

N° d'ordre : 334

50376  
1983  
271

50376  
1983  
271

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du

**DIPLOME DE DOCTEUR - INGENIEUR**

en

**Biologie et Physiologie Végétales**

«Amélioration et Transformation des Productions Végétales et Microbiennes»

par

Jean-Pierre FACON

**UN VECTEUR DE CLONAGE DERIVE D'UN PETIT  
PLASMIDE DE *RHIZOBIUM MELILOTI*  
CONSTRUCTION ET MOBILISATION VERS  
LES RHIZOBIACEES**



Soutenue le 6 décembre 1983 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :	MM.	J.	GUILLAUME	Président
		J.	KREMBEL	Rapporteur
		P.	GALZY	Examinateur
		G.	MARTIN	Examinateur
		J.C.	PAPOZ	Examinateur

## REMERCIEMENTS

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille sous la direction de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME. Je lui suis reconnaissant d'avoir été le promoteur et l'animateur de ce qui est pour moi non seulement une formation par la recherche mais également une nouvelle ouverture sur le monde économique.*

*Je remercie vivement Monsieur le Professeur P. GALZY, de l'École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, pour sa participation à ce Jury de Thèse et pour l'orientation qu'il donna, par ses propositions constructives, à l'exploitation et l'interprétation de mes résultats.*

*Ma reconnaissance s'adresse également à Monsieur le Professeur J. KREMBEL, qui a bien voulu accepter la charge de rapporteur, Monsieur le Professeur G. MARTIN ainsi que Monsieur J.C. PAPOZ, Directeur Départemental de l'Agriculture du Nord, qui me font l'honneur de juger cette Thèse.*

*Je tiens à associer à ce travail, Monsieur M. BECHET du Laboratoire, Monsieur C. NIEL du Laboratoire de Virologie Moléculaire, Madame A. BEGUE et Monsieur P. MARTIN de l'Institut Pasteur de Lille, pour leur assistance technique et leurs conseils judicieux. Je ne saurai également oublier la contribution précieuse de tout le personnel du Laboratoire.*

*Que Mademoiselle M. DELECOURT, qui a assuré la dactylographie et l'élaboration de ce document avec combien de gentillesse et de compétence, soit assurée de toute ma gratitude.*

# TABLE DES MATIERES

	PAGES
INTRODUCTION	
L'évolution de l'information génétique .....	1
La manipulation de l'information génétique : une nouvelle évolution ? .....	1
LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE .....	4
Comprendre et copier la nature .....	4
Le travail des microorganismes .....	4
Recherche agronomique et microorganismes fixateurs : du travail pour les <i>Rhizobium</i> dans l'agriculture ....	5
A. - ANALYSE GENETIQUE DE LA SYMBIOSE .....	6
1 - Analyse génétique de la plante-hôte .....	7
2 - Analyse génétique de <i>Rhizobium</i> .....	7
a) Les plasmides de <i>Rhizobium</i> .....	8
b) Organisation génétique des gènes symbiotiques de <i>Rhizobium</i> .....	11
c) Expression des gènes symbiotiques bactériens .	15
d) Remarques .....	16
3 - Les outils génétiques d'analyse des gènes symbiotiques bactériens .....	17
a) Les plasmides à large spécificité d'hôte .....	17
b) Mutagénèse au transposon Tn5 .....	19
α) <u>Mutagénèse au hasard au Tn5</u> .....	19
β) <u>Mutagénèse dirigée au Tn5</u> .....	21
c) Plasmides vecteurs chez <i>Rhizobium</i> .....	22
α) <u>Les plasmides à large spécificité d'hôte : expériences de complémentation</u> .....	22
β) <u>Les vecteurs de clonage d'<i>E. coli</i> : expériences d'homogénéisation</u> .....	25
γ) <u>Les vecteurs hybrides : expériences de complémentation</u> .....	26

## MATERIEL ET METHODES

I. - SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES .....	27
A. - <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	27
B. - <i>RHIZOBIUM</i> .....	27
C. - <i>AGROBACTERIUM</i> .....	28
II. - PLASMIDES UTILISÉS .....	28
III. - MILIEUX DE CULTURE .....	29
IV. - PRÉPARATION PLASMIDIQUE .....	30
A. - PRINCIPE .....	30
1 - Amplification au chloramphénicol .....	30
2 - Lyse .....	30
3 - Purification de l'ADN plasmidique en gradient de CsCl/BrEtd .....	31
B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL .....	31
V. - LYSE DIRECTE SUR LE GEL .....	33
A. - PRINCIPE .....	33
B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL .....	34
VI. - PRÉPARATION RAPIDE D'ADN PLASMIDIQUE .....	35
A. - PRINCIPE .....	35
B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL .....	35
VII. - ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'AGAROSE .....	36
A. - PRINCIPE .....	36
B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL .....	38

VIII. - CROISEMENTS BACTÉRIENS .....	39
A. - PRINCIPE .....	39
B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL .....	40
IX. - ENZYMES DE RESTRICTION .....	41
A. - PRINCIPE .....	41
B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL .....	44
1 - Digestion enzymatique simple .....	44
2 - Doubles, triples digestions .....	47
X. - CLONAGE .....	47
A. - PRINCIPE .....	47
1 - Conditions de la réaction de ligature .....	49
2 - Inactivation d'un marqueur génétique par insertion .....	49
3 - Clonage directionnel .....	51
4 - Déphosphorylation du vecteur linéaire .....	53
B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL .....	55
1 - Conditions de la réaction de ligature .....	55
2 - Clonage directionnel .....	56
3 - Déphosphorylation .....	56
XI. - TRANSFORMATION BACTÉRIENNE .....	57
A. - PRINCIPE .....	57
B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL .....	59

## RESULTATS

I. - pRme 19a .....	61
A. - DETECTION .....	61
B. - ISOLEMENT .....	61

C. - CARTE DE RESTRICTION .....	62
II. - CLONAGE DU pRme 19a DANS LE pBR322 .....	66
III. - UNE RÉSISTANCE INATTENDUE .....	71
IV. - MOBILISATION DU pBRRM1 .....	72
A. - MOBILISATION VERS <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	73
B. - MOBILISATION VERS <i>RHIZOBIUM MELILOTI</i> M19S .....	74
C. - MOBILISATION VERS D'AUTRES ESPECES DE <i>RHIZOBIUM</i> ET VERS <i>AGROBACTERIUM</i> .....	77
V. - CARTE DE RESTRICTION DU pBRRM1 .....	80
VI. - RECHERCHE DES SITES UNIQUES DE CLONAGE DANS pBRRM1 .....	83
A. - LES SITES DE CLONAGE DU pBR322 .....	84
B. - LES SITES UNIQUES DE RESTRICTION DU pRme 19a .....	85
VII. - RECHERCHE DES FONCTIONS DE RÉPLICATION DU pRme 19a .....	89
A. - MUTANTS DE DELETION $\Delta 2B$ ET $\Delta G$ .....	91
B. - CLONAGE DIRECTIONNEL <i>ClaI</i> - <i>HindIII</i> du pBR322 dans pBRRM1 .....	91

## DISCUSSION

I. - SITES DE RESTRICTION DU pRme 19a .....	97
II. - MODIFICATIONS DU pBR322 .....	99
A. - MOBILISATION .....	100
B. - RESISTANCE A LA KANAMYCINE .....	102

III. - MODIFICATIONS DU pRme 19a .....	104
IV. - MOBILISATION VERS LES RHIZOBIACÉES : PROPRIÉTÉS D'UN PLASMIDE DE RHIZOBIUM MELILOTI .....	105
V. - pBRRM1, VECTEUR DE CLONAGE .....	107
CONCLUSION .....	109
RESUME .....	112
BIBLIOGRAPHIE .....	114

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

PAGES

## I. - FIGURES

Fig. 1 - INACTIVATION D'UN MARQUEUR GENETIQUE PAR INSERTION(1) .....	50
Fig. 2 - CLONAGE DIRECTIONNEL AUX SITES HindIII et BamHI du pBR322(1) .....	52
Fig. 3 - DEPHOSPHORYLATION DU VECTEUR LINEARISE(1) ....	54
Fig. 4 - CARTE DE RESTRICTION DE pRme 19a POUR LES ENDONUCLEASES BclI, ClaI ET SalI .....	65
Fig. 5 - CARTE DE RESTRICTION DU PLASMIDE pBRRM1 POUR LES ENDONUCLEASES BclI, ClaI ET SalI .....	82
Fig. 6 - CONSTRUCTION DES PLASMIDES pBRRM1 ET pBR::x - CARTE DE RESTRICTION DE pBRRM1 POUR LES ENDONUCLEASES BalI, BclI, ClaI, PstI, PvuII, SalI, SstII, XhoI .....	88
Fig. 7 - CONSTRUCTION DE DEUX MUTANTS DE DELETION DU PLASMIDE pBRRM1, $\Delta$ B ET $\Delta$ G .....	92
Fig. 8 - CLONAGE DIRECTIONNEL THEORIQUE DU pBR322 AUX SITES HindIII ET ClaI DU pBRRM1 .....	93
Fig. 9 - CLONAGE DIRECTIONNEL REEL DU pBR322 AUX SITES ClaI ET HindIII DU pBRRM1 .....	96

