux UV. Nous avons soumis une suspension bactérienne de Rhizobium meliloti Ve 26 en phase exponentielle, à  $10^8$  bactéries/ml aux rayons UV à l'aide d'une lampe 15 W donnant  $1,0 \text{ j m}^2 \text{ S}^{-1}$  pendant 15 secondes.

b - Action de la N - methyl , N - Nitro ,  
N - Nitrosoquanidine ( NTG ) -

Pour l'action de la NTG nous avons choisi la méthode de MEGIAS ( 76 ) pour la souche Ve 26 de R. meliloti.

Nous avons réalisé la mutagénèse sur une suspension bactérienne en phase exponentielle, 10 ml de culture à  $10^8$  bactéries par millilitre, sont lavés et repris dans du tampon tris-maléate à PH 6,2. Nous avons soumis la suspension bactérienne à  $700 \mu\text{g/ml}$  de NTG pendant 30 mn à  $30^\circ \text{ C}$  et sous agitation.

Après 3 lavages au tampon tris maléique, les bactéries sont reprises dans du milieu TY et mises en incubation pendant 9 h à  $30^\circ \text{ C}$ . Nous les conservons ensuite à  $4^\circ \text{ C}$ .

Le taux de survie est déterminé par numération avant et après action de la NTG, c'est le % de bactéries ayant survécu au traitement.

L'efficacité de l'agent mutagène (NTG) a été déterminée par appréciation de la résistance à la tetracycline. C'est le taux d'apparition de mutants résistant à la tetracycline après action de la NTG.

## 2 - Sélection des mutants

Nous avons effectué des étalements en surface, à partir de la population mutée de Rhizobium meliloti souche Ve 26, sur le milieu TY gélosé à 12 g/l, après l'avoir enrichie selon la méthode d'ARMSTRONG (9).

La sélection de mutants non chimiotactiques ou non mobiles est réalisée par réplique au fil de platine, sur milieu TY dilué au 10<sup>e</sup>e et gélosé à 3 g/l (Agar Difco) de clones isolés.

Les mutants affectés sur la mobilité donnent des colonies ponctuelles sur milieu semi-solide après 24 h d'incubation à 30° C.

Les mutants non chimiotactiques peuvent donner soit des étalements dépourvus d'anneaux chimiotactiques, soit des colonies ponctuelles. Les 2 types apparaissent mobiles en observation microscopique. Les premiers, dans une suspension en milieu de culture, ont une nage calme sans culbute ; les seconds tournent sur eux même sans trajets rectilignes.

### E - Test de nodulation et culture aseptique des légumineuses.

a - cas de petites graines : telle : trèfle, luzerne, soja.

Nous avons immergé pendant 5mn avec agitation une cinquantaine de graines dans un bain de HgCl<sub>2</sub> à 2,5 ‰ dans de l'eau distillée additionnée d'une goutte de teepol comme agent mouillant.

b - cas de grosses graines ; telles : pois, haricot,

Nous avons utilisé une solution d'hypochlorite de calcium à 10 ‰ dans l'eau distillée stérile. Une vingtaine de graines après un bain de Mercryl Laurylé de quelques secondes, au fond d'une boîte de Petri, est mise en présence du désinfectant pendant 5 mn sous agitation.

Pour les deux types de graines, les solutions de stérilisation sont éliminées par 8 lavages à l'eau distillée stérile.

## 2 - Contrôle de l'asepsie et la germination des graines

Après désinfection, les graines sont mises à germer à l'obscurité, à 30° C pendant 48 heures.

La prégermination pour les petites graines se fait sur milieu RC gélosé à 12 ‰ et fructosé à 1 ‰ en boîte de Petri.

Pour les grosses graines nous avons utilisé des boîtes de Petri en verre contenant un disque en papier filtre mis sur du coton hydrophile imbibé d'eau distillée. Le tout est stérilisé à l'autoclave (130° , 20 mn). Les graines sont mises à germer sur le papier filtre à l'obscurité , à 30° C pendant 48 heures.

Cette prégermination nous permet de sélectionner des semis de même vigueur et exempt de toute contamination.

## 3 - Culture aseptique de plantules

### a - En milieu liquide sur support en papier

Les semis sélectionnés pour leur stérilité et leur vigueur (racine de longueur entre 5 et 10 mm) sont prélevés à l'ose et déposés sur la bande de papier dans le tube (comme indiqué fig.(7a,b) de manière que seule la racine trempe dans le milieu NT. Les conditions de cultures sont 16 h de lumière (4 200 Lux), 80 % humidité, 25° C le jour et 18° C la nuit.

### b - Sur support granulé en " mini-serre "

Pour laver et stériliser la " mini-serre " nous avons

procédé comme suit : après un bain de 30 mn d'une solution de Mucapur à 1 % dans l'eau distillée portée à 70° C, nous lavons deux fois à l'eau distillée. La stérilisation est réalisée par exposition de la cuve aux rayons UV d'une lampe de 15 W correspondant à 15 J m<sup>-2</sup> S<sup>-1</sup> après séchage.

Le substrat stérilisé séparément est mis dans les grandes alvéoles et imbibé de milieu NT, 24 h avant l'utilisation.

Les graines germées ayant une racine inférieure à 0,5 cm sont prélevées et déposées sur le substrat avec la racine vers le bas. On dépose 15 à 40 graines par alvéoles selon leur taille, espacées d'au moins 1 cm.

#### 4 - Préparation d'exsudats racinaires

##### a - Exsudats de jeunes semis

Une quarantaine de graines stériles est mise à germer, dans une boîte de Petri contenant 20 ml de milieu NT, à l'obscurité et à 30° C ; après 24 heures, nous prélevons les 20 ml de milieu que nous stérilisons par passage sur filtre SARTORIUS 0,22 µm.

##### b - Exsudat racinaire de jeunes plantules

Une quarantaine de jeune semis est mise en culture aseptique dans les tubes 20 x 400 contenant du milieu NT. Après une semaine, le milieu est aspiré stérilement et remplacé par 20 ml de milieu NT neuf. Les plantules sont remises en condition de serre (16 h de lumière; 25° C, 80 % H) Après 24 h, les 20 ml sont prélevés stérilement, passés sur filtre 0,22 µm.

#### 5 - Isolement des bactéries à partir des nodules

Les nodules sont désinfectés pendant 3 mn dans une solution à 1 % de bichlorure de mercure suivi de 8 lavages à l'eau distillée stérile. Ils sont ensuite broyés un à un dans le milieu de culture TY puis étalés sur le milieu gélosé à 15 g/l.

RESULTATS ET COMMENTAIRES

-----



Résultats et commentaires

I . ISOLEMENT ET ETUDE DE MUTANTS DE RHIZOBIUM MELILOTI

Ve 26.

A - MUTAGENÈSE

1 . Action des rayons ultra-violetts (U.V.)

Nous avons réalisé la mutagénèse par l'action des U.V. sur la souche Ve 26 de Rhizobium meliloti en phase exponentielle. 10 ml de suspension bactérienne en milieu TY, de densité optique à 600 nm de 0,1, sont lavés et repris dans du T.M.P. Nous avons exposé la suspension bactérienne à une lampe à U.V. de 15 W, donnant  $10 \text{ J m}^2/\text{s}$  à 50 cm de distance, pendant 15 seconde. Après l'irradiation la suspension bactérienne est maintenue à l'obscurité, à 30° C et en agitation pendant 12 h.

Une observation microscopique en contraste de phase, montre une nette augmentation du nombre de bactéries mobiles par rapport à la population non irradiée. Cette augmentation est confirmée par un test de mobilité en milieu semi-solide.

La population bactérienne soumise aux U.V. est ensuite enrichie en mutants non mobiles et non chimiotactiques par la technique dite : "négative swarm selection" dont les étapes sont indiquées sur la figure 8, nous décrivons avec plus de détails cette technique au paragraphe suivant. Tous les mutants isolés se sont avérés peu stables, aussi bien les mobiles, les non mobile ( $\text{mob}^-$ ,  $\text{fla}^-$ ) que les non chimiotactiques ( $\text{ché}^-$ ).

Nous avons obtenu en 15 secondes de traitement par un rayonnement de  $10 \text{ J/m}^2 \cdot \text{s}$ , un taux de survie de 8,5 %, alors que MEGIAS (76) signale un taux de survie de 10 % après une exposition de 15 mn à un rayonnement de  $18 \text{ J/m}^2 \cdot \text{s}$  chez R. trifolii et WALTON (107), un taux de survie de 10 % pour le même temps d'irradiation mais avec une énergie de  $1 \text{ J/m}^2 \cdot \text{s}$  toujours chez la même bactérie.

L'effet mutagène est controversé aussi : WALTON obtient une bonne efficacité contrairement à MEGIAS (76):

Signalons en outre que WALTON et MEGIAS s'accordent à dire que la N. Methyl, N. Nitro, N. Nitrosoguanidine (N.T.G.) est bien plus mutagène que les U.V.

## 2 . Action de la N. Methyl, N. Nitro, N. Nitrosoguanidine (N.T.G.)

a - Pour l'action de la N.T.G. nous avons adopté la méthode de MEGIAS - pour la souche Ve 26 de R. Meliloti . Après quelques essais nous avons choisi les conditions donnant 0,1 % de taux de survie. Une suspension bactérienne en phase exponentielle, contenant  $10^8$  bactéries/ml est soumise pendant 30 min à 700  $\mu$ g/ml de N.T.G.

Le taux de survie déterminé par une numération avant et après action de l'agent mutagène. Le pourcentage de survivant est voisin de 0,11 %.

nombre de cellules après mutagenese  $3.10^5$  Bact/ml  
nombre de cellules avant mutagenese  $2.810^8$  Bact/ml

L'efficacité de l'agent mutagène a été déterminé par appréciation de la résistance à la tetracycline. Nous avons choisi la tetracycline car c'est un marqueur chromosomique. Et la dose létale D 50 est de 0,29  $\mu$ g par ml pour E. coli et 0,35  $\mu$ g/ml pour B. subtilis (35).

Le nombre de mutants spontanés chez la souche Ve 26 de R. meliloti, à la tetracycline à 4  $\mu$ g/ml est nul pour une population de  $10^9$  bactéries par ml. Après action de la N.T.G., apparaissent 91 mutants résistant dans une population de  $10^8$  bactéries par ml.

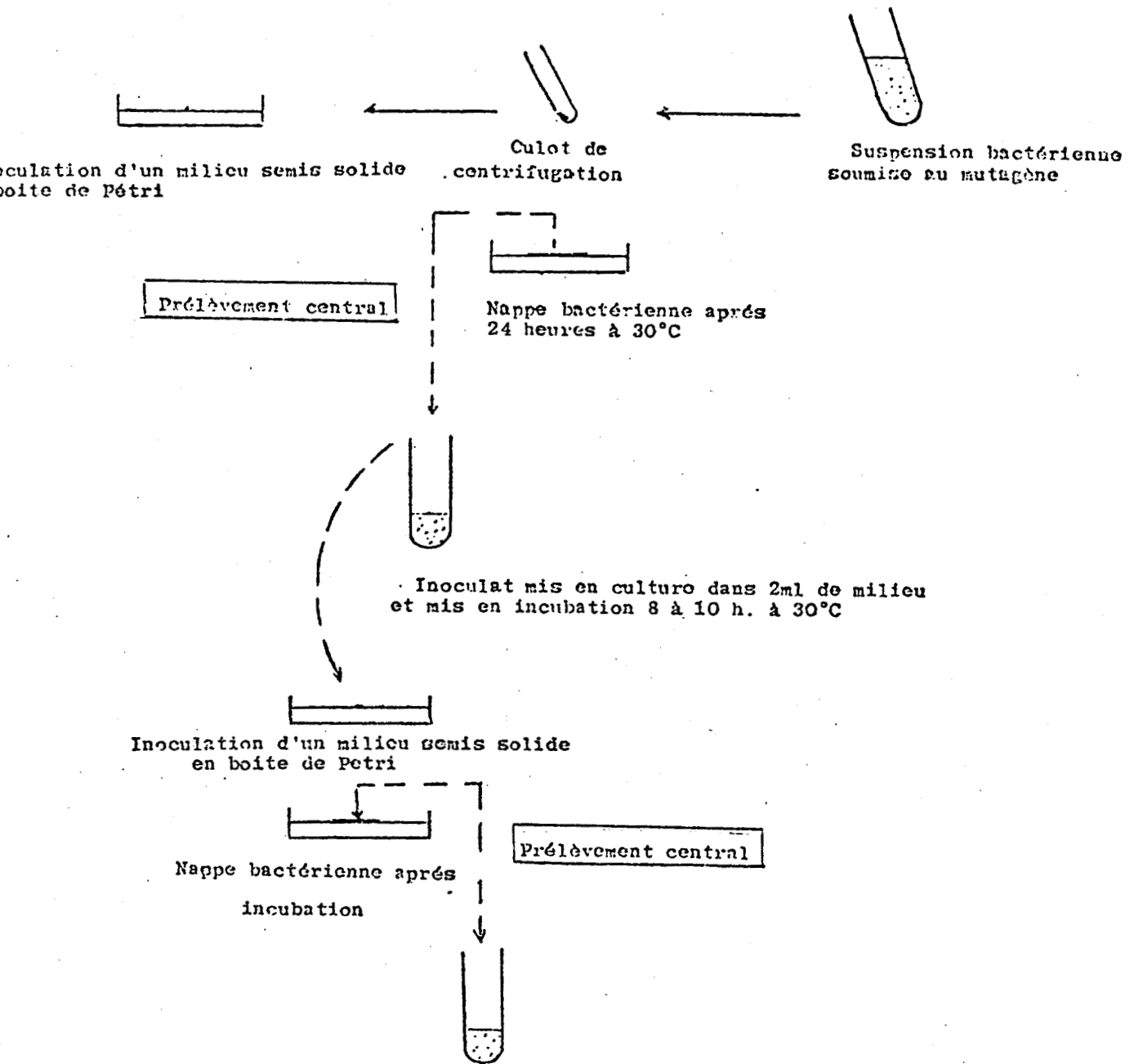


Figure 8 : Mode d'enrichissement d'une suspension bactérienne en mutants non mobiles et non chimiotactiques

Les gènes controlant la mobilité et le chimiotactisme sont portés par le chromosome (8), tout comme ceux de la résistance à la tetracycline.

- b - Isolement des mutants

. enrichissement de la population bactérienne soumise à l'agent mutagène en mutants non mobiles et non chimiotactiques.

Selon BUON (25) une population bactérienne déposée sur un milieu nutritif semi-solide migre radialement et se développe en nappe circulaire dont le diamètre dépend de la mobilité de la population. Les bactéries qui migrent vont à la recherche d'éléments nutritifs. Les individus de la population qui sont non mobiles ou non chimiotactiques restent sur le lieu de dépôt.

Partant de ce principe ARMSTRONG (9) a établi un modèle de sélection basé sur une série de cultures successives d'un inoculum sur milieu semi-solide ; méthode dite : "négative swarm sélection" par COLLINS (34). Cette technique permet d'enrichir la population bactérienne en mutants non mobiles ( $mob^-$ ), non flagellés ( $fla^-$ ) et non chimiotactiques (ché).

Nous avons utilisé cette méthode sous sa forme modifiée dont les divers étapes figurent sur la figure 8. Un millilitre de la suspension bactérienne traitée à la NTG est centrifugé 20  $\mu$ l du culot sont déposés à la surface d'un milieu nutritif semi-solide (milieu TY dilué au 1/100<sup>e</sup>). Après 24 h d'incubation à 30° C des prélèvements à l'ose, au centre et à la périphérie des nappes formés par les inoculats, sont réalisés : ils sont mis chacun dans 2 ml de TY/100 et incubés à 30° C pendant 12 h les suspensions obtenues sont traités comme précédemment. Ces différentes étapes constituent un cycle d'enrichissement.

.../...

PHOTOGRAPHIE N° 1 : Replique de mutants sur milieu de culture semis-solide (gélosé à 3g/l). Les nappes bactériennes formées par les clones non mobiles et non chimiotactiques sont ponctuelles ( flèche ); les nappes formés par les clones mobiles sont étalées ( double flèche ).

## β . Isolement des mutants

Après 4 cycles d'enrichissement, comme indiqué au paragraphe précédent, nous effectuons des isolements par étalement de la suspension bactérienne sur plaque de milieu TY gélosé - 12 g/l.

La mobilité et le chimiotactisme des clones séparés sont testés par réplique au fil de platine sur milieu R HB, semi-solide. Seuls les clones autotrophes seront retenus. Les répliques sont incubés à 30° C pendant 24 H.

## γ . Méthode de sélection

a - la sélection des mutants non mobiles est basée sur le fait qu'une population non mobile incubée sur milieu semi-solide s'étale très peu par rapport à une population mobile (25).

La photographie (1) montre la différence entre un mutant mobile et des mutants non mobiles.