## II. - TABLEAUX

Tab. 1 - LOCALISATION ET ORGANISATION DES GENES SYMBIOTIQUES CHEZ <i>RHIZOBIUM</i> .....	12-13
Tab. 2 - PLASMIDES SUICIDES CHEZ <i>RHIZOBIUM</i> .....	20
Tab. 3 - VECTEURS DE GENES CHEZ <i>RHIZOBIUM</i> .....	23-24
Tab. 4 - MOBILISATION DES pRK290 ET pBRRM1 PAR LE pRK2013 VERS LES DEUX GENRES <i>RHIZOBIUM</i> ET <i>AGROBACTERIUM</i> DE LA FAMILLE DES RHIZOBIACEES ..	76
Tab. 5 - APPROCHE DE LA SEQUENCE DE L'ADN DU pRme 19a PAR LE BIAIS DES ENDONUCLEASES DE RESTRICTION.	98

---

(1) d'après MANIATIS *et al.* 1982

### III. - PHOTOGRAPHIES

Photo 1	- PROFILS DE RESTRICTION DES PLASMIDES pRme 19a ET pBRRM1 POUR LES ENDONUCLEASES BclI, ClaI ET SalI .....	63
Photo 2	- LYSE DIRECTE SUR LE GEL DE CLONES D'ESCHE- RICHIA COLI C600 RESISTANTS A L'AMPICILLINE ET SENSIBLES A LA TETRACYCLINE APRES TRANSFORMATION PAR LE MELANGE DE LIGATURE pRme 19a SalI/pBR322 SalI .....	68
Photo 3	- ANALYSE DU pBRRM1 ISOLE DE LA SOUCHE C600 D'ESCHERICHIA COLI .....	69
Photo 4	- LYSE DIRECTE SUR LE GEL DE CLONES DE RHIZO- BIUM MELILOTI M19S RESISTANTS A LA KANAMYCINE OU A LA TETRACYCLINE APRES MOBILISATION PAR pRK2013 RESPECTIVEMENT DES PLASMIDES pBRRM1 ET pRK290 .....	78
Photo 5	- MOBILISATION DE pBRRM1 PAR pRK2013 VERS LES GENRES RHIZOBIUM ET AGROBACTERIUM .....	79
Photo 6	- LOCALISATION DES SITES PstI DANS pBRRM1 ( <u>Dam</u> <sup>-</sup> ) PAR DOUBLES ET TRIPLES DIGESTIONS ...	86
Photos 7-8	- LOCALISATION DES SITES BaII ET PvuII DANS pBRRM1 .....	87
Photo 9	- LOCALISATION DU SITE DE COUPURE DE L'ENZYME SstII DANS pBRRM1 ( <u>Dam</u> <sup>-</sup> ) .....	90
Photo 10	- MUTANTS DE DELETIONS $\Delta$ 2B ET $\Delta$ G DU pBRRM1 - CLONAGE DIRECTIONNEL DE pBR322 DANS pBRRM1 .	95

*Les diagrammes, situés sous certaines photographies, ne sont qu'une représentation schématique de celles-ci. Les photos ont été agrandies et présentées de façon homogène. Les différences d'intensité dans les bandes ainsi que certaines digestions partielles ont été éliminées afin de faciliter l'interprétation.*

## GLOSSAIRE

### groupe d'incompatibilité (Inc)

Deux plasmides appartiennent au même groupe d'incompatibilité lorsqu'ils sont incompatibles et ne peuvent coexister de ce fait de manière stable dans une même bactérie en l'absence de pression de sélection pour les deux types plasmidiques.

### C-DNA

ADN bicaténaire synthétisé *in vitro* à partir d'un ARN (acide ribonucléique) messenger grâce à la transcriptase réverse et la DNA polymérase I.

### insert

Fragment d'ADN inséré *in vitro* dans un vecteur par les méthodes du génie génétique.

### spécificité d'hôte des *Rhizobium*

Les *Rhizobium* à spécificité d'hôte étroite n'interagissent qu'avec une seule espèce de légumineuse. Cette particularité est à la base de la définition des noms d'espèce dans le genre *Rhizobium* : *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. leguminosarum*, etc..

D'autres *Rhizobium*, à large spécificité d'hôte, sont capables d'établir des symbioses avec de nombreuses légumineuses différentes mais également, dans certains cas, avec d'autres plantes supérieures.

### clone

Colonie bactérienne provenant de la division d'une seule bactérie initiale.

### cryptique

Sans marqueur génétique identifié.

## ABREVIATIONS UTILISEES

EDTA : acide éthylène diamine Tétracétique

Tris : Tris Hydroxy-méthyl-aminométhane

SDS : sodium dodécyl sulfate

EEO : électroendosmose

tpm : tours par minute

qsp : quantité suffisante pour

$\mu$ l : microlitre ( $10^{-6}$  litre)

ml : millilitre ( $10^{-3}$  litre)

mM : millimolaire ( $10^{-3}$  M)

pmole : picomole ( $10^{-12}$  mole)

DTT : dithiothréitol

nm : nanomètre ( $10^{-9}$  mètre)

C600 : souche C600 d'*Escherichia coli*

HB101 : souche HB101 " "

HB101 (pBR322) : souche HB101 contenant le plasmide pBR322

Inc : groupe d'incompatibilité

pSym : plasmide symbiotique

ADN : acide désoxyribonucléique

dam : "DNA adenine methylation"

bp : paire de bases

kb : kilobase ( $10^3$  bp)

Dalton : masse de l'atome d'hydrogène ; unité de masse moléculaire (Dal.)

Mdal :  $10^6$  Dalton

ARN : acide ribonucléique

Km<sup>R</sup> : conférant la résistance à la kanamycine

# INTRODUCTION

## L'évolution de l'information génétique

Les systèmes vivants ne sont que la réalisation dans un environnement donné d'un programme prescrit par l'hérédité. Les instructions spécifiant les structures, les plans d'architecture, les moyens de mettre en oeuvre et de coordonner les activités du système sont toute ou partie de l'information génétique héritée du (des) système (s) parental (aux).

La nature même du support de l'information, les mécanismes de duplication, de correction, de contrôle et de régulation nous ont fait comprendre que ce qui informe matière et énergie ne conserve pas de leçons de l'expérience et tend à se transmettre de manière immuable de génération en génération.

Le système n'est pas parfait. Des erreurs, les mutations, créent autour d'une information moyenne une distribution gaussienne qui permet une meilleure adaptation du système à l'environnement. Cette micro-évolution est tout à fait différente de la macroévolution ou évolution au sens habituel du terme, qui assura la continuité entre le seul produit issu de génération spontanée et les formes de vie les plus évoluées. Les mécanismes exacts de cette évolution sont encore sujets à controverse (GRASSE 1978, 1980 ; JACOB 1978, 1981) mais il est clair que tout mouvement évolutif résulte de l'acquisition et de la transmission héréditaire d'informations structurales et de régulations nouvelles.

La manipulation de l'information génétique : une nouvelle évolution ?

Transmis et amplifié à chaque génération, le savoir humain influence depuis longtemps l'évolution biologique en adaptant l'environnement terrestre aux besoins de l'homme. Cependant, la capacité de créer une certaine forme d'évolution par la manipulation directe de l'information génétique est relativement récente et résulte de progrès réalisés en biologie moléculaire, regroupés sous l'appellation de "techniques de génie génétique".

Par la sélection artificielle, l'homme savait déjà utiliser, exploiter les différences d'information existant entre des plantes ou des animaux. Ce processus de mise en valeur des potentialités naturelles, très ancien, a perdu beaucoup d'empirisme grâce à la démarche scientifique mais il sera toujours limité par sa durée, par l'incidence trop grande du hasard et par ce que la nature veut bien permettre.

*Potentiellement*, le génie génétique peut améliorer rationnellement certains systèmes biologiques existants, initier de nouvelles voies évolutives mieux adaptées aux environnements industriels ou agricoles créés par l'homme. Mais plusieurs remarques s'imposent :

- 1 - Dans l'état actuel des connaissances, ne sont concernés que les systèmes procaryotes ou eucaryotes inférieurs (levures). L'amélioration de cellules animales ou végétales, la création de nouveaux génotypes mieux adaptés à partir de ces systèmes supérieurs complexes, restent limitées et plus ou moins théoriques.
- 2 - Même dans les systèmes les plus simples, beaucoup de tentatives se heurtent à des problèmes techniques, à notre ignorance. Il est tout compte fait relativement simple d'apporter une information génétique nouvelle à une bactérie par exemple. Mais entre ce "clonage" de gènes et la transcription en ARN messager, la traduction correcte (lecture de l'ARN messager par les ribosomes) en une protéine active (des modifications secondaires, surtout pour les protéines d'organismes supérieurs, sont souvent nécessaires) qui soit excrétée par la bactérie... il y a pas mal de chemin à parcourir et de difficultés à surmonter.
- 3 - Biotechnologie et génie génétique sont souvent confondus par le grand public. De fait, le génie génétique pourrait bien révolutionner la microbiologie industrielle mais les esprits se sont trop vite échauffés, ont prématurément transposés les résultats d'expériences spectaculaires. Actuellement, l'enthousiasme tiédit et les innovations se font attendre. Certaines filières industrielles économiquement intéressantes (rentables ?) semblent se dessiner mais elles ne concernent que les substances à haute valeur ajoutée. Le bénéfice dégagé et le secteur industriel doivent être

suffisamment important et financièrement solide pour permettre les investissements en potentiels de recherche. Beaucoup d'autres applications industrielles sont plutôt timides ; la rentabilité est loin d'être évidente et la conjoncture économique n'encourage pas les industriels à investir.