L'observation au microscope photonique, en contraste de phase, est nécessaire pour confirmer la non mobilité des bactéries issues de clones "non étalés" sur gélose molle.

Cette absence d'étalement sur milieu semi-solide du clone muté non mobile n'est pas due à une faible multiplication des bactéries.

Remarques : distinction entre migration et multiplication bactérienne sur milieu nutritif semi-solide.

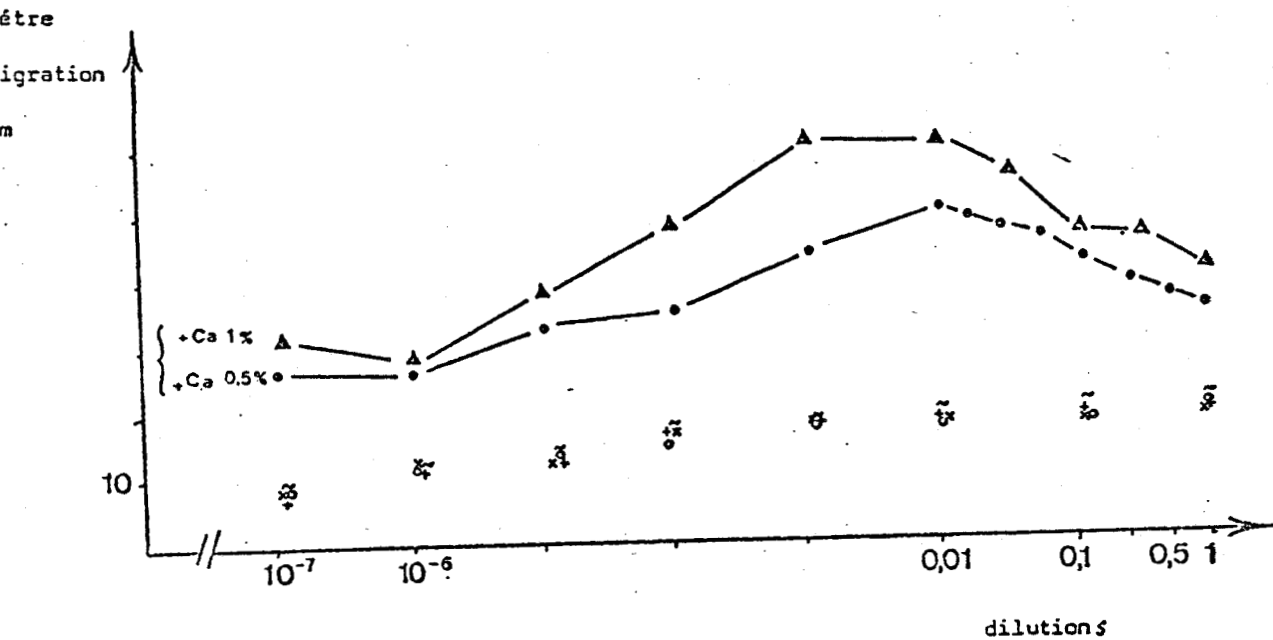


FIGURE : 9. Migration de la souche *R. Meliloti* Ve 26 (▲, ●) et des mutants non chimiotactique (○) et non mobiles (×, +) sur le milieu TY à divers dilutions et à deux - concentrations en calcium (1 et 0,5 %). Les migrations des mutants, aux concentrations en  $\text{CaCl}_2$  sont similaires.

Sur un milieu nutritif semi-solide - contenant 3 g d'agar (Difco) par litre - le développement d'un inoculum en nappe bactérienne circulaire est la résultante de deux phénomènes : la migration et la multiplication des bactéries. Pour essayer de distinguer ces deux effets nous avons incubé la souche Ve 26 sauvage sur divers dilutions de milieu nutritif faiblement gélosé (3 g/l) communication personnelle de Mr GUILLAUME.

Par ailleurs nous avons réalisé cette expérience sur différents milieux. Le graphique de la figure (9) montre les résultats obtenus en milieu TY.

L'observation et la mesure de la nappe bactérienne se faisant sur fond noir éclairé il est facile de différencier les densités bactériennes d'après l'opacité relative des nappes.

En milieu TY non dilué le diamètre des nappes est en moyenne de 4 cm.

En milieu TY dilué au 1/1000 et au 1/100 le diamètre atteint et en moyenne de 5 à 6 cm.

La densité des nappes est plus importante en milieu TY non dilué.

Bien que ce milieu soit à une concentration donnant l'optimum de croissance pour *Rhizobium* le diamètre des nappes de migration sont plus faible que ceux obtenus sur le milieu dilué au 1/100 et au 1/1000.

Le diamètre des nappes résulte de l'étalement de la population bactérienne beaucoup plus que de sa multiplication. Un maximum de multiplication bactérienne ne donne pas automatiquement un maximum de migration.

.../...



La réponse chimiotactique est plus nette pour de faibles concentrations en éléments nutritifs et conduit à une migration de la population bactérienne (1).

De ce fait le milieu TY dilué au 1/100 (TY/100) nous a servi de milieu de sélection.

b - Pour l'obtention des mutants non chimiotactiques nous avons utilisé la méthode de sélection préconisée par ADLER (3) pour E. coli

Selon ADLER (3) une population bactérienne à fonction chimiotactique sur milieu nutritif semi-solide donne une nappe bactérienne circulaire présentant des anneaux de densification concentriques. Ces anneaux sont constitués d'une accumulation de bactéries (voir remarque infra).

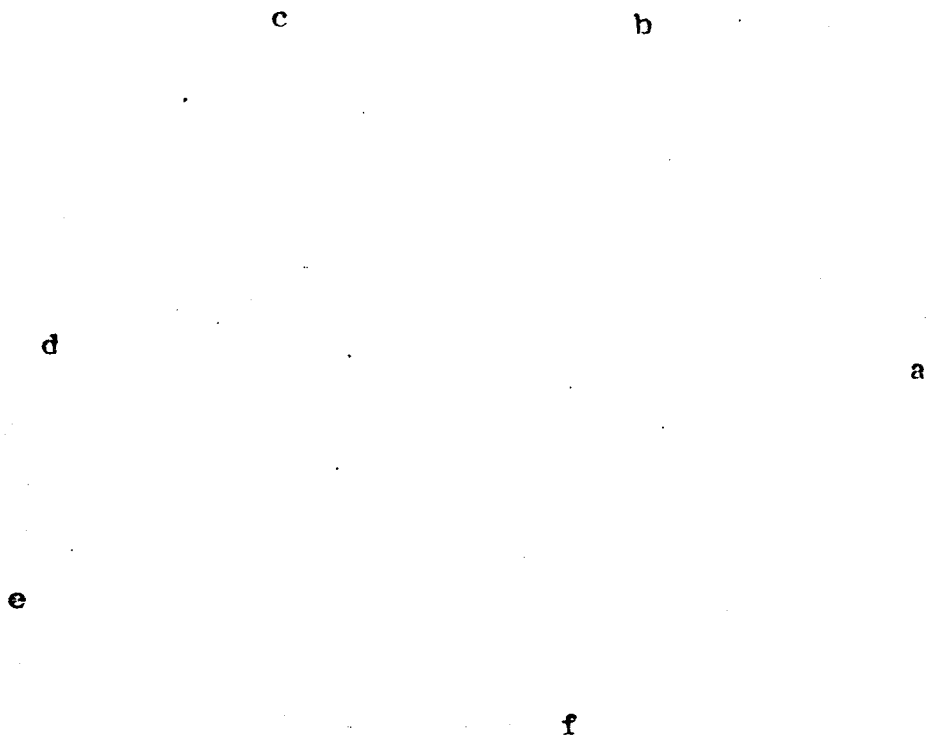
Un clone ayant perdu toute fonction chimiotactique (noté ché) repris sur milieu semi-solide forme une nappe circulaire uniforme sans anneaux de densification bactérienne (1).

D'après COLINS (34) les clones qui ne présentent pas de mobilité sur milieu semi-solide mais en présentent en milieu liquide sont considérés comme non chimiotactiques et sont notés (ché<sup>-</sup>).

L'observation au microscope photonique, en contraste de phase, d'une culture en milieu liquide de la souche sauvage Ve 26 de R. meliloti montre une nage formée de phases rectilignes alternant avec des phases de culbutes où la bactérie tourne brutalement sur elle-même pour fréquemment changer de direction.

TABLEAU 2 PRINCIPAUX CARACTERES DES DIFFERENTS MUTANTS

Mutants	Ciliature	Mobilité en milieu liquide	Comportement en milieu semi-solide
type : désignation		migration	Colonies-satellites
non chimi- otactique:	péritriche	faible	présentes
che <sup>-</sup>			
non mobi- le	polaire	nulle	présentes
mob <sup>-</sup>			
non fla- gellé	sans	nulle	absentes
fla <sup>-</sup> 1			
fla <sup>-</sup> 2	sans	nulle	absentes (très rares)
sauvage			
mobile et chimio- tactique	péritriches	Intense	absentes
R.M. Ve 26			



PHOTOGRAPHIE N° 2 :

Nappe de migration sur milieu semis solide,  
des mutants isolés et de la souche Ve26 de  
Rhizobium meliloti .

- a : souche Ve26 mobile et chimiotactique.
- b : suspension bactérienne de la souche  
Ve26 soumise à l'action de la NTG et enrichie  
en mutants , non chimiotactique et non mobiles.
- c et e : clones de deux mutants non flagellés.
- d : clone de mutant non mobile.
- f : clone de mutant non chimiotactique .

( Noter les colonies satellites à côté des nappes  
d et f (flèches) ) .

C'est le cas quand la population bactérienne est en milieu isotrope. C'est un type de nage aléatoire, un quadrillage désordonné d'un espace donné.

Les trajets rectilignes sont plus longs quand ils sont orientés du côté d'un gradient attractif. De ce fait les bactéries se déplacent d'un mouvement aléatoire mais orienté vers le gradient attractif.

Les mutants non chimiotactique (ché<sup>-</sup>) peuvent avoir soit "une nage calme" sans volte-faces, soit tourner sur eux-mêmes sans trajet rectiligne, soit une nage comme celle de la souche mère mais ne réagissent à aucun gradient.

Le tableau 2 montre les caractères des différents mutants isolés.

Photographie 2.

REMARQUES : Mise en évidence des anneaux chimiotactiques.

Pour montrer que les anneaux chimiotactiques sont une accumulation des bactéries par "migration" et non par multiplication nous avons réalisé l'expérience suivante :

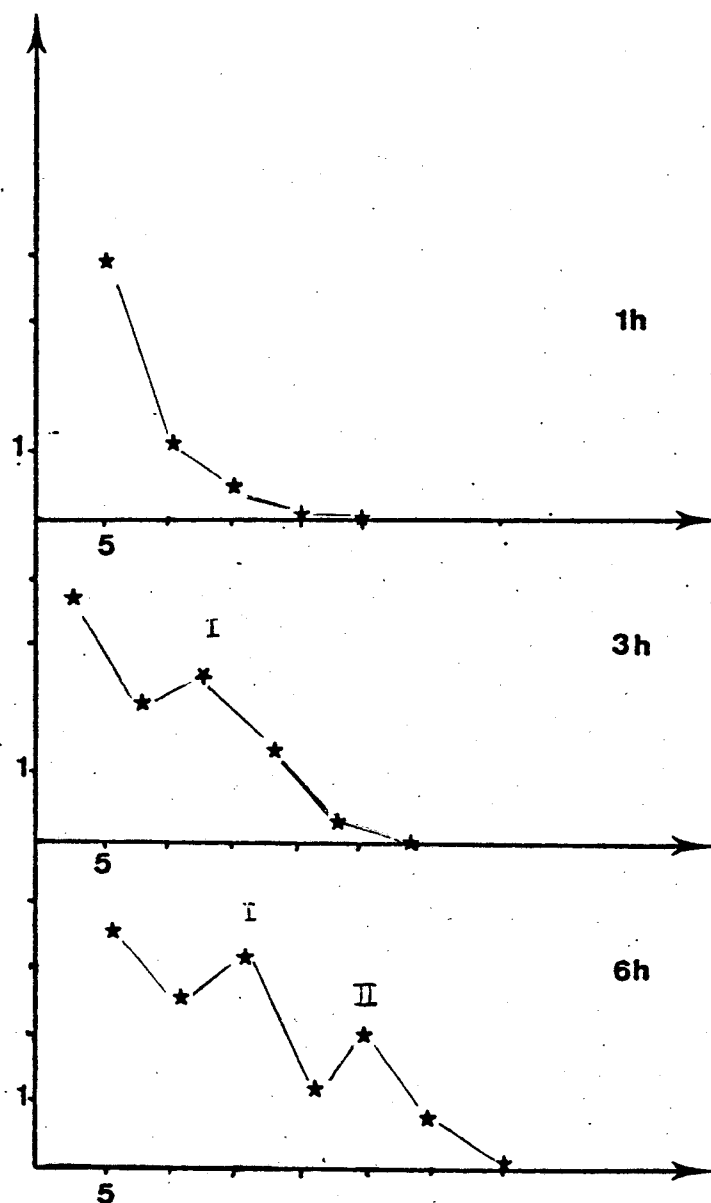
Un inoculum prélevé d'un culot de centrifugation d'une culture en milieu liquide de la souche sauvage V<sup>e</sup> 26 est mis à incuber sur milieu TY/100.

Des aliquots sont prélevés à l'usage à des distances déterminées et remis en suspension dans du T.N.P. et dénombrés les prélèvements sont effectués après 1h, 3 h et 6 heures d'incubation à 30° C.

Les résultats obtenus nous ont permis de tracer le graphique de la figure 10.

Nombre de bactérie  
par prélèvement

$\times 10^4$



Distance au centre  
de la nappe de  
migration en mm

FIGURE 10 Densité bactérienne au sein d'une nappe de migration, les pics I et II correspondent à une accumulation des bactéries (= à des bandes de densification) la bande I s'est déplacée vers l'extérieur et la bande II a pris sa place : Il y a un déplacement par "vagues" de la population bactérienne.



On note que la densité bactérienne n'est pas uniforme. Le nombre de bactéries par prélèvement varie entre  $10^2$  et  $10^4$ .

Un premier pic de  $10^4$  bactéries apparaît à quelque millimètre de la limite de la nappe, après seulement 3 h d'incubation.

Ces pics de densification co respondent aux anneaux chimiotactiques sur la nappe bactérienne. Le déplacement des pics vers l'extérieur correspond à une migration de la population bactérienne constituant l'anneau de densification.

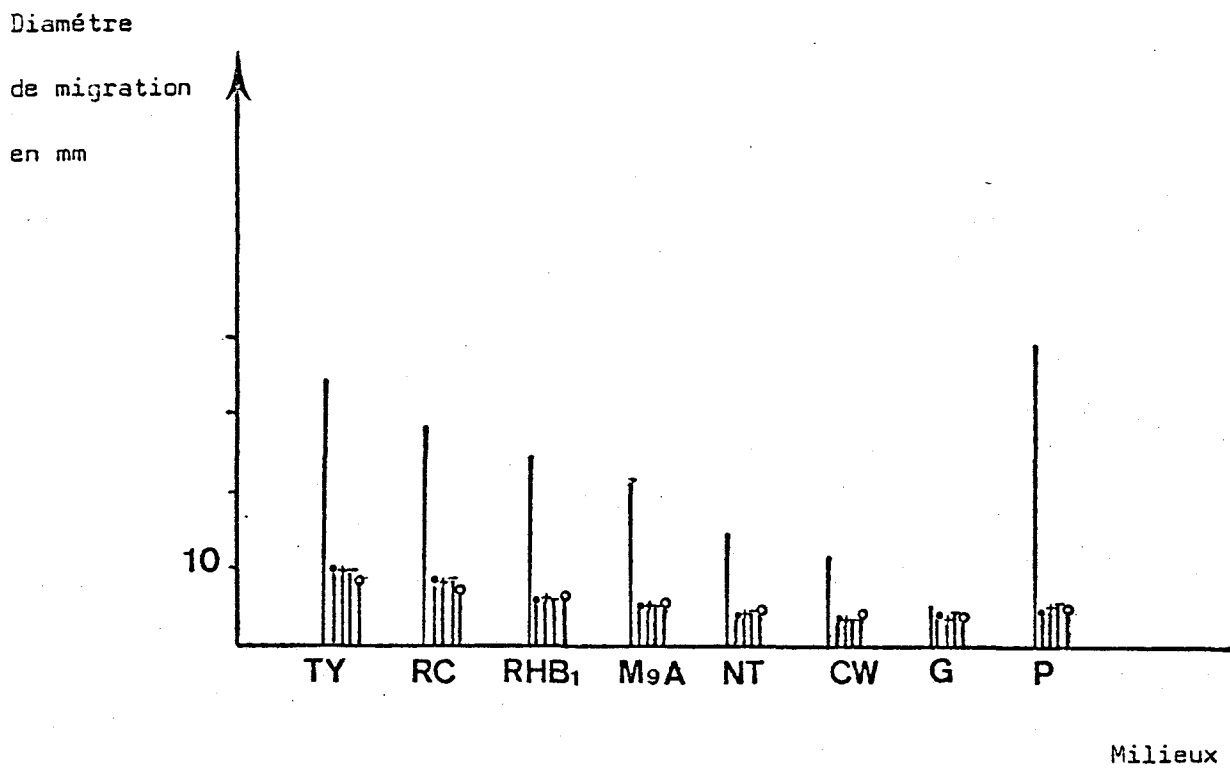


FIGURE 11 : Migration de la souche R. Meliloti Ve 26 et des mutants isolés ché ( • ) , mob<sup>+</sup> ( + ) et Fla<sup>-</sup> ( - , ◐ ) , sur divers milieux contenant 3g d'agar par litre

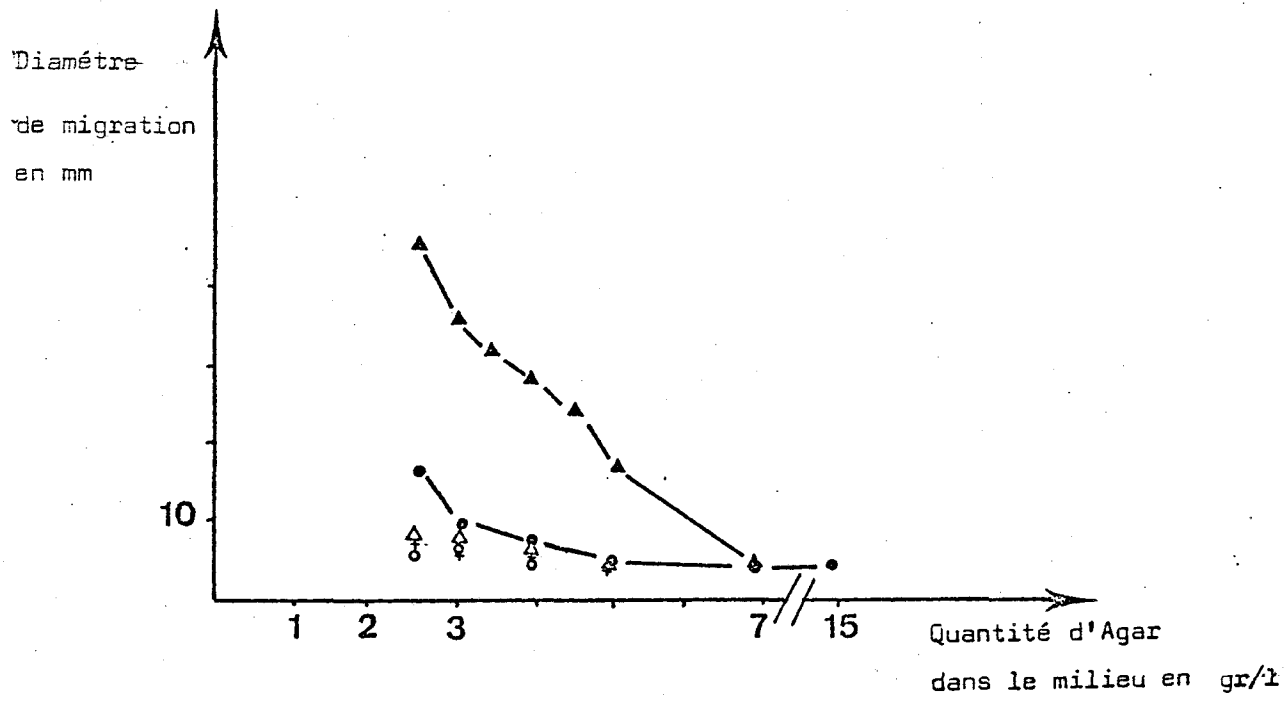


FIGURE 12 Etude de la migration de la souche R. Meliloti Ve 26 ( ◐ ) et des mutants non mobiles ( ◑ , + , ◐ ) et non chimiotactiques ( • ) . En fonction de la quantité d'agar dans le milieu de migration (incubation 48 h à 30° c).



## B - ETUDE COMPARATIVE DES MUTANTS ISOLES

Cette étude doit nous permettre de déterminer le comportement des mutants isolés selon quelques facteurs physiques (température, temps, viscosité) et quelques milieux de culture.

### 1 - Étude sur milieu semi-solide

#### a - Développement et migration sur divers milieux

Des inoculats de 20  $\mu$ l de la souche V<sup>e</sup> 26 mobile et des mutants préparés comme nous l'avons indiqué précédemment, sont déposés à la surface des milieux semi-solide suivants TY, RC, RHB1, CW, M<sub>9</sub>A et NT avec et sans exsudats racinaires de plantules de luzerne.

Les mesures de diamètre de migration sont effectuées après incubation à 30° C. Le diagramme de la figure 11 a été établi pour des valeurs obtenues après 24 heures d'incubation.

Pour la souche V<sup>e</sup> 26 mobile on note que le diamètre de la nappe bactérienne varie selon le type de milieu. Les plus grands diamètres sont obtenus en milieu TY et en milieu NT contenant des exsudants de plantules, les plus petits en milieu CW. La densité bactérienne la plus faible est obtenue sur les milieux RHB<sub>1</sub> et CW.

Pour les mutants il y a très peu de variation selon les milieux. La faible augmentation sur les milieux les plus riches est due à une multiplication plus importante des bactéries. Sur les milieux minima les nappes sont moins denses. Le diamètre maximum obtenu est de 10 mm en milieu TY et NT contenant des exsudats de plantules.



Il est à noter que la souche Ve 26 de R. meliloti se développe sur le tampon CW pructosé à 0,2 %. Selon GUEU (48) la souche Ve 26 serait attiré par la gélose.

Les différents milieux étudiés n'ont permis de déceler aucun effet sur le caractère non mobile et non chimiotactique des mutants.

b - Effet de la concentration en agar du milieu sur le diamètre de migration.

Nous avons réalisé cette expérience avec le milieu TY dilué au 1/100<sup>o</sup> qui donne le maximum de migration.

La préparation des inoculats et les conditions d'incubation ont été décrites précédemment.

Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure 12

Il y a une diminution du diamètre de migration avec l'augmentation de la quantité de gélose dans le milieu, aussi bien pour la souche Ve 26 mobile que pour les mutants. A 2,5 grammes d'agar par litre dans le milieu, le diamètre de migration de la souche Ve 26 est de 40 mm celui du mutant non chimiotactique est de 18 mm. Pour les mutants non mobiles, les diamètres de migration sont inférieure à 10 mm.

Ces résultats sont comparables à ceux signalé chez P. aéroginoseae (101) et S. typhimurium (41).

L'agar est un enchevêtrement de double hélices de polysaccharides, qui forme à température ambiante ou à 30° C un réseau de mailles d'autant plus dense que la concentration d'agar est élevée. Ce qui freine la migration des bactéries (41)

Diamètre de migration en mm.

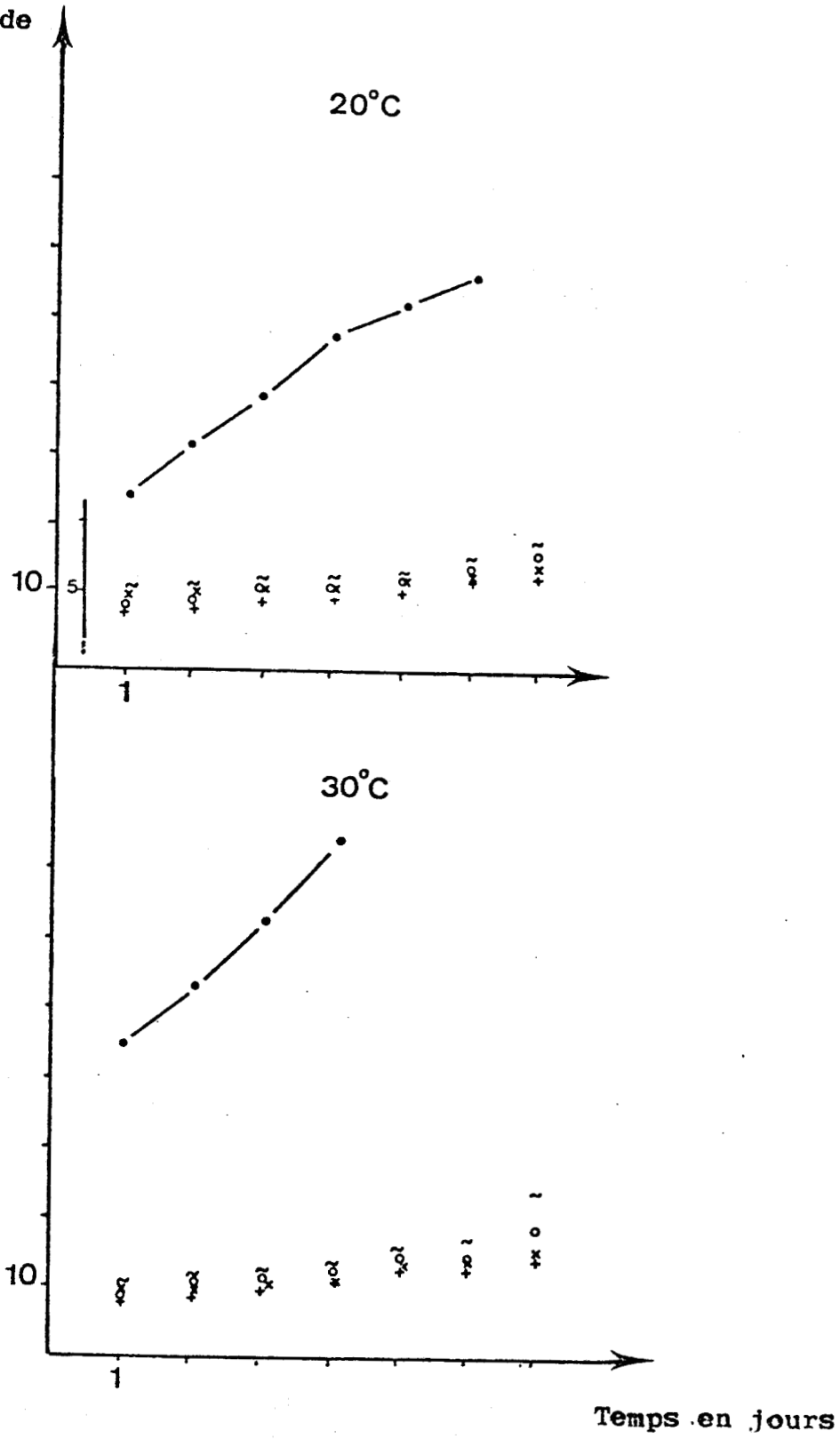


FIGURE 13 : Migration de la souche *R.meliloti* (•) et des mutants isolés : *che*<sup>-</sup> (∞) , *mob*<sup>-</sup> (◦) et *fla*<sup>-</sup> (x+) sur milieu TY/100 contenant 3 gr./l d'agar ; à 20 et 30°C .



C - Influence du temps et de la température sur la migration

Nous avons suivi le développement du diamètre de migration, pour la souche Ve 26 mobile et des mutants isolés à 30° C et à 20° C pendant une semaine. Le milieu de migration choisi est le TY dilué au 1/100<sup>e</sup> et gélosé à 3 g/l.

les boîtes de Petri sont inoculées par 20 µl, d'un culot de centrifugation d'une suspension bactérienne en début de phase exponentielle.

Des mesures effectuées toutes les 24 heures nous ont permis de tracer les graphiques de la figure 13.

On note une évolution linéaire du diamètre de la nappe de migration en fonction du temps à la fois pour la température de 30° C et celle de 20° C, la courbe à une pente plus marquée pour l'incubation à 30° C indiquant un développement plus rapide des nappes de migration à cette température.

Pour la souche Ve 26 mobile la nappe atteint un diamètre de 50 mm en 48 heures alors qu'à 20° C pour le même temps le diamètre n'est que de 30 mm.

Pour le mutant (che<sup>-</sup>) le diamètre après 6 jours d'incubation à 30° C est double de celui obtenu pendant la même période à 20° C.

Pour les mutants non mobiles l'accroissement des diamètres avec la température est moins marqué.

Il est à signaler qu'après une semaine, que ce soit à 20° C ou à 30° C, des colonies dites "satellites" apparaissent autour des nappes formées par les mutants non chimiotactiques et non mobiles. En moyenne 4 à 5 par boîte.

Diamètre de  
migration en  
mm

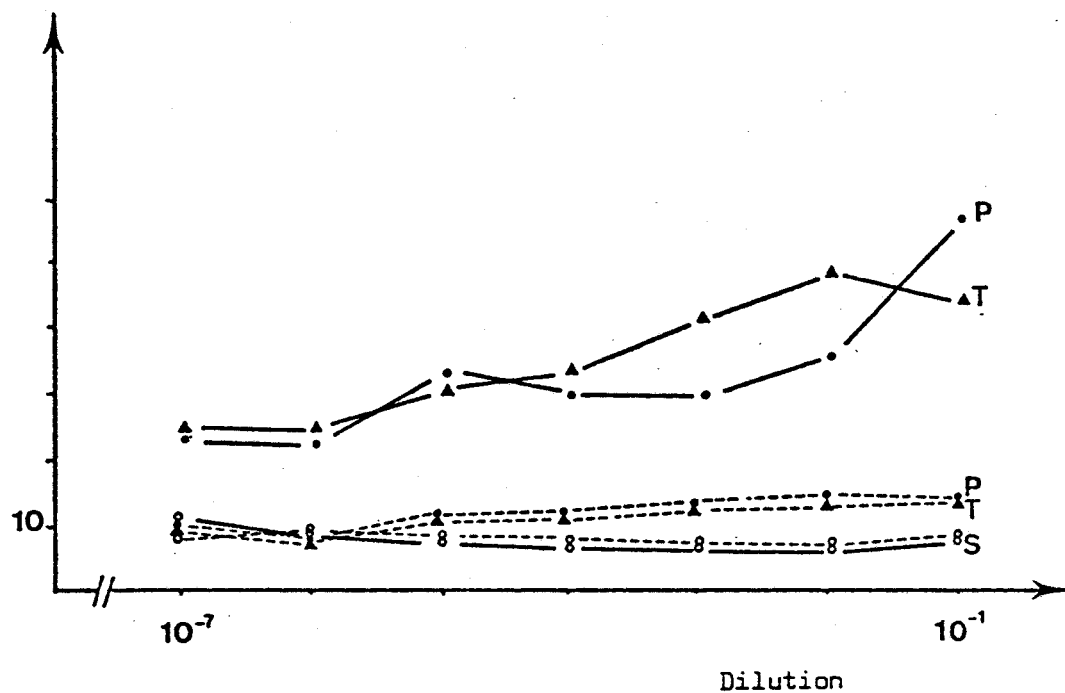


FIGURE 14: Migration de la souche Ve 26 et du mutant non chimiotactique Ve 26 (chē) sur milieu NT à 3 g/l d'agar, contenant des exsudats racinaires de graines germées ( o ) ou de jeunes plantules ( ● ) et sur milieu TY ( ▲ ).

— Ve 26  
 --- Ve 26 (chē).



La température tout en augmentant la multiplication des bactéries a un effet positif sur la mobilité.

ORDAL (84) signale un optimum d'activité chimiotactique et de mobilité chez B. subtilis à 35° C.

La température favorise plus la mobilité que la multiplication bactérienne (84, 108).

Selon ADLER (73) les colonies satellites qui apparaissent autour des nappes de migration chez les mutants non mobiles seraient dues à des réversions. Par ailleurs chez les mutants à flagelles paralysés, les bactéries peuvent tourner sur elles-mêmes, et entraîner la rotation passive du flagelle hélicoïdal rigide qui la propulse faiblement. ISHIHARA (56) l'a montré chez S. typhimurium.

#### d - Influence des exsudats racinaires sur la migration

Nous avons réalisé des essais de migration en présence d'exsudats racinaires sur milieux gélosés à 3 grammes d'agar (DIFCO). La préparation des exsudats comme indiquée dans la partie matériel et méthodes a été faite à partir de plantules âgées de 24 heures (graine en germination), et d'une semaine.

Dans le cas des exsudats de plantules âgées d'une semaine la souche Ve 26 mobile migre autant que sur le milieu TY, en moyenne le diamètre des nappes atteint 40 mm en 24 heures à 30° C. Le mutant non chimiotactique (che<sup>-</sup>) migre très peu dans les deux cas.

Sur la figure 14 nous n'avons représenté que les résultats de la souche Ve 26 mobile et du mutant non chimiotactique.