- 4 - Les propriétés inconnues d'organismes vivants situés au-delà des limites naturelles de la vie, la dissémination éventuelle des produits d'une alchimie ésotérique ont alarmé les scientifiques et l'opinion publique. Les polémiques qui s'ensuivirent n'avaient aucune raison d'être car :
- a) les recherches en ce domaine ne pouvaient plus être arrêtées,
  - b) les risques ne dépassent pas ceux que l'on maîtrise depuis longtemps dans la manipulation des bactéries et des virus pathogènes,
  - c) la création par hasard en laboratoire d'un organisme nouveau, pathogène de surcroît, mieux adapté à un environnement que les formes de vie qui luttent pour s'y maintenir depuis des siècles ... est pour le moins improbable.

Le génie génétique est avant tout un outil analytique qui nous permet de mieux comprendre le fonctionnement du vivant. Celui-ci se traduit aujourd'hui en termes d'information, de code, de programme... Il semble plus proche, plus accessible aussi grâce au génie génétique. La perspective d'une intervention humaine au cœur même des systèmes vivants a malheureusement libéré prématurément les imaginations des uns et des autres.

Au-delà de ces spéculations, il faut remarquer qu'en quelque sorte, il ne nous appartient plus de choisir. L'instabilité et le déséquilibre de notre biotope, fruits des erreurs et de la croissance humaines, ne seront efficacement et durablement combattus que grâce à la manipulation et l'exploitation conscientes des potentialités génétiques du monde vivant.

## LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

La fertilisation azotée est une composante essentielle du rendement de bon nombre de cultures industrielles. Synthétisés par voie chimique à grand renfort d'énergie fossile, les engrais azotés sont absolument indispensables au maintien et à l'augmentation de la production alimentaire mondiale bien qu'ils déséquilibrent chaque année davantage la balance énergétique de l'agriculture.

Né et nourri de l'illusion de l'abondance, le système de production actuel est inadapté à la réalité et ne pourra répondre à terme à la demande alimentaire croissante.

### Comprendre et copier la nature

La compréhension et la domestication de certains processus naturels devraient libérer l'agriculture et l'industrie alimentaire du cercle vicieux où les enferment aujourd'hui l'épuisement des ressources énergétiques non-renouvelables, la diminution du rendement calorique de la machine de production agricole et l'accroissement de la population mondiale.

Voie naturelle d'incorporation de l'azote atmosphérique dans la biosphère, la fixation biologique de l'azote est une solution offerte par la diversité de la nature que l'homme s'emploie à adapter à son environnement agricole.

### Le travail des microorganismes

L'azote atmosphérique est réduit en ammoniac assimilable par les végétaux, par un complexe enzymatique, la nitrogénase. Celle-ci, malgré son importance pour l'écosystème, n'a été retrouvée que chez certains organismes, procaryotes (QUISPEL 1974). Bien qu'appartenant à des groupes taxonomiques très différents, les quelques cinquante espèces bactériennes (DALTON 1974) et les très nombreuses cyanobactéries (STEWART 1976) capables de fixer l'azote, élaborent des systèmes de fixation remarquablement similaires (EADY et POSTGATE 1974, RUVKUN et AUSUBEL 1980).

Qu'elle soit réalisée par voie chimique (procédé HABER-BOSCH) ou catalysée par la nitrogénase, la transformation de l'azote gazeux en ammoniacque demande beaucoup d'énergie. Plus de deux millions de barils de pétrole étaient utilisés en 1975 dans le monde pour la synthèse chimique des engrais azotés (HARDY et HAYELKA 1975) ; il faut à la cellule au moins 28 moles d'ATP par mole d'azote réduit (BERGERSEN 1977).

Les systèmes biologiques de fixation de l'azote les plus efficaces sont donc ceux dans lesquels la réduction enzymatique est associée à la photosynthèse. Les cyanobactéries et les symbioses terrestres bactéries fixatrices/plantes supérieures sont responsables de la majorité de l'azote atmosphérique incorporé dans le cycle organique de l'azote.

Recherche agronomique et microorganismes fixateurs : du travail pour les *Rhizobium* dans l'agriculture

Non-associées à des végétaux, les bactéries du sol "fixatrices libres" présentent peu d'intérêt agronomique. La recherche s'est pourtant intéressée à l'une de ces bactéries, *Klebsiella pneumoniae*, car ses caractéristiques génétiques (fait partie des entérobactéries comme *Escherichia coli*) et physiologiques (en particulier, la fixation de l'azote en culture pure) permettent une approche au niveau moléculaire de l'organisation et de la régulation des gènes de fixation de l'azote (gènes nif : Nitrogen Fixation) (ELMERICH 1979, AUSUBEL et CANNON 1980). Localisés sur le chromosome, au nombre de 17, répartis en 7 unités de transcription, les gènes nif de *K. pneumoniae* s'étendent sur une région de 24 kilobases (kb) (ELMERICH *et al.* 1978, 1979 ; AUSUBEL et CANNON 1980). Ces gènes ont été clonés (DIXON *et al.* 1976, CANNON *et al.* 1977, 1979) et constituent du fait de la conservation de séquence de la nitrogénase chez les différents organismes fixateurs, des sondes très utiles pour la localisation des gènes nif (NUTI *et al.* 1979, RUVKUN *et al.* 1980, HENNECKE 1981, ROSENBERG *et al.* 1981).

Les qualités agronomiques de la symbiose *Rhizobium*/légumineuses sont en revanche connues et utilisées empiriquement depuis longtemps. Ce n'est que depuis quelques années, grâce à l'adaptation et au développement de techniques de génétique et de biologie moléculaire (génie génétique) que l'on peut s'intéresser à ce système symbiotique complexe (pour une revue voir BERINGER *et al.* 1980).

Son amélioration et son extension à d'autres plantes cultivées constituent l'objectif de nombreux laboratoires de recherche. Substituer aux engrais azotés synthétisés par voie chimique, un système biologique fixateur dérivé de la symbiose *Rhizobium*/légumineuses paraît non seulement intéressant mais indispensable.

#### A. - ANALYSE GENETIQUE DE LA SYMBIOSE

L'étude de la symbiose *Rhizobium*/légumineuses, des gènes impliqués dans les multiples interactions bactérie/plante hôte, pose nombre de problèmes méthodologiques nouveaux. La spécificité des deux partenaires, les phénomènes de régulation et de différenciation abordés (organogénèse chez la plante-hôte, différenciation de la bactérie en bactéroïde) et l'implication à la fois de gènes de la plante et de la bactérie compliquent sérieusement le problème.

L'analyse de la plante est quelque peu restée dans l'ombre alors que la génétique bactérienne et la biologie moléculaire appliquées aux *Rhizobium* provoquaient une véritable explosion des recherches.

Mais l'abondance, la qualité des travaux concernant l'information génétique bactérienne ne doivent pas dissimuler le fait que ce type de recherche, bien que fondamentalement indispensable, ne fait qu'entamer, d'un point de vue strictement agronomique, l'étude de la symbiose.

## 1. - Analyse génétique de la plante-hôte

L'analyse génétique de quelques légumineuses a mis en évidence le rôle de gènes de la plante dans la spécificité vis-à-vis des souches de *Rhizobium*, dans la formation des nodosités, leur nombre et leur répartition sur le système racinaire et dans l'efficacité de l'association (LIE *et al.* 1983, JACOBSEN 1983, voir les revues de HOLL et LA RUE 1976, CALDWELL et VEST 1977). 18 à 20 polypeptides de la plante, autres que les leghémoglobines<sup>1</sup>, joueraient des rôles spécifiques dans la symbiose (LEGOCKI et VERMA 1979).

Malgré leur grande importance agronomique, ces travaux, très laborieux, sont hélas trop rares. Le génie génétique et les cultures végétales *in vitro* devraient relancer cette voie de recherche qui souffrit à ses débuts d'un manque de moyens d'investigation.

## 2. - Analyse génétique de *Rhizobium*

Les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* font partie de la famille des Rhizobiacées dont l'une des caractéristiques est d'induire la multiplication cellulaire chez certains végétaux :

- formation spécifique de nodules racinaires chez les légumineuses pour *Rhizobium*,
- tumeurs du collet et proliférations racinaires chez la plupart des dicotylédones pour *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes*.

La présence de plasmides chez les Rhizobiacées, l'implication de certains d'entre-eux dans l'établissement de ces interactions bactéries/plantes supérieures, les homologues existant entre plasmides de *Rhizo-*

<sup>1</sup>Les leghémoglobines sont des protéines synthétisées conjointement par la plante et la bactérie ; la globine est produite par la plante, la partie hémique par la bactérie. Ces protéines se combinent à l'oxygène et assurent le maintien d'une tension en oxygène qui n'inactive pas la nitrogénase.