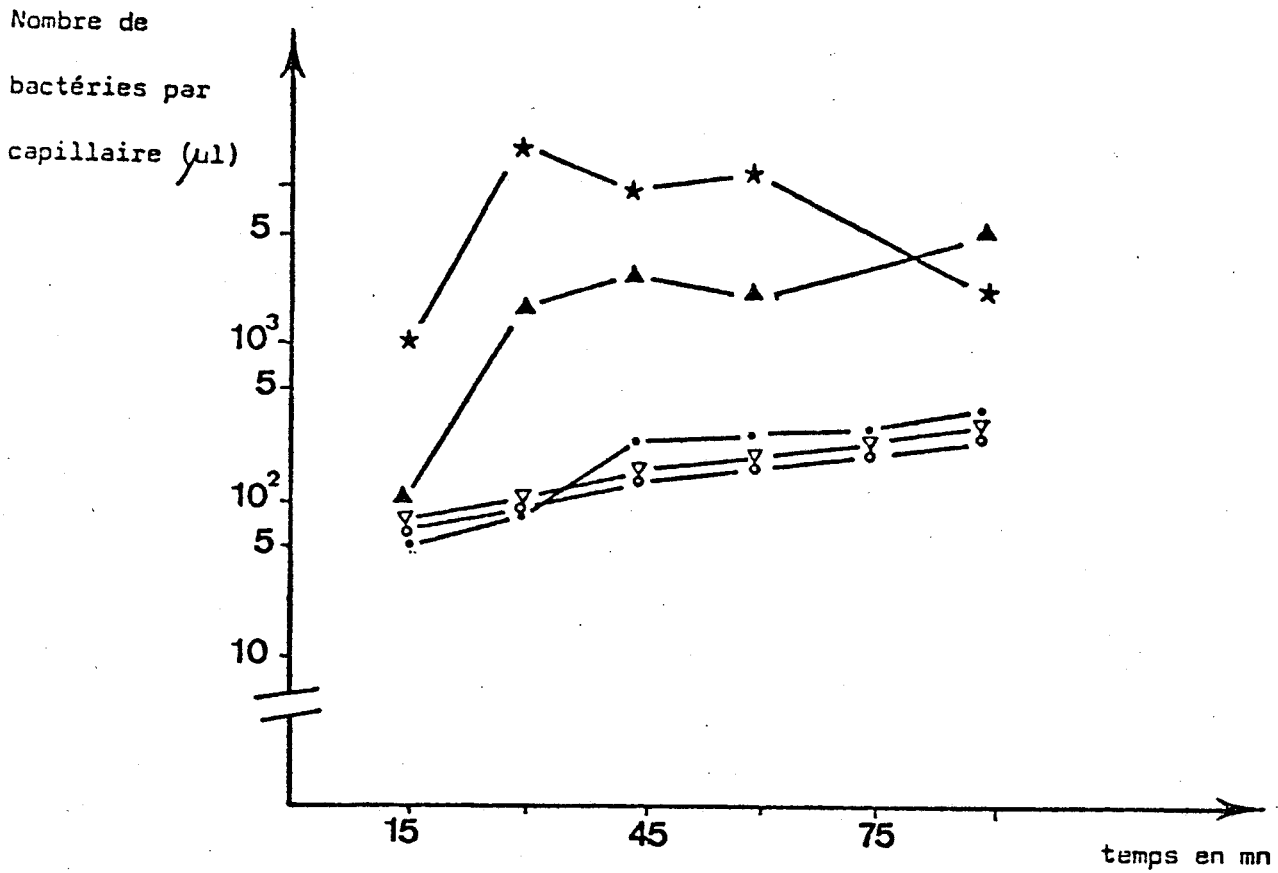


FIGURE : 15 b Migration en capillaire de R. Meliloti VE 26 (★) et des mutants isolés : ché (▲), mob<sup>-</sup> (•) et fla<sup>-</sup> (∇, ○) ; en fonction du temps. (à 30° c pendant 1 heure).

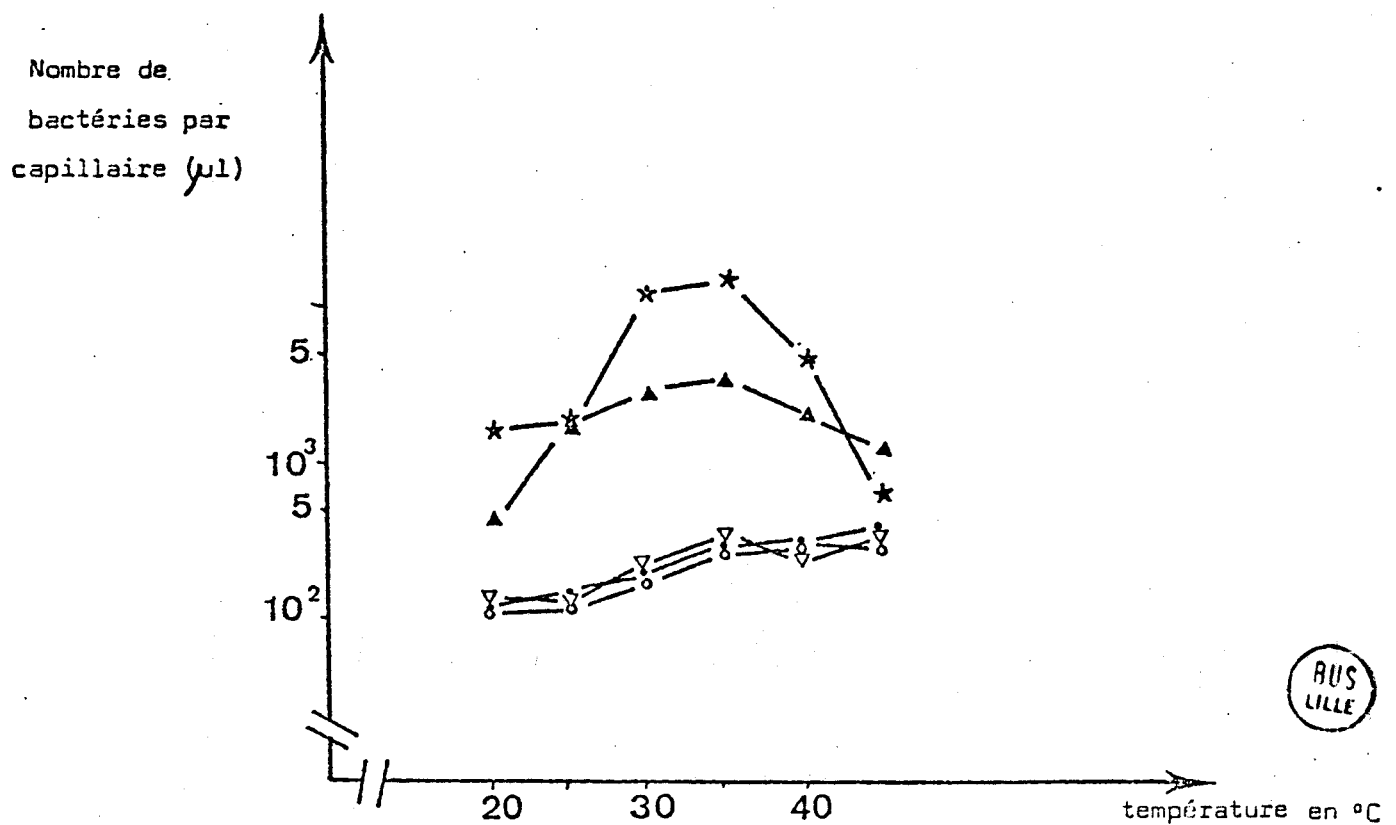


FIGURE : 15 a Migration en capillaire de R. Meliloti VE 26 (★) et des mutants isolés : ché (▲), mob<sup>-</sup> (•) et fla<sup>-</sup> (∇, ○) en fonction de la température (durée de l'essai : 60 minutes).

BUS  
LILLE

Les exsudats des plantules âgées d'une semaine n'ont aucune influence sur la migration des mutants bien que leur croissance y soit normale.

Les différences de migration et de croissance de la souche V e 26 et des mutants, sur les exsudats de racine de plantules âgées d'une semaine et de 24 heures pourraient être expliquées par une toxicité des exsudats des grains en germination. En effet les graines en germination peuvent inhiber le développement des graines voisines, et ceci même pour des graines de même espèce (91). THOMPSON (102) a montré dans les exsudats racinaires, des antibiotiques contre les bactéries à Gram positif. Plus récemment HALE (49) a constaté un effet toxique des exsudats de racines de trèfle sur *Rhizobium trifolii*. Ce qui confirme les présomptions de BOWEN (26).

## 2 - Etude de la migration en capillaire

Cette technique nous a permis de préciser les résultats obtenu en milieu semi-solide.

### a - Influence de la température

Nous avons essayé de déterminer l'effet de la température sur la mobilité d'après le nombre de bactéries pénétrant dans le capillaire dans les conditions proche de l'isotropie. Le capillaire "essai" contenant le milieu TY/100° et le capillaire témoin le tampon CW.

Les résultats obtenus sont consignés dans le graphique de la figure ( 15 a ).

L'effet de l'augmentation de température sur les mutants non mobiles est peu marquée. Le nombre de bactérie par capillaire augmente légèrement avec la température : de 100 bactéries à 20° il passe à 500 bactéries à 35° C.

.../...

Pour le mutant non chimiotactique l'effet est plus marqué avec un optimum à 35° C de 3000 bactéries par capillaire.

L'augmentation du nombre de bactéries par capillaire est plus nette avec la souche *Ve 26* mobile : de  $5 \cdot 10^2$  bactéries capillaire. à 20° C il passe à  $2 \cdot 10^4$  bactéries par capillaire à 35° C.

Selon ADLER (4) et KUSHLAND (61) l'augmentation du nombre de bactéries non mobiles dans les capillaires avec la température pourrait être expliquée par une meilleure dispersion des particules microscopiques solides que sont les bactéries. L'agitation Brownienne augmente avec la température les bactéries diffusent mieux dans cette zone de température 53° C et 40° C.

Pour le cas des bactéries mobiles et non chimiotactiques, qui se meuvent par "autopropulsion", l'activité enzymatique est optimum à 30 et 35° C (4) ; (61) ce qui expliquerait l'optimum de pénétration des bactéries dans les capillaires à ces températures.

b - Accumulation des bactéries dans un capillaire en fonction du temps.

Nous avons établi une cinétique d'accumulation des bactéries dans les capillaires pendant 90 min à 30° C en appréciant le nombre de bactérie ayant pénétré dans des capillaires contenant le même milieu que celui qui a servi à la suspension des bactéries.

Les résultats obtenus nous ont servi à établir les graphiques de la figure 15b.

Pour les mutants non mobiles le nombre de bactéries par capillaire augmente légèrement avec le temps : de 100 bactéries par capillaire à 30 min il passe à 300 bactéries au bout d'une heure.



Après 30 min d'expérience le nombre de bactéries non chimiotactiques par capillaire est de  $3.10^3$  et celui des bactéries mobiles est de  $2.10^4$ .

L'allure des courbes pour le mutant ( $c'h^m$ ) et la souche Ve 26 mobile, ne sont pas linéaires. Le mutant présente une pénétration rapide pendant les 15 premières minutes, elle se ralentit ensuite, pour la souche Ve 26 mobile après une augmentation rapide, le nombre de bactéries par capillaire reste approximativement constant puis baisse ensuite.

La légère augmentation du nombre de bactéries non mobiles dans les capillaires pourrait être simplement due à une accumulation passive par simple diffusion ADLER (3).

L'accumulation des bactéries dans les capillaires résultent de flux d'entrée et de sortie. En début d'expérience, les capillaires étant vides de bactéries l'influx est plus marqué. La pénétration est ensuite ralentie avec l'augmentation de la densité bactérienne dans le capillaire. A partir d'un certain seuil il y a autant de bactéries qui entrent et qui sortent (ce qui correspond aux paliers sur les graphiques (34)).

La diminution du nombre de bactéries par capillaire dans le cas de la souche Ve 26 mobile, entre 75 et 90 min, est due probablement à une sortie des bactéries, le milieu dans le capillaire étant devenu moins riche (4) ; (34).

#### c - Influence des exsudats racinaires sur la migration

Cette expérience a été réalisée à 30° C pendant une heure avec les capillaires témoins contenant du milieu de NT (ayant servi à la récupération des exsudats racinaires).

Pour montrer l'action des exsudats racinaires, nous avons considéré le rapport  $N/N^0$ , N étant le nombre de bactéries ayant été attirée par les diverses dilutions des exsudats et  $N^0$  le nombre de cellules ayant pénétré dans les capillaires témoins.

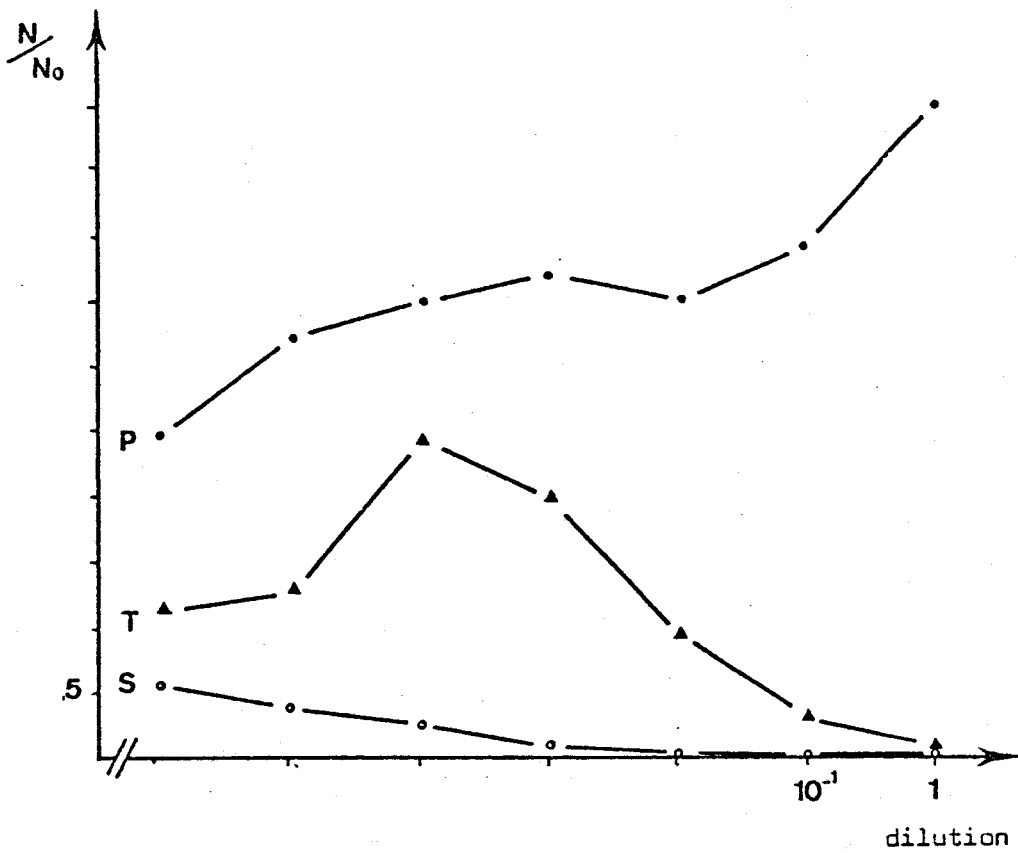


FIGURE 16a Etude de la réponse chimiotactique par migration en capillaire de *R. Mèliloti* Ve 26 en présence d'exsudats de racines de plantules (•), de graine en germination (○) et du milieu TY (▲) à divers dilution.

N : nombre de bactéries par capillaire test ;  
 N° : nombre de bactéries par capillaire témoin  
 (essai réalisé à 30° c durant 1 heure).

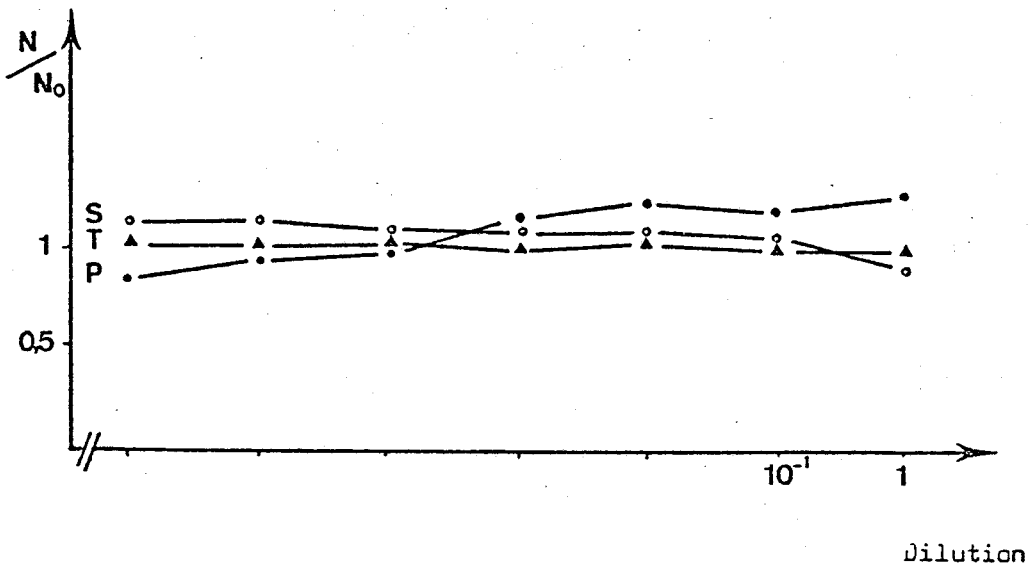


FIGURE 16b Même étude que A pour le mutant non chimiotactique Ve 26 (ché).



Nous avons utilisé comme pour les expériences de migration en milieu semi-solide, les exsudats de semis âgés de 24 heures et de plantules âgées d'une semaine ceci à différentes dilutions.

Le rapport  $N/N^0$  étant très proche de 1, les mutants isolés ne montrent aucune réaction vis à vis des exsudats racinaires. A titre d'exemple nous avons représenté les résultats du mutant (ché) sur la figure 16b. On note une légère pénétration des bactéries dans les capillaires contenant des exsudats de plantules et une pénétration moins importante dans ceux contenant du milieu TY ou des exsudats de semis âgés de 24 heures.

Le cas de la souche Ve 26 mobile est représenté sur la figure 16a. Le rapport  $N/N^0$  atteint ses plus grandes valeurs dans le cas des exsudats de plantules (d'une semaine) aux faibles dilutions. à la dilution  $10^{-7}$   $N/N^0$  est égale à 25, à la dilution  $10^{-4}$  il est de 40. Pour le milieu TY le rapport  $N/N^0$  présente un optimum aux dilutions  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ , entre 20 et 24. Pour les exsudats de semis  $N/N^0$  est de 5 à la dilution  $10^{-1}$  et il est égale à 1 aux faibles dilutions ( $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ ).

De cette expérience on peut conclure que les exsudats racinaires de luzerne n'ont pratiquement pas d'action sur la mobilité des mutants isolés.

La souche Ve 26 mobile présente un chimiotactisme positif net envers les exsudats de plantules âgées d'une semaine. Par contre elle n'a pas de réponse chimiotactique vis à vis des exsudats de semis.

Cette absence de migration vers les exsudats de racines de semis peut s'expliquer par la toxicité signalée par BOWEN (26). Cette toxicité bien que faible selon THOMPSON (102) serait suffisante pour amener les agronomes à abandonner l'inoculation des graines de légumineuses par des suspensions de Rhizobium avant de les semer.

Le milieu TY, bien que très riche en éléments nutritifs attire moins les bactéries que les exsudats de plantules. Les extraits de levures contenu dans le milieu TY pourraient inhiber la mobilité chez Rhizobium selon NAPOLI (8). D'autre part les exsudats de plantules contiendraient des effecteurs chimiotactiques qui attirent R. Mèliloti (36).

### 3 - Étude microscopique de l'appareil flagellaire

Cette étude a été conduite pour mettre en évidence l'appareil flagellaire et les différences éventuelles pouvant exister entre les mutants isolés et la souche Ve 26 par des techniques de coloration.

#### a - en microscopie photonique

le mode de coloration adopté est celui de KIKAKA (51) utilisant un mordant peu drastique. Cette technique, comprenant un minimum de manipulations, préserve bien des flagelles.

La ciliature de la souche Ve 26 apparaît de type péritriche, le nombre des flagelles est variable et leur longueur peut atteindre 6 à 7 fois la longueur de la bactérie.

Parmi les mutants isolés deux ne sont pas flagellés, un est à flagellation péritriche, le 4ème a un flagelle polaire droit.

Les deux premiers sont des mutants fla<sup>-</sup>, des deux derniers mob<sup>-</sup>.

b - En microscopie électronique

En microscopie électronique nous avons utilisé la technique de coloration négative à l'acide phosphotungstique (P.T.A.) à 0,5 % et à PH = 7

Le type de flagelle péritriches de la souche Ve 26 et de l'un des mutants ( $mob^-$ ) est confirmée en microscopie électronique. Le nombre de flagelles est en moyenne de 5, leur insertion se fait au niveau d'un point dense aux électrons situé à la base du flagelle juste sous la membrane. Les flagelles étalés dessinent une sinusoïde qui indique une configuration en hélice. Au grossissement 100.000, le filament flagellaire apparaît constitué de bruns enroulés autour d'un axe central qui apparaît clair. Le flagelle pourrait être de forme tubulaire.

Entre les mutants  $fla^-$  nous n'avons noté aucune différence de structure.

Le mutant  $mob^-$  à un flagelle droit, n'a probablement pas la forme d'une hélice rigide. Au grossissement 100.000, le filament flagellaire montre une structure différente de celle des flagelles de la souche Ve 26 mobile.

Les flagelles de Rhizobium sont similaires à ceux d'autres bactéries, telle E. COLI et S. Typhimurium selon IINO, (55) et SLEYTR, (98) ils sont constitués de 3 bruns, polymères de flagelline, qui s'enroulent en un cylindre flexible dont l'axe forme une hélice (34, 55, 94, 98).

.../...

Le flagelle de Rhizobium est de type complexe (46). Selon SCHMITT (94) ce type de flagelle diffère du modèle commun dit "plan" par sa structure fine, sa consistance et sa fragilité marquée".

La conformation en hélice rigide permet une nage plus rapide que les flagelles "plan".

*Des essais d'isolement des flagelles en gradient de chlorure de cesium, nous ont permis d'obtenir, pour le mutant mob<sup>-</sup> qui n'a qu'un flagelle, une bande de densité relative comprise entre 1,31 et 1,32 ; pour la souche Ve 26 mobile, une bande de densité relative comprise entre 1,33 et 1,34.*

		Mutants isolés			
souche	VE 26	ché	mob <sup>-</sup>	fla <sup>-</sup> 1	fla <sup>-</sup> 2
bact / tube	mobile				
5.10 <sup>6</sup>	6,7	6,3	6,6	6,2	7,4
5.10 <sup>4</sup>	6,3	6,7	6,3	7,2	6,1
5.10 <sup>2</sup>	6,4	6,6	6,0	6,5	6,8

TABLEAU 3 : influence de la concentration bactérienne inoculée à des plantuls de luzerne - cultivés en milieu liquide, sur le nombre de nodules obtenus.

## II - ETUDE DE L'INFECTIVITE DES MUTANTS ISOLES EN MILIEU LIQUIDE

### 1 . Influence du nombre de bactéries dans l'inoculum sur la nodulation.

Nous avons réalisé cette expérience pour déterminer le nombre de nodules en fonction de la concentration de l'inoculum en bactérie. Afin de montrer les différences éventuelles dans l'infektivité de la souche *Va 26* mobile et des mutants isolés.

Des plantules de luzerne en culture aseptique sont inoculées avec des suspensions de culture bactérienne en phase exponentielle de façon à obtenir  $5.10^7$ ,  $5.10^4$  et  $5.10^6$  bactéries par tube contenant 12 ml de milieu N.T.

Le tableau 3 montre l'influence de la concentration bactérienne inoculées à des plantules de luzerne cultivées en milieu liquide, sur le nombre de nodules obtenus.

Les différentes concentrations ont donné le même nombre de nodules après 6 semaines en conditions de serre (16 heures d'éclairement par jour, 70 à 80 % d'humidité et 25° C). Les premiers nodules sont apparus entre le 9ème et le 11ème jours après inoculation. Les nombre de nodules provoqués par la souche *Va 26* mobile et les mutants non mobiles et non chimiotactiques sont très voisins.

La concentration en bactéries, la mobilité et le chimiotactisme, n'ont apparemment aucune influence dans nos conditions expérimentales, sur le nombre de nodules apparus.

La mobilité confère à la souche *Va 26* mobile, la possibilité de se disperser davantage et plus rapidement dans le milieu. Cet avantage ne permet pas de faire la différence en milieu liquide.

.../...



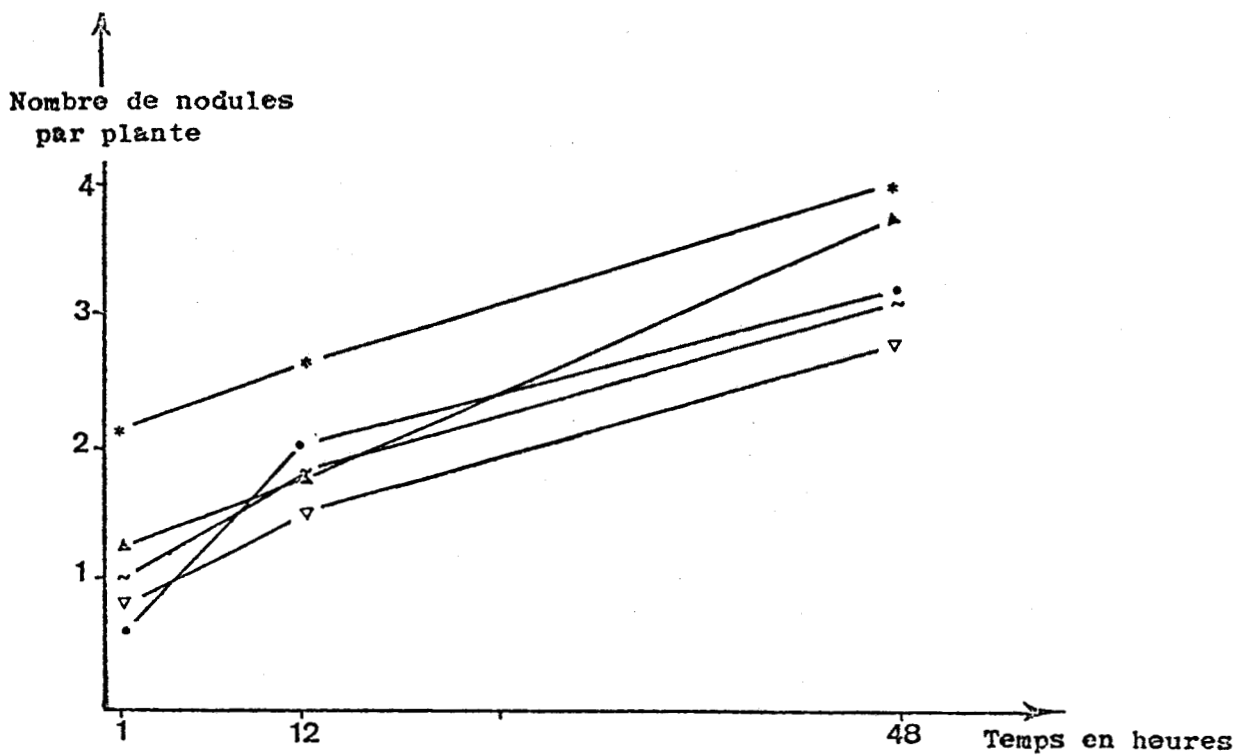


FIGURE 17 : Evolution cinétique de l'infectivité en milieu liquide de la souche R.meliloti Ve26 (\*), du mutant  $che^-$  (•) et des mutants non mobiles (▲, ×, ▽) en fonction du temps de contact bactéries -plante .



En milieu liquide il n'y a aucune contrainte permettant de différencier le pouvoir infectueux des mutants non mobiles et non chimiotactique et de la souche V<sub>E</sub> 26 mobile.

OLIVARES (83) signale n'avoir obtenu aucune différence significative dans le nombre des nodules formés, même si le rapport des concentrations des inoculats est de 1000.

Ce phénomène s'explique par le fait qu'en présence de la plante l'inoculum, aussi réduit soit-il, se développe pour atteindre une densité de  $10^7$  bactéries par millilitre après 2 à 3 jours. (14,87). Par contre l'apparition des sites de fixation au niveau des racines apparaissent au fur et à mesure du développement de la plante (21,22,42). Leur nombre est un facteur limitant.

BHAGWAT (21) a montré également qu'une souche sauvage du groupe cowpea pouvait infecter la racine deux heures et demi après l'inoculation tandis que d'autres n'infectaient la plantule hôte que 7 heures après l'inoculation.

Selon OLIVARES (83) l'infectivité des souches peut-être étudiée par l'addition de tétracycline dans le milieu de culture des plantules à des temps variables après l'inoculation. Les bactéries n'ayant pas pénétré dans la racine sont inhibés par l'antibiotique. Ainsi le pouvoir infectant d'une souche peut-être apprécié par la rapidité avec laquelle cette souche pénètre dans le poil racinaire.

Nous avons essayé ce mode expérimental dans le but de différencier entre la nodulation de la souche V<sub>E</sub> 26 mobile et des mutants non mobiles et non chimiotactiques.

La figure 17 montre l'évolution du nombre de nodules par plante, en fonction du temps où les bactéries sont restées en présence de racines sans antibiotique.

Il y a une augmentation du nombre de nodules avec le temps. Plus on retarde l'addition de la tétracycline plus il y a de nodules formé. Aussi bien pour la souche Ve 26 mobile que les mutants. Dans le cas où l'antibiotique est ajouté après une heure la souche Ve 26 forme 2 nodules par plante et les mutants forment en moyenne 1 nodule par plante. Quand on ajoute la tétracycline 48 heures après l'inoculation il se forme en moyenne 3 à 4 nodules par plante dans tous les cas.

Il n'y a pratiquement aucune différence d'infectivité en milieu liquide entre la Ve 26 mobile et les mutants non mobiles et non chimiotactiques, que la tetracycline soit ajoutée après 48 heures ou pas ajoutée du tout.

Pour essayer de montrer une éventuelle différence existant entre la souche Ve 26 et ses mutants nous allons considérer le coefficient d'infectivité établi par OLIVARES (83).

### 3 . Coefficient d'infectivité et son évolution en fonction du temps.

Selon OLIVARES (83) le coefficient d'infectivité (C.I.) est défini comme étant le rapport du nombre de nodules formés après addition de la tetracycline (N<sub>tc</sub>) et ceux formés sans addition de tetracycline (N).

$$C I = \frac{N_{tc}}{N} \times 100$$

Des plantules de luzerne âgées de deux semaines ont été inoculées avec  $10^3$  cellule par ml de la souche Ve 26 mobile et de mutants (ch<sup>-</sup>, mob<sup>-</sup>, fla<sup>-</sup>). Des doses de tetracycline donnant une concentration finale de 10 ug/ml sont ajoutées 1h, 12h, et 48h après l'inoculation des plantules.

.../...

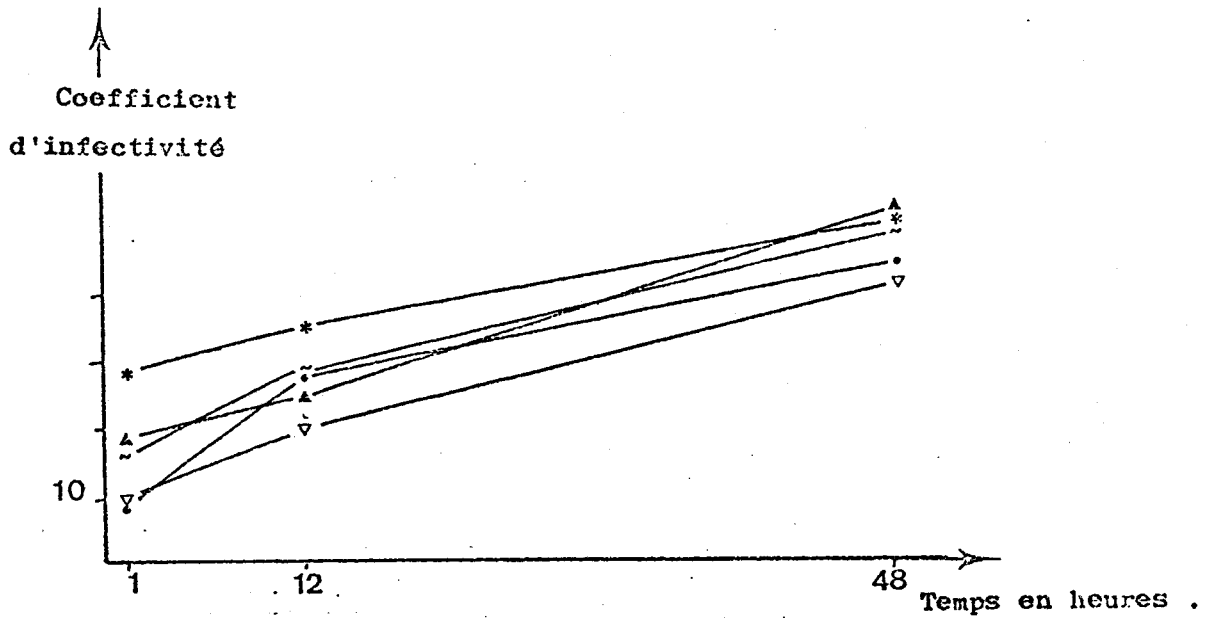


FIGURE 18 : Influence du temps de contact bactéries - plante sur la compétitivité , en milieu liquide , de la souche *R.melliloti* Ve26 (\*), du mutant *che<sup>-</sup>* (.) et des mutants non mobiles ( $\wedge$ ,  $\sim$ ,  $\nabla$ ). La compétitivité est estimée par le coefficient d'infectivité ( CI ) d'OLIVARES ( ).