*bium* et d'*Agrobacterium* renforcent aux niveaux génétique et moléculaire la cohérence de cette famille.

Les pSym (plasmides de *Rhizobium* impliqués dans les propriétés SYMBiotiques - ROSENBERG *et al.* 1981), les pTi ("Tumor-Inducing plasmid" d'*Agrobacterium tumefaciens*) et les pRi ("Root-inducing plasmid" d'*Agrobacterium rhizogenes*), déterminants génétiques impliqués dans ces relations procaryote/eucaryote, font l'objet de nombreuses recherches car la compréhension des bases moléculaires de ces systèmes biologiques privilégiés est indispensable à leur amélioration et à leur utilisation rationnelle.

#### a - Les plasmides de *Rhizobium*

Le nombre et la taille des plasmides indigènes varient suivant les espèces et les souches (par exemple : CASSE *et al.* 1979, HIRSCH *et al.* 1980). Les premières méthodes d'extraction plasmidique utilisées chez *Rhizobium* (par ex. : CURRIER et NESTER 1976) ont mis en évidence des plasmides dont les masses moléculaires sont comprises entre 30 et 200 Mégadaltons (Mdal.). Mais les contraintes physiques inhérentes à ces méthodes excluaient la détection de tout ADN plasmidique de grande taille. Certaines souches de *R. meliloti* semblaient dépourvues de plasmide, d'autres présentaient de manière irrégulière des plasmides dont les masses moléculaires dépassaient celles que l'on observait habituellement. Des méthodes beaucoup plus douces (ECKHARDT 1978, SCHWINGHAMER 1980) ont depuis révélé la présence de "Mégaplasmides" (masse moléculaire > 500 Mdal.) chez *R. meliloti* (ROSENBERG *et al.* 1981).

Le rôle biologique de certains de ces plasmides a pu être précisé. Plusieurs marqueurs génétiques ont été localisés : production de bactériocine, aspect morphologique des colonies, production de pigments... (pour une revue voir BERINGER *et al.* 1980). Très tôt, sur la base d'arguments génétiques indirects (par ex. HIGASHI 1967, DUNICAN et CANNON 1971) plusieurs auteurs avaient émis l'hypothèse que ces plasmides pouvaient également porter certains gènes impliqués dans le contrôle de la symbiose. De nombreux travaux ont depuis confirmé ces

hypothèses. Ainsi, des expériences de transfert à haute fréquence de la spécificité d'hôte\* de *R. trifolii* à *R. phaseoli* et de *R. leguminosarum* à des *Rhizobium* d'autres espèces (JOHNSTON *et al.* 1978c, 1979 ; BEYNON *et al.* 1980) ont montré que les gènes déterminant cette propriété sont portés par des plasmides. En fait, chez *R. leguminosarum* (SCHILPEROORT *et al.* 1979 ; PRAKASH *et al.* 1980, 1981 ; KROL *et al.* 1982 ; HOOYKAAS *et al.* 1982), chez *R. phaseoli* (BEYNON *et al.* 1980, QUINTO *et al.* 1982) et *R. trifolii* (HOOYKAAS *et al.* 1981, SCOTT et RONSON 1982), tout ou partie des gènes bactériens contrôlant la formation des nodules et les gènes de structure de la nitrogénase sont portés par un seul et même plasmide, le pSym, dont la masse moléculaire varie suivant les espèces et les souches, entre 100 et 550 Mdal. (KROL *et al.* 1982). Les gènes bactériens, contribuant à l'établissement de nodules fixateurs d'azote (gènes nod = Nodulation de la légumineuse associée ; gènes fix : fixation de l'azote atmosphérique - en l'occurrence gènes nif (nitrogen fixation) KDH homologues des gènes de structure de la nitrogénase de *K. pneumoniae*) sont même étroitement associés sur les pSym de *R. leguminosarum* (BUCHANAN-WOLLASTON *et al.* 1980), de *R. trifolii* (HOOYKAAS *et al.* 1981, ROLFE *et al.* 1981) et de *R. phaseoli* (LAMB *et al.* 1982).

*Rhizobium meliloti* diffère des espèces précédentes dans la mesure où la taille du pSym semble être la même dans toutes les souches. Des gènes nif et des gènes impliqués dans la nodulation ont là aussi été trouvés associés, sur le mégaplasmide, caractéristique de l'espèce *meliloti* (ROSENBERG *et al.* 1981, 1982 ; BANFALVI *et al.* 1981, 1983 ; KONDOROSI *et al.* 1982).

Les souches de *Rhizobium japonicum* à croissance rapide abritent également un seul pSym, de taille variant entre 100 et 200 Mdal. Les plasmides de souches à croissance lente, bien que de taille similaire, ne paraissent pas tout au moins porter les gènes de structure de la nitrogénase (MASTERSON *et al.* 1982).

---

\* voir glossaire

Les contenus plasmidiques et l'implication dans la symbiose de plasmides de *Rhizobium* tropicaux à large spécificité d'hôte (les espèces précédentes sont dites à spécificité d'hôte étroite) capables de noduler de nombreuses légumineuses ainsi que d'autres plantes tropicales, sont actuellement à l'étude. Outre leur large spécificité d'hôte et leur contribution à la fertilité des sols de pays défavorisés, certains de ces *Rhizobium* présentent en plus d'autres particularités intéressantes comme la fixation asymbiotique de l'azote ou la formation de nodules sur la tige de la légumineuse associée (*Sesbania*).

Certaines souches de *R. leguminosarum* et *R. japonicum* possèdent une activité hydrogénase (Hup : "hydrogen uptake") qui permet un recyclage de l'hydrogène produit secondairement par la nitrogénase au cours de la réduction de l'azote atmosphérique et ainsi la récupération (par oxydation de l'hydrogène) d'une partie de l'énergie qui disparaît autrement dans cette réaction parasite (EMERICH *et al.* 1979). Les souches Hup<sup>+</sup> sont généralement à l'origine de symbioses beaucoup plus efficaces (ALBRECHT *et al.* 1979, HANUS *et al.* 1981, DE JONG *et al.* 1982). Ces gènes hup, bien que courants chez les microorganismes fixateurs libres d'azote, sont assez rares chez les *Rhizobium* : 20 % des souches de *R. japonicum* recyclent activement l'hydrogène ; la plupart des souches de *R. leguminosarum* sont Hup<sup>-</sup> ou, à quelques exceptions près, très peu efficaces ; *R. trifolii* et *meliloti* ne semblent pas posséder du tout ces gènes (EVANS *et al.* 1981). Comme chez la plupart des fixateurs libres (POOTJES 1977, LIM *et al.* 1980), les gènes déterminant ce système récupérateur d'énergie, chez *R. leguminosarum*, ont été localisés sur un plasmide, en l'occurrence le pSym à proximité des gènes de nodulation (BREWIN *et al.* 1980). Bizarrement, chez *R. japonicum*, l'activité Hup semble liée à l'absence de plasmide mais la possibilité que ces gènes soient portés par un plasmide trop grand pour être détecté par les méthodes actuelles, n'est pas à rejeter (CANTRELL *et al.* 1982).

Une amélioration sensible du rendement des légumineuses cultivées devrait être obtenue par clonage et dissémination de ce système Hup dans les *Rhizobium* (DE JONG *et al.* 1982, CANTRELL *et al.* 1983).

b - Organisation génétique des gènes symbiotiques de *Rhizobium*

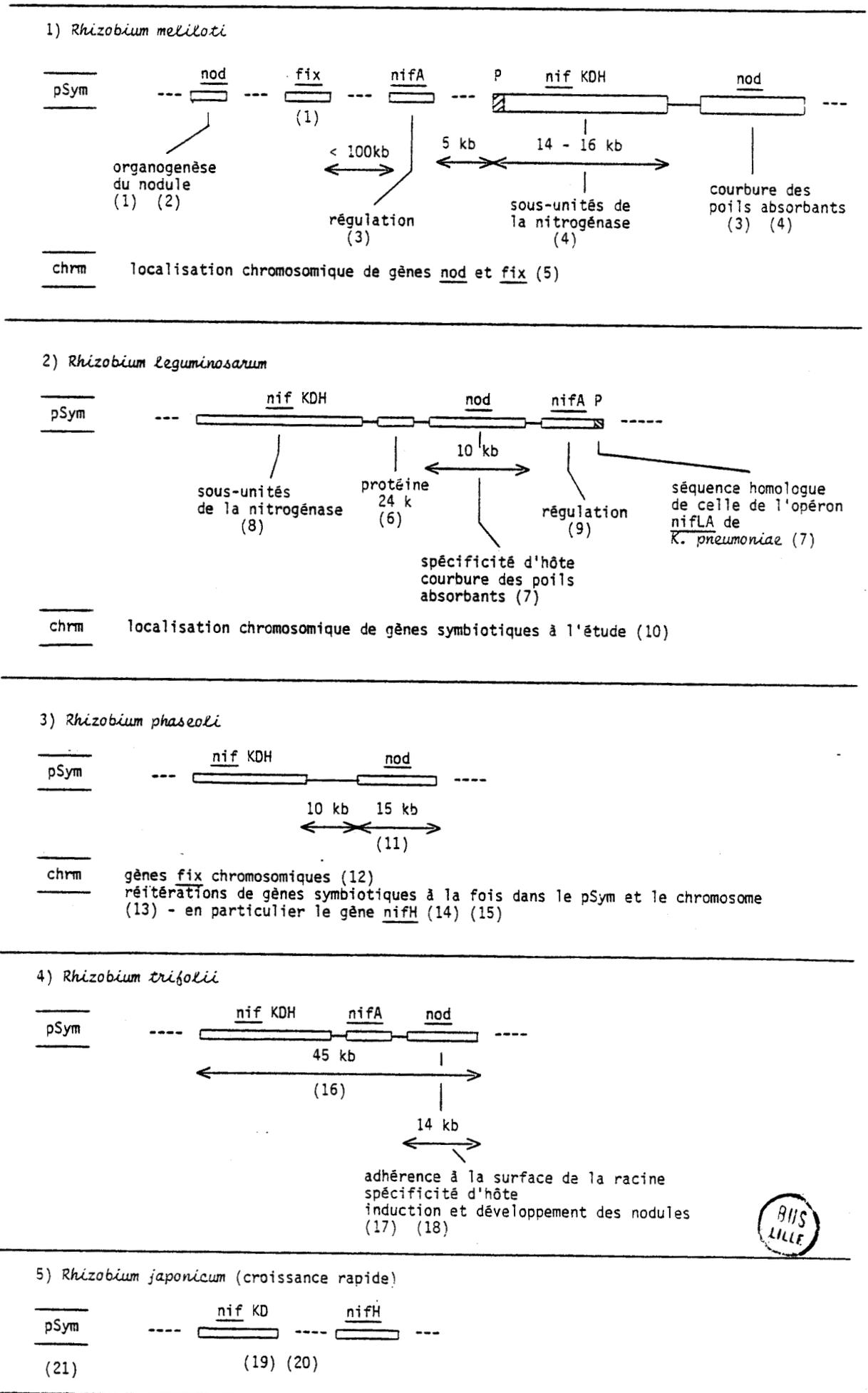
Les gènes nif de *Rhizobium* (contribuant en partie au phéno-  
type Fix) sont assez bien caractérisés au plan moléculaire. La remar-  
quable unité des systèmes nitrogénase chez les organismes fixateurs  
d'azote (EADY et POSTGATE 1974, RUVKUN et AUSUBEL 1980) et le clonage  
des gènes nif de *Klebsiella pneumoniae* ont permis la localisation de  
l'information homologue chez *Rhizobium*.

Localisée sur les pSym, cette homologie sembla longtemps  
limitée aux gènes de structure KDH de la nitrogénase (celle-ci est  
composée de 2 protéines Kp1 et Kp2 : Kp1 est un tétramère de 2 sous-  
unités  $\alpha$  (nifD) et  $\beta$  (nifK) ; Kp2 est un dimère de 2 sous-unités iden-  
tiques (nifH). Des travaux récents ont permis, grâce à l'affinement  
des techniques d'analyses physique et génétique, de reconsidérer cet  
 tat de fait :

- 1 - Une zone de pSym homologue du gène de régulation nifA de *K. pneu-  
moniae* a été mise en évidence chez *R. meliloti* (SZETO et al. 1983)  
et *R. leguminosarum* (DOWNIE et al. 1983a). Chez ce dernier, la  
séquence d'ADN précédant le gène "nifA-like" rappelle celle du  
promoteur de l'opéron nif-L-A de *K. pneumoniae* (DOWNIE et al.  
1983a).
- 2 - Des gènes impliqués dans la réalisation du phénotype Fix ont été  
localisés sur le chromosome de *R. meliloti* (FORRAI et al. 1983) et  
de *R. phaseoli* (SANCHEZ et al. 1983).
- 3 - Des gènes symbiotiques sont répétés, en particulier mais pas uni-  
quement le gène nifH, à la fois sur le pSym et le chromosome de  
*R. phaseoli* (QUINTO et al. 1982, 1983 ; SÁNCHEZ et al. 1983).

Même si l'homologie au plan moléculaire des systèmes nitro-  
g nase ne semble plus limitée chez *Rhizobium* aux seuls gènes de struc-  
ture KDH, elle ne tend pas non plus vers l'identité parfaite, ne serait-  
ce qu'au plan de l'organisation des gènes nif détectés. Ceux-ci ne sont  
pas disposés en opéron continu comme chez *K. pneumoniae* et présentent  
des arrangements différents suivant les espèces (tab. 1).

TABLEAU 1 - LOCALISATION ET ORGANISATION DES GENES SYMBIOTIQUES CHEZ RHIZOBIUM



6) *Rhizobium loti*

chrm gènes nod chromosomiques (22)

7) *Rhizobium ANU240* souche à croissance rapide associée à de nombreuses légumineuses tropicales

pSym  
ou  
chrm nif KDH  
--- [ ] ---  
(23)

8) *Rhizobium IHP 100 - ORS 571*

Souches à croissance rapide isolées respectivement à partir des légumineuses tropicales *Cajanus cajan* et *Sesbania rostrata*. Capables de fixer l'azote de manière asymbiotique.

IHP 100 localisation chromosomique de gènes nod et nif (24)

ORS 571 pas de plasmide détecté dans la souche (25)

9) *Rhizobium NGR 234*

*Rhizobium* à croissance rapide capable de noduler de nombreuses légumineuses tropicales ainsi que *Parasponia* (non-légumineuse).

pSym nif HD nod  
--- [ ] --- [ ] ---  
15 kb 30 kb 20 kb  
← (26) (28) →  
chrm gènes nod chromosomiques (27)

10) *Rhizobium parasponia*

Nodule de nombreuses légumineuses tropicales et *Parasponia*.  
L'activité de la nitrogénase peut être induite *in vitro*.

pSym nif KD nif H nod  
--- [ ] --- [ ] --- [ ] ---  
(30) (31) (32)  
13 kb  
← (29) →

- |                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| ( 1) DAVID <i>et al.</i> 1983     | (16) SCOTT <i>et al.</i> 1983          |
| ( 2) TRUCHET <i>et al.</i> 1983   | (17) LORKIEWICZ <i>et al.</i> 1983     |
| ( 3) SZETO <i>et al.</i> 1983     | (18) SCHOFIELD <i>et al.</i> 1983      |
| ( 4) ROSENBERG <i>et al.</i> 1981 | (19) FUHRMANN <i>et al.</i> 1983       |
| ( 5) FORRAI <i>et al.</i> 1983    | (20) HAHN <i>et al.</i> 1983           |
| ( 6) DIBB <i>et al.</i> 1983      | (21) MASTERSON <i>et al.</i> 1982      |
| ( 7) DOWNIE <i>et al.</i> 1983b   | (22) CHUA <i>et al.</i> 1983           |
| ( 8) SCHETGENS <i>et al.</i> 1983 | (23) BADENOCH-JONES <i>et al.</i> 1983 |
| ( 9) DOWNIE <i>et al.</i> 1983a   | (24-25) BENDER <i>et al.</i> 1983      |
| (10) VINCZE <i>et al.</i> 1983    | (26) MORRISON <i>et al.</i> 1983a      |
| (11) LAMB <i>et al.</i> 1983      | (27) MORRISON <i>et al.</i> 1983b      |
| (12) SANCHEZ <i>et al.</i> 1983   | (28) PANKHURST <i>et al.</i> 1983      |
| (13) SANCHEZ <i>et al.</i> 1983   | (29) WEINMAN <i>et al.</i> 1983        |
| (14) QUINTO <i>et al.</i> 1982    | (30) ROLFE <i>et al.</i> 1983a         |
| (15) QUINTO <i>et al.</i> 1983    | (31) SHINE <i>et al.</i> 1983          |
|                                   | (32) ROLFE <i>et al.</i> 1983b         |

Abréviations utilisées :

- P : promoteur
- chr<sub>m</sub> : chromosome
- pSym : plasmide symbiotique



D'autre part, l'information génétique nif portée par les pSym est bien sûr nécessaire mais non suffisante à la réalisation du phénotype Fix. Au sein même de la bactérie, gènes nif plasmidiques et gènes fix chromosomiques paraissent devoir coopérer.

Les gènes nod (phénotype Nod : "nodulation de la légumineuse associée") bactériens sont comme les gènes fix partagés entre le pSym et le chromosome chez de nombreuses espèces de *Rhizobium* (FORRAI *et al.* 1983, CHUA *et al.* 1983, MORRISON *et al.* 1983b). Les gènes nod plasmidiques sont pour la plupart situés à proximité immédiate des gènes nif KDH chez *R. meliloti* (ROSENBERG *et al.* 1981), chez *R. leguminosarum* (DOWNIE *et al.* 1983a), *R. phaseoli* (LAMB *et al.* 1983) et *R. trifolii* (SCOTT *et al.* 1983). Chez *R. leguminosarum*, les gènes nif KDH et nifA sont situés de part et d'autre des gènes nod.