CI =  $\frac{\text{Nombre de nodules formés sans Tc.}}{\text{Nombre de nodules formés avec Tc.}}$

Nombre de nodules formés avec Tc.

Tc: Tetracycline

		Mutants isolés				
		VE 26 sauvage	ché	mob <sup>-</sup>	fla <sup>-</sup> 1	fla <sup>-</sup> 2
souche + TC a	1 H	28	18	8	16	10
	68 H	52	54	45	43	50

TABLEAU 4 : Valeurs du coefficient d'infectivité pour 1 H et 48 h en milieu liquide pour la souche *R. Meliloti* VE 26 et les mutants isolés.

Des séries témoins sont préparés :

Une série de plantules inoculées et sans tetracycline

Une série de plantules non inoculées et sans tetracycline

Une série de plantules non inoculées et avec tetracycline.

Les nodules apparus est comptés 6 semaines après inoculation l'effet de la tetracycline sur les plantules est nulle.

L'age de plantules a été fixé à deux semaines afin d'avoir un système racinaire suffisamment développé pour que le nombre de sites d'infection disponible soit maximal (22,42).

Les résultats obtenus sont rapportés dans la figure 16, et le tableau 4

Nous avons indiqué dans le tableau 3 le coefficient d'infectivité correspondant à 1 h et 48 h -temps au bout desquels nous avons ajouté TC-.

le graphique 18 montre l'évolution en fonction du temps du coefficient d'infection pour la souche  $V_e 26$  mobile et le mutant ( $che_{mob}^-$ ,  $fla^-$ ).

Une nette différence entre la souche  $V_e 26$  mobile et les mutants isolés ( $mob^-$ ,  $fla^-$ , et  $ché$ ) n'apparaît que dans le cas où la tetracycline est additionnée une heure après l'inoculation. Plus longtemps nous laissons les bactéries en présence des plantules sans tetracycline, plus les coefficients d'infectivité respectifs (de la  $V_e 26$  mobile et des mutants) se rapprochent d'une même valeur. Dans le cas de 48 h il est compris entre 43 et 54 ; dans le cas de 1 h il est compris entre 8 et 28.

Dans le cas où la tetracycline n'est pas ajoutée les nombres de nodules formés par la souche sauvage et les mutants sont approximativement les mêmes.

Le graphique de la figure 18 montre bien une augmentation des coefficients d'infectivité avec le temps aussi bien pour la souche Ve 26 mobile que pour le mutant non chimiotactique (ché) et les mutants non mobiles (mob<sup>-</sup>, fla<sup>-</sup>).

L'étude du coefficient d'infectivité en milieu liquide ne nous a pas permis de montrer le rôle de la mobilité et du chimiotactisme dans la modulation (n'ayant pu montrer une différence entre la souche sauvage mobile Ve 26 et 4 mutants ché, fla<sup>-</sup> et mob<sup>-</sup>).

Nous avons montré avec cette série d'expérience, portant sur l'infectivité des mutants isolés en milieu liquide, qu'il n'y avait pratiquement pas de différence appréciable de compétitivité entre des bactéries mobiles et chimiotactiques (souche Ve 26 sauvage) et celle des mutants non mobiles (Ve 26 mob<sup>-</sup> et Ve 26 fla<sup>-</sup>) et non chimiotactique (ché) pourtant il est souvent admis que le rôle de la mobilité et du chimiotactisme n'est pas négligeable dans la compétition pour coloniser la rhizosphère et la surface racinaire, des bactéries. (31,32).

En culture de luzerne in vitro que ce soit en milieu liquide ou en substrat solide les inoculats, sous forme de suspensions liquides, sont déposés au pied des plantules (53, 75, 80) : ainsi il n'est mis en évidence que le pouvoir infectueux des souches mais non leur aptitude à migrer vers la racine. Les études de compétitivité sont de ce fait incomplètes.

Pour mieux montrer le rôle joué par la mobilité et le chimiotactisme dans la compétitivité de Rhizobium pour la modulation. Nous avons conçu une "mini-serre" permettant une inoculation des plantules à distance.

OLIVARES (83) assimile le coefficient d'infectivité à un coefficient de compétitivité (qui est déterminé en inoculant une plante par un mélange de deux souches).

L'étude de ces deux coefficients en substrat solide devrait certainement en utilisant notre "mini-serre", donner des résultats expérimentaux plus intéressants.

### III ETUDE DE L'INFECTIVITE ET DE LA COMPETITIVITE DES MUTANTS ISOLÉS, EN SUBSTRAT SOLIDE

#### 1 - Mise au point de la culture en serre sur substrat solide

Pour la culture aseptique des graines de légumineuses, les techniques varient avec les espèces considérées et le type d'étude envisagées.

Dans le cas des légumineuses à petites graines, la technique indiquée dans matériel et méthodes utilisant des tubes 20 x 200 (figure : 7 a) suffisent pour des tests de nodulation et d'efficacité.

Pour les légumineuses à grosses graines, la culture en condition aseptique, offre plus de difficultés en raison du volume que peut occuper la plante en plein développement.

Dans notre laboratoire, pour des cultures in vitro, les graines sont transférées sur une bande de papier Wattman n° 3 dans les tubes de grande dimension (fig 7b.). Les résultats obtenus ne sont pas toujours satisfaisants. Les plantes enfermées dans les tubes voient leur développement freiné et probablement leur pouvoir nodulant diminué ( 28,61).

Des essais de culture en condition semi aseptique ont donné de meilleurs résultats : La tige se développe à l'air libre et les racines plongent dans du milieu NF dans un Erlen Meyer (figure 7 c).

Malheureusement l'analyse statistique d'un phénomène par cette technique nécessiterait beaucoup de matériel.

a            b            c            d            e            f            g

PHOTOGRAPHIE N° 3 :

Culture de plantules de luzerne en substrats solides dans la "mini-serre".

— compartiments a et b : culture en sol ; mélange d'argile, de tourbe et de sable (dans les proportions respectives:  $2/5$ ,  $2/5$  et  $1/5$ ), stérilisé par autoclavage .

— compartiments c et d : culture en perlite.

— compartiments e et f : culture en vermiculite.

— compartiment g : culture en billes de verre.



PHOTOGRAPHIE N° 4 : Culture en perlite de diverses légumineuses dans la "mini-serre.

a

b

PHOTOGRAPHIE N° 5 :

Culture de la luzerne en perlite .

— a : plantules inoculées ; la flèche indique des nodules .

— b : plantules non inoculées ; on note le jaunissement des feuilles indiquant une carence en azote.

Pour pouvoir réaliser des essais avec un grand nombre de graines dans des conditions identiques, nous avons conçu une mini-serre (fig. 7 d) qui permet des cultures de légumineuses en substrat solide et avec des inoculation à distance.

Dans les premiers essais nous avons choisi comme substrats la vermiculite, la perlite, les billes de verre, de la terre (mélange : argile (2/5) + tourbe ( 2/5 ) + sable (1/5).

Le diamètre des grains de perlite et de vermiculites est compris entre 1 et 3 mm. Celui des billes de verre est de 2 mm.

Ces substrats sont lavé à l'eau distillée puis stérilisés à l'autoclave à 130° C pendant 30 mn deux fois.

La photographie 3 représente une culture de plantules de luzerne en milieu NT.

Le mélange tourbe, argile sable a été choisi dans les proportions 2/5. 2/5. 1/5. afin d'avoir une texture favorable à la culture en serre (40). Ce substrat n'a pas permis le développement des semis, l'autoclavage ayant certainement modifié sa structure. Comme le signalent BALKWILL (11) et PUNDER (82) pour des sols de forêt.

Dans les essais suivants de nodulation et de compétitivité nous avons utilisé la perlite dont les grains poreux retiennent bien l'humidité et ne se laissent pas traverser par les racines secondaires comme ceux de la vermiculite.

La photographie 4 montre diverses légumineuses en culture.

La photographie 5 montre des plantules de luzerne inoculées (a) et non inoculées (b).

## 2 - Test de nodulation et d'infectivité des mutants non mobiles et non chimiotactiques isolés

### a - Pouvoir nodulant en milieu solide

Les tests ont été réalisés dans la mini-serre (16 heures de lumière, 28° C, 80 % d'humidité et 18° C la nuit) Le substrat utilisé est la perlite stérilisé par autoclave, le milieu nutritif est celui de NICOL et THORNTON.

L'inoculum, en suspension dans le milieu NT, est mis dans les petites alvéoles à raison de 1 ml.

	A				B	C			
	+ TC à 20 h 30 h 60 h 90 h					o TC	Coeff. D'infectivité 20 h 30 h 60 h 90 h		
VE 26	1,1	2,3	13,5		15,5		7,1	14,8	22,5
Ché	0,3	7,0	7,0	3,0	15,1	1,9	4,6	4,6	19,8
Fla 1	0	0,2	0,4	2,1	15,3	/	1,3	2,6	13,7

TABLEAU 5 : Infectivité en milieu solide (grain de perlite)

A nombre de modules obtenu après addition de TC

B nombre de modules obtenu sans addition de TC

C. Coéfficient d'infectivité (CI = A/B x 100)



Un essai de nodulation de la souche Ve 26 mobile et des mutants non mobiles et non chimiotactiques avec un inoculum contenant  $10^8$  bactéries /ml, a donné dans tous les cas, après 8 semaines en condition de serre, une moyenne de 15 nodules par plante (tableau 5, colonne B).

Le pouvoir infectueux des mutants et celui de la souche mère est le même après 8 semaines en condition de serre. Si on ne considère que le nombre de nodules formés, l'inoculation en milieu solide ne permet pas de distinguer entre les bactéries mobiles et chimiotactiques et les bactéries non mobiles ou non chimiotactiques. Par simple diffusion les bactéries non mobiles atteignent les racines et montrent le même résultat après 8 semaine (7,83).

En considérant le coefficient d'infectivité on pourrait montrer le rôle de la mobilité et du chimiotactisme.

#### b - Étude du coefficient d'infectivité

L'étude du coefficient peut nous renseigner sur le temps nécessaire à la souche Ve 26 mobile et aux mutants pour atteindre et infecter les racines ; ce qui permettrait de déterminer le rôle de la mobilité des souches dans le sol pour l'infection des racines des légumineuses.

Cette expérience est conduite comme pour l'inoculation en tube. L'inoculation par une suspension bactérienne contenant  $10^8$  bactéries/ml est suivie, à des temps déterminés, par des additions de tetracycline (après 6 h, 20 h, 30 h, 60 h, et 90 heures. La solution d'antibiotique est ajoutée dans les alvéoles latérales qui avaient reçues précédemment les inoculat.

Nombre de  
module par  
plante

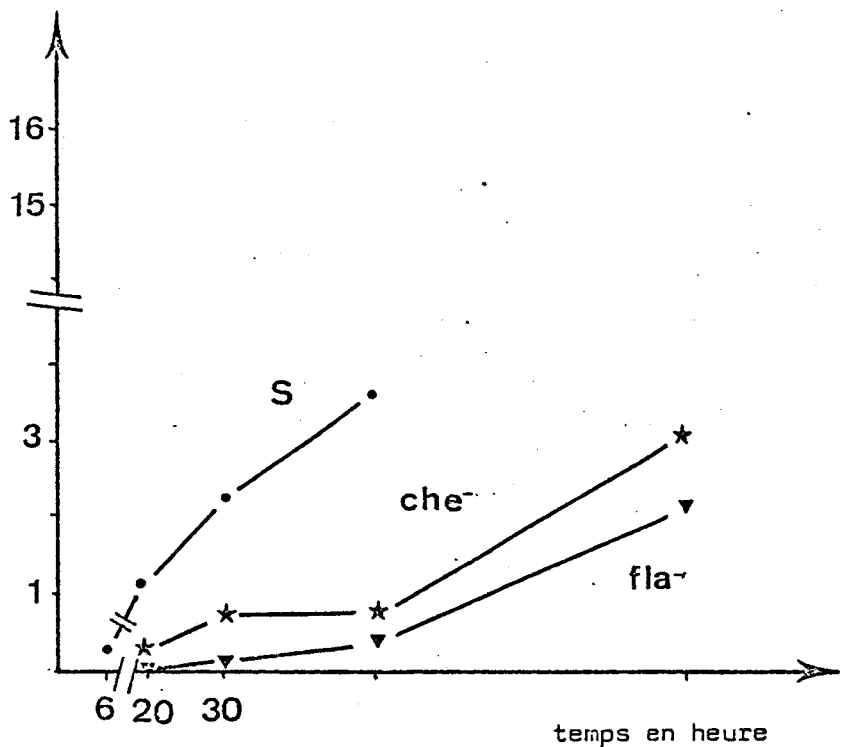


FIGURE 19 Evolution cinétique de l'infectivité en substrat solide (grains de pertite) de la souche R. Meliloti Va 26 (●), du mutant non chimiotactique (★) et du mutant non mobile (▼) en fonction du temps de contact bactéries - plante.



Nous avons réalisé cette expérience avec la souche sauvage et les mutants (ché) et (fla<sup>-</sup>). Les résultats obtenus nous ont permis de tracer le graphique de la figure 19. Le nombre moyen de nodules sur 10 plantes et les C.I. sont portés sur le tableau 5.

Seule la souche Ve 26 sauvage (mobile et chimiotactique) a formé des **nodules** quand on a rajouté la tetracycline 6 h après l'inoculation des plantules.

Pour le mutant non chimiotactique (ché) les racines sont infectées quand l'antibiotique est additionné 20 h après l'inoculation.

Pour le mutant non mobile (fla<sup>-</sup>) 30 h sans antibiotique sont nécessaire (pour qu'il infecte les racines).

Il est à noter aussi que plus longtemps on laisse évoluer les bactéries avec les racines sans antibiotique plus le nombre de nodules formés (par plante) est grand. Il est de 15 environ aussi bien pour la souche sauvage que pour les mutants si on n'ajoute pas de tetracycline (tableau 5 colonne B)

Le coefficients d'infectivité (tableau 5 partie C) de la souche mobile est de 14,8 dans le cas correspondant à 30 h. Pour le mutant non mobile (fla<sup>-</sup>) il n'est que de 1,3. Ce qui indique une migration plus rapide des bactéries mobiles de l'alvéole d'inoculation vers l'alvéole où sont mise les plantules. Pour le mutant non mobile (fla<sup>-</sup>) qui ne peut se déplacer que grâce à la diffusion, un temps de contact de 90 heures est nécessaire pour atteindre un coefficient d'infectivité (C.I.) de 13,7.

Le mutant (ché) légèrement mobile en milieu liquide mais non chimiotactique donne des valeurs intermédiaires.

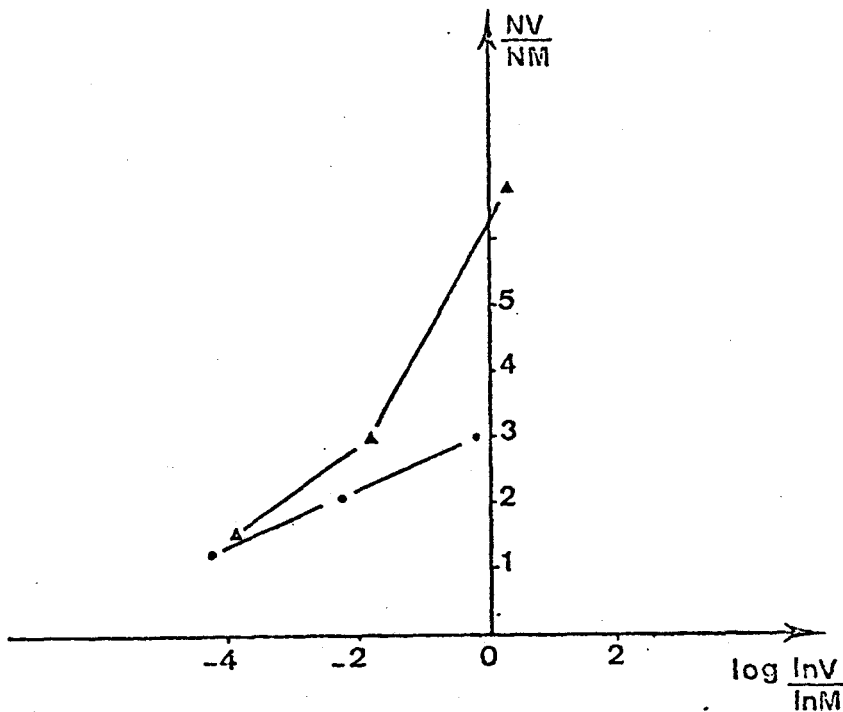


FIGURE 20 : Etude de la compétitivité , en milieu solide , entre la souche R.meliloti Ve26 et un mutant non mobile (•); et un mutant non chimiotactique (▲) .