Ces gènes nod plasmidiques sont impliqués dans la spécificité d'hôte et dans les premières étapes de la formation des nodules, en particulier, dans la courbure des poils absorbants des racines de la légumineuse associée (ROSENBERG *et al.* 1981 ; KONDOROSI *et al.* 1982 ; HOOYKAAS *et al.* 1981, 1982 ; VAN BRUSSEL *et al.* 1982). Ces gènes sont remarquablement similaires chez les *Rhizobium* à croissance rapide (ROLFE *et al.* 1983b).

Les gènes symbiotiques bactériens fix et nod sont donc partagés entre le chromosome et le plasmide symbiotique. L'implication d'autres plasmides n'a non seulement pas été démontrée mais paraît fort improbable car certaines souches de *R. meliloti* par exemple ne renferment qu'un seul plasmide, le pSym. Les gènes fix - nod des pSym sont pour la plupart étroitement associés. Cependant, DAVID *et al.* (1983a) et TRUCHET *et al.* (1983) ont montré chez *R. meliloti* l'existence de gènes nod et fix impliqués dans l'organogenèse du nodule (un stade tardif de la formation des nodules) et dans le phénotype Fix, situés à plus de 100 kb des gènes précédemment identifiés sur le pSym.

La localisation et l'étroite association des gènes symbiotiques sur les pSym avaient laissé supposer une origine commune de ces gènes (RUVKUN et AUSUBEL 1980, AUSUBEL et CANNON 1980, HOOYKAAS *et al.* 1982). Bien que celle-ci ne soit pas fondamentalement remise en question, elle paraît désormais beaucoup moins évidente.

### c - Expression des gènes symbiotiques bactériens

L'étude de l'expression des gènes symbiotiques a été récemment entreprise par des expériences d'hybridation entre le contenu en ARN messager de bactéries ou de bactéroïdes matures ou à différents stades de différenciation et l'ADN total ou plasmidique de la bactérie correspondante.

Ces expériences ont montré que dans la forme endosymbiotique (bactéroïde) le pSym était le seul plasmide à être fortement exprimé (KROL *et al.* 1982, SÁNCHEZ *et al.* 1983) et qu'il portait également des gènes sans rapport direct avec la symbiose, gènes traduits en ARN messager dans la bactérie (SANCHEZ *et al.* 1983, DAVID *et al.* 1983a).

Les gènes nod des pSym ne sont, de manière logique, peu ou pas exprimés dans le bactéroïde (LONG *et al.* 1983) ; par contre, le sont fortement les gènes nifA, K, D, H et d'autres régions sans rapport avec les gènes nif précédents (PRAKASH *et al.* 1982, DAVID *et al.* 1983a).

Les signaux de contrôle de la transcription de l'information symbiotique (BETTER *et al.* 1983) et les gènes symbiotiques situés en dehors du pSym (VINCZE *et al.* 1983, SÁNCHEZ *et al.* 1983) sont actuellement étudiés par ces méthodes d'hybridation ADN/ARN messager. Ces expériences ne permettent de mettre en évidence que les gènes intensément traduits et restent malheureusement limitées aux gènes symbiotiques bactériens exprimés dans le bactéroïde. Tout ce qui sépare la bactérie du bactéroïde échappe pour l'instant à l'analyse.

d - Remarques

Ce qui pose véritablement un problème dans l'analyse de l'information symbiotique de *Rhizobium* est le fait que ces gènes ne sont exprimés que lors de l'installation et du fonctionnement de la symbiose. Les phénotypes sur lesquels travaillent les chercheurs (Nod : nodulation de la légumineuse associée ; Fix : fixation de l'azote atmosphérique par la plante ayant nodulé) ne sont qu'en partie déterminés par les gènes bactériens et appartiennent en fait à la plante-hôte. L'implication et l'interaction de gènes de la plante, de la bactérie puis du bactéroïde dans ces relations symbiotiques compliquent et rendent beaucoup plus ténu le lien existant entre un gène et son expression phénotypique.

Par exemple, dans le cas des gènes fix de *Rhizobium*, dans ce cas relativement simple, puisque ces gènes sont exprimés dans le bactéroïde accessible à l'analyse, le phénotype Fix<sup>-</sup> observé chez une plante ayant normalement nodulé (Nod<sup>+</sup>), peut être attribué bien sûr à toute modification génétique des gènes nif de structure ou de régulation, d'autres gènes fix de la bactérie, mais également à toute altération de gènes n'ayant pas de rapports directs avec le système nitrogénase bactérien comme les gènes de la bactérie et de la plante permettant la synthèse de leghémoglobines fonctionnelles ou de gènes impliqués dans la différenciation ou le vieillissement des bactéroïdes (RUVKUN *et al.* 1980). De plus, des gènes de la plante peuvent avoir une incidence directe sur le fonctionnement de la nitrogénase (gènes fix de la légumineuse !) (LIE *et al.* 1983).

Le cas du phénotype Nod est encore plus révélateur. Les gènes de nodulation regroupent en fait un ensemble assez hétéroclite de gènes qui n'ont comme caractéristique commune que leur participation à l'élaboration de nodules fonctionnels. Les produits de ces gènes sont non seulement inconnus mais on ne sait pas comment et quand ils interviennent dans l'établissement de la symbiose. Comme dans le cas des gènes fix et des leghémoglobines, ces gènes sont partagés entre la bactérie et la plante (JACOBSEN 1983). Leur expression n'est pas

continue (LONG *et al.* 1983) comme l'est celle des gènes nif dans le bactéroïde (HONTELEZ *et al.* 1983, DAVID *et al.* 1983) et doit intervenir à des stades très fugaces de différenciation des deux partenaires.

Outre le fait que gènes fix et nod doivent se recouper, il convient de remarquer que n'a été soulignée que l'implication de gènes et de la plante et de la bactérie dans les phénotypes Nod et Fix. Nous n'avons somme toute parlé que d'addition de gènes, que penser des interactions dont naît la symbiose ?

### 3. - Les outils génétiques d'analyse des gènes symbiotiques bactériens

Les spécificités de *Rhizobium* ont nécessité l'adaptation et la création de nombreuses techniques de génétique et de biologie moléculaire. Taxonomiquement éloigné d'*Escherichia coli*, réfractaire à la transformation et contenant des systèmes de restriction et de recombinaison dont il est actuellement difficile de s'affranchir, *Rhizobium* est loin de présenter les "qualités génétiques" des entérobactéries qui avaient permis les progrès considérables de la génétique bactérienne chez *E. coli* et l'étude relativement aisée des gènes nif de *Klebsiella pneumoniae* grâce à l'expérience et aux systèmes génétiques précédemment acquis.

#### a - Les plasmides à large spécificité d'hôte

Les propriétés remarquables des plasmides de résistance du groupe d'incompatibilité P1 (IncP1) (ex. : plasmides RP4, RK2, R68) ont été largement exploitées. Ces plasmides sont en effet autotransférables (gènes tra : "transfer ability"), capables de se répliquer et d'exprimer leurs gènes de résistance dans la quasi-totalité des bactéries à Gram-négatif dont fait partie *Rhizobium* (plasmides à large spécificité d'hôte). Leurs transferts interspécifiques ou intergénériques s'accompagnent souvent de mobilisations soit du chromosome bactérien (Cma : "Chromosome mobilization ability"), soit de plasmides (Pma : "Plasmid

mobilization ability"), soit de fragments d'ADN chromosomique ou plasmidique.

Dans un premier temps, ils servirent à établir des cartes chromosomiques de *Rhizobium* (KONDOROSI *et al.* 1977, BERINGER *et al.* 1978a, JULLIOT et BOISTARD 1979) et à démontrer par défaut la localisation extrachromosomique de gènes symbiotiques. Ceux-ci ne purent en effet être localisés sur le chromosome comme l'avaient été les gènes nif de *K. pneumoniae* dans des expériences similaires (DIXON et POSTGATE 1972, DIXON *et al.* 1976). La localisation extrachromosomique de gènes nod et nif, antérieurement démontrée chez certaines souches de *R. leguminosarum*, *R. trifolii* et *R. phaseoli* dont les pSym sont conjugatifs (HIGASHI 1967, JOHNSTON *et al.* 1978, BEYNON *et al.* 1980, ROLFE *et al.* 1981, HOOYKAAS *et al.* 1981), fut étayée et mise en évidence en particulier chez *R. meliloti*, par des expériences de complémentation consistant à mobiliser tout ou partie d'un pSym par ces facteurs sexuels (IncPl) vers des *Rhizobium* affectés dans leurs propriétés symbiotiques (phénotypes Nod<sup>-</sup> ou Fix<sup>-</sup>) ou vers des souches d'*Agrobacterium*. Des plasmides entiers de *Rhizobium* peuvent être ainsi mobilisés soit par intégration du facteur sexuel (SCOTT et RYANSON 1982), soit lorsqu'il existe une homologie entre les deux plasmides. Cette homologie peut être créée naturellement par transposition *in vivo* d'éléments génétiques transposables d'un plasmide à l'autre (HOOYKAAS *et al.* 1982, KISS *et al.* 1982, OLSEN 1978, McCOMBIE *et al.* 1983), ou artificiellement par insertion *in vitro* d'un fragment du plasmide à mobiliser dans le plasmide mobilisateur (VINCZE *et al.* 1982) ou par exemple par insertion *in vivo* de la région de mobilisation (mob) du plasmide mobilisateur dans le pSym (KONDOROSI *et al.* 1982, SIMON *et al.* 1983).

Des phénomènes de recombinaison *in vivo* peuvent engendrer des plasmides "R-prime" constitués d'un plasmide IncPl dans lequel est inséré un fragment d'ADN chromosomique (JOHNSTON *et al.* 1978 a et b, KISS *et al.* 1980) ou plasmidique (KOWALCZUK *et al.* 1981, FORRAI *et al.* 1983, BANFALVI *et al.* 1983) de *Rhizobium*. Le fragment inséré, bénéficiant des propriétés de transfert et de répllication de son vecteur, peut conduire à la restauration du phénotype symbiotique sauvage chez la légumineuse associée si les gènes qu'il porte sont venus complémen-

ter les gènes symbiotiques déficients de la souche de *Rhizobium* inoculée à la légumineuse. La formation *in vivo* de ces plasmides "R-prime" et le caractère "Cma" précédemment évoqué, semblent liés, tout au moins dans le R68-45 utilisé dans ces expériences, à la présence d'un élément transposable (IS21) (WILLETTS *et al.* 1981, BANFALVI *et al.* 1983, FORRAI *et al.* 1983).

#### b - Mutagénèse au transposon Tn5 (Km<sup>R</sup>)

Les transposons sont des éléments génétiques transposables codant pour des résistances à des antibiotiques, capables de se déplacer au sein d'un génome bactérien. Véritables agents mutagènes génétiques, les transposons assurent à la fois l'inactivation des fonctions et le marquage génétique du segment d'ADN dans lequel ils sont insérés.

##### α) Mutagénèse au hasard au Tn5 ("Random Tn5 mutagenesis")

Les "plasmides suicides" ont permis l'introduction et l'utilisation chez *Rhizobium* de cet outil génétique qu'est le Tn5.

Ces plasmides ont comme caractéristiques communes d'être (tab. 2) :

- porteurs du transposon Tn5 ;
- stables chez *Escherichia coli*, la bactérie donatrice ;
- conjugatifs ou mobilisables vers *Rhizobium*, la bactérie réceptrice ;
- instables et/ou incapables de se répliquer chez *Rhizobium*.

La sélection pour le caractère de résistance porté par le transposon permet de repérer les exconjugants dans lesquels le transposon s'est transposé du plasmide suicide au génome de *Rhizobium*. L'insertion au hasard du Tn5 dans le génome est peut-être la principale limite de ce système. La production par cette méthode de *Rhizobium* affectés dans leurs propriétés symbiotiques nécessite le passage sur plante d'un nombre considérable de clones (MEADE *et al.* 1982, FORRAI *et al.* 1983). Le système n'est bien sûr utilisable que si le

TABLEAU 2 - PLASMIDES SUICIDES CHEZ RHIZOBIUM

Stabilité chez <i>E. coli</i>	Transfert <i>E. coli/Rhizobium</i>	Absence de répllication chez <i>Rhizobium</i>	Exemples référéncés
Plasmides à large spécificité d'hôte (Inc P1)	Autotransférables (gènes <u>tra</u> )	Instabilité due à la présence du phage Mu sur le plasmide (1) (2)	pJB4JI = pPH1 :: Mu :: Tn5 (1)
Vecteurs de clonage d' <i>E. coli</i>	Mobilisables : insertion de la région <u>mob</u> du RP4 dans le <u>p</u> lasmide. Mobilisation par plasmide Helper.	Incapables de se répliquer. Spécificité, d'hôte limitée aux entérobactéries	pACYC184 mob :: Tn5 (3) pBR325 mob :: Tn5 (4)

- (1) BERINGER *et al.* 1978b  
 (2) VAN VLIET *et al.* 1978  
 (3) ENGWALL *et al.* 1983  
 (4) MULLER *et al.* 1983



transposon, une fois inséré dans le génome de *Rhizobium*, ne se transpose pas dans de nouveaux sites à une fréquence trop importante. De  $10^{-5}$  chez *E. coli*, cette fréquence de re-transposition varie de  $10^{-6}$  à  $10^{-8}$  chez *Rhizobium* suivant les espèces et les souches (MEADE *et al.* 1982, FORRAI *et al.* 1983). Chez *R. meliloti*, elle est pratiquement négligeable (BANFALVI *et al.* 1983, FORRAI *et al.* 1983) et la mutagénèse au Tn5, particulièrement fiable.

Bien que laborieuse, cette méthode de mutagénèse au hasard permet *a priori* la caractérisation de tous les gènes symbiotiques bactériens puisque le Tn5 ne semble pas avoir de sites préférentiels d'insertion (MEADE *et al.* 1982).

β) Mutagénèse dirigée au Tn5 ("site directed Tn5 mutagenesis")

Cette méthode de mutagénèse au Tn5 présente sur la précédente l'avantage d'être beaucoup plus précise et dirigée uniquement vers un fragment de génome bien particulier. Celui-ci doit être préalablement caractérisé et cloné dans des plasmides vecteurs, mobilisables ou conjugatifs, capables (expériences de complémentation) ou incapables (expériences d'homogénéisation) de se répliquer chez *Rhizobium*.

La mutagénèse au Tn5 a lieu chez *E. coli* et ne concerne donc que le fragment d'ADN de *Rhizobium* cloné dans un vecteur.

Dans les expériences de complémentation, le vecteur, capable de se maintenir chez *Rhizobium*, et le fragment inséré, marqué au Tn5, sont transférés vers des mutants de *Rhizobium* déficients du point de vue symbiotique. Suivant la nature des gènes clonés et la position du Tn5, on observe ou non la restauration des fonctions symbiotiques (SCHOFIELD *et al.* 1983). Dans les expériences d'homogénéisation, puisque le vecteur est incapable de se répliquer, la résistance à la kanamycine conférée par le Tn5 (qui d'autre part est incapable de se transposer) ne peut être conservée par les souches sauvages de *Rhizobium* réceptrices que si le fragment marqué au Tn5 a pris la place de l'information sauvage fonctionnelle (double cross-over). Les exconjugants résistants à la kanamycine sont testés pour

leurs propriétés symbiotiques (HAHN et HENNECKE 1983, PRAKASH *et al.* 1983, AGUILAR *et al.* 1983, LONG *et al.* 1983, MÜLLER *et al.* 1983, SANCHEZ *et al.* 1983).

N.B. : les expériences de complémentation (vecteurs capables de se répliquer chez *Rhizobium*) peuvent également être conçues avec des fragments d'ADN de *Rhizobium* non soumis à une quelconque mutagenèse. La souche réceptrice de *Rhizobium* est déficiente du point de vue symbiotique et l'on recherche la restauration du phénotype sauvage (LONG *et al.* 1982, 1983 ; LAMB *et al.* 1983 ; LORKIEWICZ *et al.* 1983).

La mutagenèse au Tn5 est un outil génétique particulièrement utile et utilisé chez *Rhizobium*. Que ce soit pour introduire le transposon Tn5 ou un fragment d'ADN déjà marqué, elle nécessite l'utilisation de plasmides vecteurs.

#### c - Plasmides vecteurs chez *Rhizobium*

La modification de l'information génétique de *Rhizobium*, par mutagenèse au Tn5 ou par addition d'une information nouvelle ne peut emprunter des voies directes. Il n'existe pas actuellement pour *Rhizobium* de méthodes de transformation bactérienne ou d'encapsidation *in vitro* analogues à celles d'*Escherichia coli* (COHEN *et al.* 1973, COLLINS et HOHN 1978) techniquement utilisables.

Les expériences de complémentation ou d'homogénéisation qui demandent respectivement le maintien et la disparition du vecteur dans la cellule réceptrice font appel à des plasmides différents qui ont comme caractéristiques communes leur stabilité et leurs aptitudes au clonage de gènes chez *E. coli* ainsi que leur mobilisation par des plasmides mobilisateurs, d'*E. coli* (hôte primaire) à *Rhizobium*.