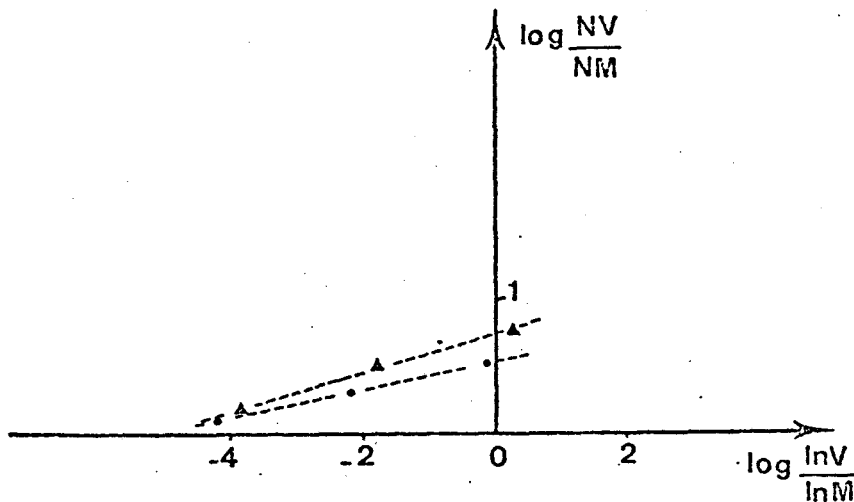


FIGURE 21 : Etude de la compétitivité , en milieu solide , entre la souche R.meliloti Ve26 et un mutant non mobile (•), et un mutant non chimiotactique (▲); selon l'équation de PINTO (38):

$$\log \frac{NV}{NM} = \log C + b \log \frac{InV}{InM}$$

Abréviations pour les figures 20 et 21 .

InV/InM: est le rapport dans chaque inoculum de la concentration de la souche Ve26 sur la concentration du mutant considéré .

NV/NM : est le rapport du nombre de nodules formés par la souche Ve26 divisé par le nombre de nodules formés par le mutant considéré .



Cette expérience nous renseigne sur la compétitivité des différents mutants par rapport à celle de la souche Ve 26 mobile. L'avantage de la mobilité et du chimiotactisme y est bien mis en évidence.

En réalisant une expérience sur un substrat solide, avec des doubles inoculations, nous pensons mettre mieux en évidence le rôle de la mobilité et du chimiotactisme dans la symbiose Rhizobium légumineuse.

C - Etude de compétitivité entre la souche Ve 26 mobile et les mutants (ché) et (fla<sup>-</sup>) en substrat solide.

Cette étude différente de celle menée au paragraphe précédent, est basée sur la détermination du nombre de nodules attribuables à chacune des souches inoculées conjointement à une même plante hôte.

Nous avons inoculé des plantules de luzerne avec la souche Ve 26 mobile mélangée avec le mutant non chimiotactique (ché) dans une première expérience et avec le mutant non flagéillé (fla<sup>-</sup>) dans une autre ; de plus pour chaque expérience les essais ont été réalisés avec des proportions variables.

Les résultats obtenus sont rapportés dans les figures 20 et 21.

Dans un premier temps nous avons considéré la relation entre le rapport des nombres de nodules formés par chaque type de bactérie et le rapport des concentrations de chaque bactérie dans l'inoculation (figure : 20).

A concentration égale, les bactéries mobiles forment 7 fois plus de nodules que celles non mobiles et 3 fois plus que celles non chimiotactiques.

Comme le montre la figure 21, nous avons considéré le logarithme du rapport des bactéries dans l'inoculum en fonction du logarithme du rapport des bactéries dans les nodules. Ce qui nous a permis de représenter l'équation de PINTO (68)



$$\log \frac{NV}{NM} = \log C + b \log \frac{InV}{InM}$$

avec NV = nombre de nodules formés par la souche Ve 26 mobile

NM = nombre de nodules formés par le mutant

InV = concentration de la souche Ve 26 dans l'inoculum

InM = concentration du mutant dans l'inoculum

Cette équation permet de déterminer l'indice de compétitivité (C) qui représente la nodulation obtenue quand les concentrations bactériennes sont équivalentes dans l'inoculum.

L'indice de compétitivité C est de 3,1 dans le cas du mélange : souche Ve 26 sauvage-mutant (ch $\bar{e}$ ). Il est de 6,3 dans le cas du mélange : souche Ve 26 sauvage-mutant (fla $\bar{a}$ )

C'est à dire que la souche Ve 26 (mobile est chimiotactique) est 3 fois plus compétitive que le mutant non chimiotactique (ch $\bar{e}$ ) et elle l'est 6 fois plus que le mutant non mobile (fla $\bar{a}$ ).

Sur la figure 21 nous voyons que la Ve 26 sauvage donne davantage de nodules que les mutants (ch $\bar{e}$ ) et (fla $\bar{a}$ ) même si elle est présente dans l'inoculum dans un rapport de 1 pour 10 000.

Le substrat étant constitué de grains de perlite, le film liquide intergranulaire permettrait un déplacement de 2 cm/jour aux bactéries mobiles (47) : ceci explique que le mutant non mobile forme le moins de nodules.

Cette expérience de compétitivité sur substrat solide nous a permis de montrer que la mobilité et le chimiotactisme peuvent être des facteurs limitants de la nodulation. Ce qui va dans le sens des travaux de AMES (7) et NAPOLI (8).

Des bactéries non mobiles ou non chimiotactique, même si elles sont à forte concentration, ne sont pas compétitives par rapport à une souche mobile : cela signifie que l'inoculation d'un champ par Rhizobium nécessiterait un faible nombre de bactéries si la souche choisie est mobile et chimiotactique.



#### IV ETUDE DE LA CO PETTIVITE EN SOL STERILISE

##### Préparation du sol

Pour se rapprocher des conditions naturelles nous avons essayé de faire une culture de luzerne dans un sol formé par un mélange de tourbe, d'argile et de sable dans les proportions respectives 2/5, 2/5 et 1/5. Les cons-tituants étant bien mélangés, le sol est stérilisé par un bain de  $\beta$  - propiolactone en solution dans l'eau distillée à 2 %.

L'essai est réalisé dans la mini-serre avec 16 heures, 80 % d'humidité, 28° C le jour et 18° C la nuit.

La photographie 6 montre une culture en soi et en perlite. La photographie 3 montre le cas du même sol auto-clavé.

Le type de sol que nous avons choisi est dit équilibré (40) il a une texture favorable à la circulation de l'air et de l'eau en condition de serre (106). La stérilisation à 100° C à l'autoclave provoque une compaction du sol, défavorables à la pénétration des racines. Par ailleurs BALKWILL (11) signale une forte adsorption des bactéries au sol stérilisé à l'autoclave. Et PENDER (89) a montré une modification dans la composition en éléments minéraux. Selon VINCENT (106) une stérilisation chimique conserve au sol sa structure. Nous avons choisi le  $\beta$  - propiolactone pour stériliser chimiquement le sol, car il n'altère pas sa structure et se décompose en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  à la température ambiante.

##### Préparation de l'inoculum

Nous avons sélectionné des mutants résistants à certains antibiotiques : le souche Ve 26 mobile résistante à la KANAMYCINE (508) et a l'ampicilline (758). Le mutant (ché) résistent à la tetracycline (108) a été préparé.

La concentration des inoculum utilisés est  $10^5$  bactéries/ml

	Nombre total étudiée	cas d'infection par R.M. VE 26	cas d'infection par mutant (ché)	cas d'in- fection mixte
nombre de modules	89	82	6	1
% Denodules	100	92,13	6,75	1,12

TABLERAU 6. Pourcentage de moduls formés par la souche Ve 26 Mobil. et chimotactique (R.M. Ve 26) et le mutant non chimiotactique (ché) lors d'une inoculation double de plantule de luzerne en culture dans un sol.



Nous avons inoculé des plantules de luzerne âgées de deux semaines la concentration finale des bactéries dans les alvéoles latérales (d'inoculation) et appréciée par numération :  $1,1 \cdot 10^6$  bactéries/ml pour la souche Ve 26 mobile et  $1,2 \cdot 10^6$  bactéries/ml pour le mutant (ché).

Nous avons utilisé la résistance aux antibiotiques pour caractériser l'origine des nodules (58), en plus des tests de mobilité sur milieu gélosé. Les antibiotiques ont été choisis en partie selon les études de KRÉMER (64) et SCHWINGHAMER (95).

La résistance aux antibiotiques n'a pas altéré les caractères de mobilité, de chimiotactisme et de nodulation propres à chaque bactérie.

Les résultats obtenus après 4 semaines en condition de serre sont représentés dans le tableau. La détermination des bactéries.

Nous avons dénombré les nodules après 4 semaines la détermination des bactéries infectantes a été réalisée, après écrasement des nodules par étalement des suspensions bactériennes obtenues sur milieu R.C. contenant  $10 \mu\text{g}$  de tetracycline et sur milieu KC contenant respectivement  $50 \mu\text{g}$  et  $75 \mu\text{g}$  de kanamycine et d'ampicilline. Pour confirmer l'origine des nodules la mobilité et le chimiotactisme sont appréciés.

Le tableau 6 montre les résultats obtenus d'après le test d'identification aux antibiotiques. Les 89 nodules étudiés ont été pris sur 17 plantules choisies au hasard.

Il y a 6 nodules infectés par des bactéries résistantes à la tetracycline, et non mobiles en milieu faiblement gélosé. Le mutant non chimiotactique n'a infecté que 6 nodules de 89 étudiés.

82 nodules sont provoquées par des bactéries résistantes à la Kanamycine et à la tetracycline et son mobile sur milieu faiblement gélosé. La souche Ve 26 mobile à donc infectée 92,1 % des nodules étudiés.

Pour un nombre de bactéries sensiblement identique ( $10^6$  bactéries/ml) le mutant non chimiotactique n'a formé que 6 % des nodules.

Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment en culture sur perlite.

L'avantage conféré aux bactéries par la mobilité et le chimiotactisme, apparaît plus nettement en culture en sol qu'en culture en milieu liquide ou en perlite.

Cette expérience a montré que les bactéries chimiotactiques forment plus de nodules que le mutant non chimiotactique. Les bactéries mobiles et chimiotactiques envahissent et peuplent plus rapidement la rhizosphère (27, 36, 44, 92). Elles atteignent les sites d'infections des racines plus tôt que les souches non chimiotactiques.

Le pourcentage de nodules formés par ces dernières est du à des rencontres au hasard entre la racine et des microcolonies (27).

L'une des dernières étapes de la compétitivité est la pénétration de la bactérie dans le site d'infection. NAPOLI (80) et AMES (7) ont montré que la réponse chimiotactique et la présence des flagelles n'ont probablement pas de rôle à jouer dans l'attachement et la pénétration de *Rhizobium* dans le poil racinaire. Récemment MCCLINA (78) a mis en évidence l'émission par *Rhizobium meliloté* d'enzyme pectolytiques au moment de l'infection du poil racinaire :

Une telle observation appuie l'hypothèse d'une pénétration active de *Rhizobium* dans le poil racinaire (dans certains cas).

.../...

Une souche très compétitive serait celle qui aurait à la fois un grand pouvoir d'infection, une grande mobilité et une forte réponse chimiotactique aux exsudats racinaires de la plante hôte (30).

DISCUSSION ET CONCLUSION

-----



DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans une première partie de notre travail, nous avons isolé des mutants non mobiles (mob<sup>-</sup> et fla<sup>-</sup>) et des mutants non chimiotactiques de la souche V<sup>e</sup> 26 de R. Meliloti mobile et chimiotactique. Nous avons pu montrer que les **exsudats** racinaires de jeunes plantules de luzerne ont une action chimiotactique positive sur la souche V<sup>e</sup> 26 et pas sur les mutants.

Les exsudats racinaires de graines de luzerne en germination ont une action inhibitrice de croissance à la fois sur la souche V<sup>e</sup> 26 et sur les mutants.

Dans la seconde partie nous avons montré que la mobilité et le chimiotactisme n'ont pas de rôle à jouer dans l'infection des poils racinaires de légumineuses.

Nous avons étudié aussi la compétitivité de la souche V<sup>e</sup> 26 mobile et chimiotactique par rapport au mutant non mobile et au mutant non chimiotactique isolés. Nous avons montré qu'en milieu liquide la mobilité et le chimiotactisme ont peu d'influence sur la compétitivité de Rhizobium pour la formation de nodules sur les racines de légumineuses alors qu'en substrat solide ces deux facteurs augmentent beaucoup la compétitivité des bactéries qui les possèdent.

L'inhibition de la croissance de Rhizobium par les exsudats de graines de luzerne en germination est due probablement au inhibiteurs de croissance relâchés par les graines lors du développement de l'embryon (26) ; (102).

.../...

Une toxicité sélective est signalé par VINCEN (106) : les exsudats de racines de certains légumineuses inhiberaient seulement les bactéries à gram(+). PASTERSON (74) et HALE (49) ont montré un faible taux de survie de Rhizobium sur les racines de graine en germination. De ce fait l'inoculation des semences des légumineuses par Rhizobium est peu efficace et peu économique. L'apport de Rhizobium au stade jeune plantule donnerait un meilleur rendement. D'autant plus que Rhizobium a une réponse chimiotactique positive en présence d'exsudats de racine de jeunes plantules de luzerne (36) (43).

Nous avons montré que cet effet attractif permet à des bactéries mobiles et chimiotactiques d'être plus compétitives que d'autres non mobiles ou non chimiotactiques.

NAPOLI (80) et AMES (7) bien qu'ayant montré que le chimiotactisme et la mobilité n'ont aucun rôle à jouer dans l'infection des poils racinaires, ils ont émis l'hypothèse qu'ils constitueraient un avantage pour la nodulation. La prolifération de Rhizobium dans la Rhizosphère de légumineuses est due en partie à une migration (82) ; (79). Nous avons montré que le nombre de nodules formés par une souche mobile peut être supérieur à celui formé par une souche non mobile, même si cette dernière est mille fois concentrée, à l'aide de cultures en substrat solide.

Il serait donc nécessaire, lors de la préparation d'"engrais bactériens" de choisir des souches mobiles et chimiotactiques, pour avoir une meilleure compétitivité et réduire la quantité de bactéries à apporter au sol.

BIBLIOGRAPHIE

-----

BIBLIOGRAPHIE  
=====

1 - ADLER J. , 1966.

Chemotaxis in Bacteria  
Science, 153, 708 -

2 - ADLER J. , 1969.

Chemoreceptors in Bacteria  
Science, 166, 1588 -

3 - ADLER J. , 1973.

A method for measuring chemotaxis and use of  
the method to determine optimum conditions for  
chemotaxis in E. coli

J. Gen. Microbiol, 7 (4), 77 -

4 - ADLER J. , 1975.

Chemotaxis in Bacteria  
Annu. Rev. Biochem. 44, 341

5 - ADLER J. , EPSTEIN W. , 1974

Phosphotransferase - system enzymes as chemore-  
ceptors for certain sugars in E. coli chemotaxis.

Prot. Natl Acad Sci. U.S , 71 (7), 2895 -

- 6 - ADLER J. ; HAZELBAUER G.L. ; DAHL M.M. , 1973

Chemotaxis toward sugars in E. coli  
J. Bacteriol , 115, (3), 824 -

- 7 - AMES P. ; BERGMAN K. 1981.

Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by Rhizobium meliloti.

J. Bacteriol ; 148, 728 -

- 8 - AMES P. ; SCHLUEDEBERG S.A. ; BERGMAN R. , 1980

Behavioral mutants of R. meliloti

J. Bactériol . , 141 (2),722 -

- 9 - ARMSTRONG J. B ; ADLER J. ; DAHL M.M. , 1967.

Non chemotactic mutants of E. coli

J. Bacteriol , 93 , 390 -

- 10 - ASWAD D. ; KOSHLAND D.E. J r, 1975

Evidence for an SA. Me requirement in the chemotactic behavior of S. typhimurium

J. Mol Biol, 97 (2),207-

- 11 - BALKWILL D.L. ; CASIDA L.E., 1979

Attachement to autoclaved soil of bacterial cells from pure. Cultures on soil isolates.

Appl. / environ. microbiol. 37 (2), 1031 -

12 - BARBER D.A. ; LYNCH J.M., 1977

Microbial growth in the rhizosphère

Soil Biology and biochemistry 9 , 305

13 - BECHET M. ; GUILLAUME J.B. 1978.

Mise en évidence d'A.D.N. extrachromosomique  
chez R. Meliloti

Can. J. Microbiol. 24 , 960

14 - BENNET R.A. ; LYNCH J.M. , 1981.

Colonization potentiel of bactéria in the  
rhizosphere.

Curr . Microbiol, 6 137-

15 - BERG H.C. , 1971

How to track bacteria

Rev sci. Instrum. ,42 , 868

16 - BERG H.C. , 1975.

Chemotaxis in bacteria

Annu . Rev . Biophys bioengng, 4, 119

17 - BERG H.C. ; ANDERSON R.A. , 1973

Bactéria swim by rotating their flagellar  
filaments.

Nature, 245 , 380-

.../...

- 18 - BERG H.C. ; BROWN D.A. , 1972

Chemotaxis in E. Coli analyzed by three dimensional tracking

- 21 - BHAGWAT A.A ; THOMAS J. 1982 :

Legume-Rhizobium interaction : cowpea-root

exudates elicit faster nodulation response by Rhizobia species

App. . 1 environ microbiol. 43 (3), 800 -

- 22 - BHUVANESWARI T.V. , PUEPQUE S.G. and BAUER W.D , 1980.

Localisation of infectible root cells  
Plant physiol 66 , 1027 -

- 23 - BLONDEAU R., 1977

La symbiose Rhizobium - légumineuse et les problèmes d'infectivité, d'efficacité et de spécificité d'hôte.

Ann. Biol, 16 , 481 -

- 24 - BOHLDOOL B.B. ; SCHMIDT E.L. , 1976

Immunofluorescent polar tips of R. japonicum  
possible site of attachment or lectin binding

J. Bacteriol , 125 , 1184 -

- 25 - BOON J.P. , 1975

Theoretical models for bacterial motion and chemotaxis

adv. Chem. Phys. , 29, 169 -

- 26 - BOWEN G.D. , 1961

The toxicity of legume seed diffusates toward Rhizobia and other bacteria

Plant and soil XV (2) , 155 -

27 - BOWRA B.J. DILWORTH M.J. , 1981

Motility and chemotaxis towards sugars  
in Rhizobium leguminosarum

J. Gen. microbiol. , 126 231 -

28 - BROCKWELL J. , 1963

Accuracy of a plant -infection technique for  
counting populations of Rhizobium trifolii

Appl. Microbiol, 11 , 377 -

29 - BROUGHTON W.J. ,1978

Control of specificity in legume - Rhizobium  
associations.

J. Appl Bacteriol , 45 , 164 -

30 - BURG D. , 1980

Aspect du comportement chimiotactique chez  
R. meliloti

Thèse de Doctorat de 3<sup>e</sup> cycle "Amélioration des  
production Vegetales et Microbiennes", U.S. T. Lille.

31 - CALDWELL B.E. 1969

Initial competition of root-nodule bacteria on  
soybeans in a field environment

Agron J. 61 , 813 -

32 - CARLILE M.J. 1980.

The role of motility, taxis and tropism in the life  
of microorganisms

In contemporary microbial ecology, P. 55  
Academic Press, London



33 - CHET - I ; MITCHELL. R. 1976

Ecological aspects of microbial chemotactic behavior

Ann. Rev. Microbiol ; 30, 221 - 239 -

34 - COLLINS A.L.T. and STOCKER B.A.D. 1976

Chemotaxis mutant of S: Typhimurium

J. bactériol 126 , 754 -

35 - CHOPRA I ; BALL P. , (1962).

transport of Antibiotics into bacteria

Adv microb physio 23 , 182 -

36 - CURRIER W.W. ; STROBEL G.A. , 1977

Chemotaxis of Rhizobium spp. To a glycoprotein produced by birds foot trefoil roots

Science, 196 , 434 - 436 -

37 - DATE R.A. ; BRUCKWELL J. , 1978.

Rhizobium strain competition and host interaction for nodulation

SCIRO, East Melbourne, Victoria ed

38 - DELATTRE J.M. , 1971

Introduction à une étude génétique du genre Rhizobium

Thèse de Docteur Ingénieur, U.S.T. LILLE

39 - DENARIE J. , 1982

Genetique du developpment des nodosites  
Fixatrices dans la symbiose Rhizobium - Legumineuses.

Colloque du 9 décembre . Inst - pastr. Paris.

40 - DUCHAUFOUR P. 1970

structure et texture du sol

In Precis de Pedologie, p 27 -

Ed. Masson et compagnie

41 - ENOMOTO M. 1965

.SLOW Mobile mutant in Salmonella byphimurium

J. Bactériol. , 90 , 1696 -

42 - FYSON A ; SPENT J.I , (1982)

The development of primary root nodule  
on vicia faba L. Growth at two 0°C

Ann. Bot 50, 681 -

43 - GAWCZWSKA. E.T. ; CARLLILE M.J. 1982

Positive chemotaxis of Rhizobium leguminosarium  
and other bacteria towards roots  
exudates from legumes and other plants.

J. Gen . Microbiol. 128, 1179

44 - GITTE R.R. ; RAI P.V. ; PATIL R.B. , 1978

Chemotaxis of Rhizobium spp. Towards root  
exudates of cicer arietinum

plant and SOIL , 50 , 553 -

45 - GOODMAN R.N. , 1982

The infection process.

Phytopath Prokaryote, 1 , 32 -

J. Mol. Biol, 2, 10 -

46 - GOTZ R. LIMMER W. ; OBLR K ; SCHMITTR. ; 1982

Motility and chemotaxis in two strains of  
Rhizobium with complex flagella.

47 - GRIFFIN D.M. ;QUAIL G. 1968

Movement of bacteria in moist particulate system

Aust. J. Biol. Sci. 21, 579 -

48 - GUEU V. , 1980

Le chimiotactisme chez R. meliloti : méthode  
d'étude en milieu gélifié.

Mémoire de DEA "Amélioration des productions  
végétales et Microbiennes" U.S.M. LILLÉ

.../...

49 - HALE C.N. ; MATHERS D.J. , 1976

Toxicity of white clover seed diffusate and its effect on the survival of Rhizobium trifolii

N.Z. J. Agricul - Res: 20 , 69 - .

50 - HARDARSON G. ; HEICHEL G.H. ; VANCE C.P. BARNES D.K. 1981

Evaluation of Alfalfa and R. mililotifor compatibility in nodulation and nodule effectiveness.

Crop. Science, 21 , 562 -

51 - HAZELBAUER G.L. , 1975 -

Maltose chemoreceptor of *E. coli*

J. Bacteriol ; 122 (1) 206 -

52 - HASELBAUER G.L. ; HARAYMA S. ; ENGSTROM P. , 1982

Special features of chemotaxis towards maltose.

Ann. Microbiol. 133 A , 191

53 - HUNTER W.J. , FAHRING C.J. 1980

Movement by *Rhizobium* and nodulation of légmes.

Soil. Biol. Biochem 12 537

54 - HUXLEY H.E. , ZUBAY G. 1960

Electron microscope particles from *E. coli*

J. molec Biol, 2, 10 -

55 - IINO T. , 1969

Genetics and chemistry of bacterial flagella

bacteriol. rev. , 33 , 454 -

56 - ISHIHARA A. ; YAMAGUCHE S. ; HOTANT H. 1981

Passive rotation of flagella on paralysed salmonella typhimurium (mot) mutants by external rotatory driving force

J. Bacteriol. , 145 , 1082 -

57 - JAHN T. L. ; BOVEE C.E. , 1965

Movement and locomotion of microorganisms

Ann. Rev. Microbiol, 19 , 21 -

58 - JOHNSTON A.W.B. ; BEYNON J.L. ; BUCHAN-WOLLASTON A.V. ;  
SETCHELL S.M. ; HIRSCH P.R. ; BERINGER J.F. , 197

High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of Rhizobium

Nature, 276 , 634 -

59 - KELLERMAN D ; SZNELCMAN S. 1974

Active transport of maltose in E. coli involument of a periplasmic maltose proteine.

Eur. J. Bioche 47 ,139 -

60 - KODAKA H. ; YARMFIELD A. ; LOMBARD G.L. ; DOWELL V.R. JM 1982

Practical procedure for demonstrating bacterial Placella.

J. Climinal Microbiol. , 16 (5) , 948 -

61 - KOSHLAND D.E. J.R. , 1974

Chemotaxis as a model for sensory systems

F.E.B.S. Letters, 40 (suppl) , 3 -

62 - KOSHLAND D.E. , 1981

Bacterial chemotaxis

The bacteria ; VI<sup>r</sup>, A treatise of structure  
and function, 111 -

63 - KOSHLAND D.E. , 1982

Special topic : chemotaxis and Motility

Ann. Rev. Physio. 44 , 501 -

64 - KREMER R. J. ; PETERSON L. ; 1982

Nodulation efficiency of legume nodulation as déter-  
mined by intrinsic antibiotic resistance.

App environ. Microbiol , 43 , .636 -

.../...

65 - LAIRD D.J. , 1932

Bactériophage and the root nodule bacteria

Arch. Microbiol. , 3 , 159 -

66 - LAUFFENBURGER D. , 1982

Effect of cell Motility and chemotaxis on microbial population growth.

Bio phy s. J. , 40 , 209 -

67 - LEIFSEN E. , 1960

Atlas of bacterial flagellation

Academic Press - New York - 171 pp

68 - L JUNGREN H. et FABRAEUS G. 1961

The role of polygalacturonase en root hair invasion of leguminaus plant by Rhizobium spp.

J. Gen. Microbiol. , 26 , 521 -

69 - LOWY J. ; HANSON J. 1965

Electron microscope studies of bacterial flagella

J. Mol. Biol , 11 , 293 -

70 - MACNAB R.M. , 1978

Bacterial motility and chemotaxis : the molecule biology of a behavioral system

criti. Rev. in biochemistry , 5 (4) , 291 -

.../...

71 - MACNAB R.M. ; KOSHLAND D.E. Jr , 1972

The gradient - sensing mechanism in bacterial chemotaxis

Proc. Natl. Acad. Sc. U.S. , 69 (9) , 2509 -

72 - MACNAB R.M. ; MAN D.P. - 1983

Asynchronous switching of flagellar

Motors on a single BACTERIAL CELL

Cell 32 , 109 -

73 - MARUYAMA M. ; LODDERSTÆDT G. ; SCHMITT R. , 1978

Purification and biochemical properties of complex flagella isolated from Rhizobium lupini

H 13 - 3

Biochem. Biophys. Acta , 535 ; 110

74 - MASTERSON C.L. , 1965

Studies on the toxicity of legume seeds towards Rhizobium

Ann. Inst. Pastr. Paris 109 , 216 -

75 - MATERON L.A. , HAGEDORN C. 1982

Competitiveness of Rhizobium trifolii strains

Associated with red clover (trifolium pratense L.) in Missipi soils

App<sup>1</sup>. Environ. Microbiol. 44 (5), 1096 -



76 - MEGIAS M ; CAVCEJES M.A. ; PALOMARES J. ; PEREZ -SILVA J.

Use of plasmid R 68 - 45 for constructing a circular linkage map of the Rhizobium trifolii chromosome.

J. Bacteriol ; 149 ,59 -

77 - MESIBOV R. ; ADLER J. (1972)

Chemotaxies towards amino acids in E. coli

J. Bacteriol , 112 (1) , 315 -

78 - MOLINA E.M. ; OLIVARES J. ; 1982

A note on evidence for involvement of pectolytic enzymes in the infection process of Medicago sativa by Rhizobium meliloti

J. App bactériol, 52, 453 -

79 - MUNNS D.N. 1968

Nodulation of medicago sativa in solution culture

Plant soil ; 28 , 129 -

80 - NAPOLI C. ; ALBERSHEIM P. 1980

Infection and nodulation of clover by nonnotile R. Trifolii.

J. Bacteriol, 141 (2) 979 -

81 - NICOL L.H. ; THORNTON H.G. , 1941

Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host.

Proc Roy. soc , B 130 , 32 - 59 -

82 - NUTMAN P.S. 1952.

Host factors influencing infection and nodule development in leguminous plants.

Proc. Roy..Soc , B 139, 176 - 185 -

83 - OLIVARES J. ; CASADESUS J. ; BEDMAR E.J. , 1980

Method for testing degree of infectivity of Rhizobium meliloti strains.

App. Env . microbiol, 39 , 967 -

84 - ORDAL G.W. , 1977

Calcium in regulates chemotactic behaviour in bacteria

Nature, 270 (56 32) 66 -

85 - ORDAL G.W. , 1980

Bacterial chemotaxis ; a primitive sensory system

Bioscience , 30 , 408 -

86 - PETERSON H.L. LOYNACHAN T.E. , 1981

The significance and application of Rhizobia in  
agriculture

Intern. Review. of cytology sup. 13, 311

87 - PETIT JEAN F. 1982

Étude in vitro de la compétitivité de souches de  
R. Meliloti

DEA. université des sciences et technique de Lille

88 - PINTO C.M. , YAO P.Y. and VINCENT J.M. (1974)

Modulation of competitiveness amongst strains of  
Rhizobium meliloti and Rhizobium trifolii

Aust. J. Agric. Research. , 25 , 317 -

89 - PONDER Jr. F. (1981)

Influence of soil mixing on sterilisation on growth  
and nutrient uptake of black walnut seedling

Soil. Sci. Plant Anal. 12 (9) , 881 -

90 - RIDGWAY H.F. ; SILVERMAN M. ; SIMON M.I., 1977

Localisation of protéins controlling motility and  
chemotaxis en E. Coli.

J. Bactériol , 132 , 657 -

91 - ROVIRA A.D. 1956

Plant root excretions in relation to the rhizosphere  
effect.

Plant. Soil VII (2) , 72 -

92 - ROVIRA A.D. 1965

Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms.

Ecology of soil-borne Plant Pathogens

BARKER (K.F.), SNYDE (W.C.) ; Ed, 170 -

93 - ROVIRA A.D. 1969

Diffusion of carbene compounds away from wheat roots

Aust. J. Biol. Sci. 22 , 1287 -

94 - SCHMITT R. ; RASKA I. ; MAYLOR F. ; 1974

Plain and complex flagella of pseudomonas rhodos : analysis of fine structure and composition

J. Bacteriol. , 117 , 844 -

95 - SCHWINGHAMER E.A. ; 1964

Association between antibiotic resistance and infectiveness in mutant strains of Rhizobium spp.

Can. J. Microbiol , 10 , 221 -

96 - SHANTHARAM S. ; WONG P.P. ; 1982

Recognition of leguminous hosts by a promiscuous Rhizobium strain

App. Envir. Microbiol., 43 , 677 -

97 - SILVERMAN M. ; SIMON M.I. ; 1977

Bacterial flagella

Ann. Rev. Microbiol. , 31 , 397 -

.../...

98 - SLEYTR U.B. ; GLAUERT A.M. ; 1973

Evidence of an empty core in a bacterial flagellum

Nature, 241 , 23 -

99 - SUKATCH J.R. 1979

Roles of appendages and surface layers in adaptation  
of bacteria to their environment.

The bacteria , VII , Mechanisms of adaptation p. 229 -

100 - SPRINGER M.S. ; KORT E.N. ; LARSEN S.H. ; ORDAL G.W. ;  
READER R.W. ; ADLER J. ; 1975

Role of methionine in bacterial chemotaxis :  
Requirement for tumbling and involvement in infor-  
mation processing.

Proc. natl. acad. sci. U.S. 72 (11) , 4640 -

101 - SUSUKI T. ; KOMEDA Y. ; 1981

Incomplete flagellar structures in E. coli mutants

J. bacteriol 145 (2) , 1036 -

102 - THOMPSON J.A. , 1960

Inhibition of nodule bacteria by an antibiotic from  
legum seed coats

Nature 187 , 169 -

103 - TRUCHET G. , VASSE J. , 1982

Role des lectins dans les mécanismes de reconnaissance  
Rhizobium-legumineuses

S.F.M., Colloque du 12/82, Inst. Past. Paris

104 - STANG N; MACNAB R.M. ; BOSHLAND D.E.Jr ; 1973

Common mechanism for repellents and attractants in  
bactériol chemotaxis.

Science, 181 (4094) , 60 -

105 - ULKER D.S. ; SIGNER E.R. 1978

Catabolic repression like phenomenon with Rhizobium-  
meliloti

J. bacteriol. 136 (3) , -1197 -

106 - VINCENT J.M. 1970

A manual for the practical study of the root nodule  
bacteria : Method for green house and light room

in IBP Handbook n° 15 p. 75 .

ed Burgess and Son.

107 - WALT N D.A. ; MOSELEY B.E.B. ; 1981

Induced mutagenesis in Rhizobia

J. . Gen. Microbiol 124 , 191-

108 - WEIBULL C. ; 1960

Movement

In the bacteria, I, structure, p. 153 -

109 - WRIGHT W.H. , 1962

The nodule bacteria of soybeans

Soil sc. , 20 , 95 -