#### α) Les plasmides à large spécificité d'hôte - Expériences de complémentation

La large spécificité d'hôte des plasmides des groupes d'incompatibilité P1, Q, W (tab. 3) permet leur maintien à la fois

TABLEAU 3 - VECTEURS DE GENES CHEZ RHIZOBIUM

1) Plasmides à large spécificité d'hôte : expériences de complémentation						
Groupe d'incompatibilité	Plasmide	Masse moléculaire	Transfert intergénérique	Marqueurs	Fonctions de réplication	Remarques
Inc P1	RK2	55 kb	autotransférable	Km,Ap,Tc	large spécificité d'hôte	originaire de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	pRK290	20 kb	mob <sup>+</sup> (pRK2013)	Tc	RK2	(DITTA <i>et al.</i> 1980)
	pLAFR1	21,6 kb	mob <sup>+</sup> (pRK2013)	Tc	RK2	cosmide = pRK290 + site <u>cos</u> du phage lambda (FRIEDMAN <i>et al.</i> 1982)
	pVK100 (et dérivés)		mob <sup>+</sup> (pRK2013)	Tc,Km	RK2	cosmide (KNAUF et NESTER 1982)
plasmide "Helper" (Inc ColE1)	pRK2013	41 kb	tra <sup>+</sup> (RK2)	Km	ColE1, limité aux entérobactéries	mobilise les dérivés du RK2 précédents - ne se maintient pas chez <i>Rhizobium</i>
Inc W	Sa	29,6 kb	autotransférable	Cm,Sp,Km	large spécificité d'hôte	
	pSa747	15 kb	mob <sup>+</sup> (pSa322)	Sp,Km	Sa	cosmide (TAIT <i>et al.</i> 1983)
	pGV1106	9 kb	mob <sup>+</sup> (Inc P1)	Km,Sm	Sa	plasmide (KISS et KALMAN 1982)
plasmide "Helper" (Inc ColE1)	pSa322		tra <sup>+</sup> (Sa) insérés dans pBR322	Ap	ColE1	mobilise les dérivés du pSa
Inc Q	RSF1010	8,7 kb	mob <sup>+</sup> (Inc P1)	Sm,Su	large spécificité d'hôte	(BAGDASARIAN <i>et al.</i> 1981)
	pKT210	11,7 kb	mob <sup>+</sup> (Inc P1)	Cm,Sm,Su	RSF1010	(BAGDASARIAN <i>et al.</i> 1981 ; DAVID <i>et al.</i> 1983a)

tra<sup>+</sup> : plasmide autotransférable (conjugatif)  
gènes tra ("transfer ability")

mob<sup>+</sup> (pRK2013) : plasmide mobilisable par le plasmide "Helper" pRK2013 qui est conjugatif

Km,Ap,Tc,Cm,Sp,Sm,Su : conférant la résistance à la kanamycine, l'ampicilline, la tétracycline, le chloramphénicol, la spectinomycine, la streptomycine, les sulfonamides.



TABLEAU 3 - Suite

2) Plasmides d'*Escherichia coli* : expériences d'homogénéisation/mutagenèse au Tn5

Plasmide	Groupe d'incompatibilité	Plasmide(s) Helper(s)	Remarques
pBR322	ColE1	R64drd11 pGJ28	(WARREN <i>et al.</i> 1978 ; VAN HAUTE <i>et al.</i> 1983)
pBR325	ColE1	pRK2013	(LONG <i>et al.</i> 1983)
pBR325 :: mob (RP4) :: Tn5	ColE1	RP4 (tra <sup>+</sup> ) inséré dans le chromosome de la souche d' <i>E. coli</i> donatrice	mutagenèse au hasard au Tn5 (MÜLLER <i>et al.</i> 1983)
pSup 205	ColE1	"	cosmide mobilisable dérivé du pBR325 (région mob du RP4, site cos du phage lambda) (MÜLLER <i>et al.</i> 1983)
pSup 202	ColE1	"	dérivé mobilisable du pBR325 (Ap,Km,Ic) (région mob du RP4) (MÜLLER <i>et al.</i> 1983)
pACYC184 :: mob (RP4) :: Tn5	P15A	"	mutagenèse au hasard au Tn5 (ENGWALL <i>et al.</i> 1983)

## 3) Plasmides Hybrides : expériences de complémentation

Plasmide	Fonctions de répllication
pACYC 177/mob - OriV RSF1010 pACYC 184/mob - OriV RSF1010 pBR322/mob - OriV RSF1010	Celles des pACYC 177 et 184 et du pBR322 sont limitées aux entérocoactéries mais permettent l'amplification du plasmide chez <i>E. coli</i> + celles à large spécificité d'hôte du RSF1010 (OriV) qui assurent le maintien chez <i>Rhizobium</i> (SIMON <i>et al.</i> 1983)



chez *E. coli* et *Rhizobium*. En raison de la taille souvent trop importante des plasmides parentaux et d'aménagements indispensables à la réalisation d'expériences de clonage (sites uniques de restriction, marqueurs génétiques, site cos du phage lambda permettant l'encapsulation *in vitro*...) de nombreux dérivés ont été construits *in vitro*. Ces plasmides ne conservent des parents que quelques marqueurs génétiques mais surtout les fonctions de répllication et l'aptitude à être mobilisés (tra<sup>-</sup> mais mob<sup>+</sup>). Le plasmide "Helper" mobilisateur est soit un plasmide conjugatif type IncPl, mais dans ce cas l'expérience est compliquée par les marqueurs génétiques et le maintien chez *Rhizobium* du plasmide mobilisateur, soit constitué des gènes tra ("transfer ability") du plasmide parental inséré dans un vecteur incapable de se répliquer chez *Rhizobium* (FIGURSKI et HELINSKI 1979, DITTA *et al.* 1980, TATT *et al.* 1983).

β) Les vecteurs de clonage d'*E. coli* -  
Expériences d'homogénéisation

Plasmides et cosmides d'*E. coli*, produits et outils du génie génétique, ont trouvé des applications dans l'analyse des gènes symbiotiques bactériens. Bien que leurs fonctions de répllication soient limitées aux entérobactéries et qu'ils ne puissent de ce fait se maintenir chez *Rhizobium*, ils sont néanmoins beaucoup utilisés comme simples vecteurs de transfert de gènes d'*E. coli* à *Rhizobium*. L'information génétique qu'ils véhiculent n'est conservée par la bactérie réceptrice que si elle s'intègre dans le génome bactérien, intégration au hasard dans le cas d'un transposon porté par un "plasmide suicide", ou dirigée lorsqu'un double cross-over assure l'échange entre l'insert du vecteur et l'information génomique homologue (homogénéisation - site - directed mutagenesis).

L'insertion dans ces vecteurs d'une région mob d'un plasmide conjugatif et l'utilisation d'une souche donatrice tra<sup>+</sup> permettent le transfert inter-générique de ces "plasmides altruistes" (tab. 3).

γ) Les vecteurs hybrides - Expériences de complémentation

Les techniques du génie génétique ont permis une amélioration considérable des plasmides destinés aux expériences de complémentation. Les plasmide et cosmide pRK290 (DITTA *et al.* 1980) et pLAFR1 (FRIEDMAN *et al.* 1982) sont devenus d'un point de vue pratique chez *Rhizobium*, les homologues des pBR322 et pHC79 d'*E. coli* (BOLIVAR *et al.* 1977, HOHN et COLLINS 1980). Bien adaptés au clonage de gènes, ils présentent quand même un inconvénient : ils ne sont pas amplifiables chez *E. coli* (voir Matériels et Méthodes). L'utilisation de ces vecteurs est donc coûteuse en temps et en argent. SIMON *et al.* (1983) ont pallié à cet inconvénient en insérant les fonctions de mobilisation et de répllication du plasmide à large spécificité d'hôte RSF 1010 (IncQ) dans des plasmides amplifiables chez *E. coli*. De même, notre travail a consisté à construire un vecteur de clonage pour *Rhizobium*, amplifiable chez *E. coli*, non pas à partir d'un plasmide à large spécificité d'hôte, mais à partir d'un petit plasmide d'une souche de *Rhizobium meliloti*. Original de par son amplification chez *E. coli* et par les fonctions de répllication qui assurent le maintien chez *Rhizobium*, nous verrons dans les chapitres Résultats et Discussion que ce plasmide présente par rapport aux systèmes existants, d'autres spécificités et d'autres avantages.

M A T E R I E L

E T

M E T H O D E S

## I. - SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES

## A. - ESCHERICHIA COLI

<u>souche</u>	<u>génotype</u>	
C600	F <sup>-</sup> , thi-1, thr-1, leuB6, lac Y1, ton A21, sup E44, λ <sup>-</sup>	(1)
HB101	F <sup>-</sup> , hsdS20 (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), rec A13, ara-14, proA2, lac Y1, gal K2, rps L20 (Sm <sup>r</sup> ), xyl-5, mtl-1, sup E44, λ <sup>-</sup>	(1)
GM272	F <sup>-</sup> , dcm-6, dam-3, met B1, hsdS21, lac Y1 ou lac Z4, gal K2, mtl-2, ton A2 ou ton A31, tsx-1 ou tsx-78, λ <sup>-</sup> , sup. E44	(2)
GM161	F <sup>-</sup> , thr-1, leu B6, dam-4, thi-1, hsd S1, lac Y1, ton A21, λ <sup>-</sup> , sup E44	(2)

(1) (2) Nomenclature de BACHMANN (1983)

(1) utilisées comme souches réceptrices dans la transformation bactérienne

(2) dérivés Dam<sup>-</sup> (DNA Adenine methylation). La dam méthylase d'*E. coli* introduit des groupements méthyl en position N<sup>6</sup> de l'adénine de la séquence 5'GATC3' (HATTMAN *et al.* 1978), origine : CGSC (ColiGenetic Stock Center), Etats-Unis.

## B. - RHIZOBIUM

<u>souche</u>	<u>phénotype</u>	<u>origine</u>
		1 - <i>meliloti</i>
M19S	sauvage	Université des Sciences et Techniques de Lille (U.S.T.L.)

RCR 2011	sauvage	Rothamsted Collection of <i>Rhizobium</i> (Angleterre)
17	sauvage	Research Institute of Ontaria (Canada)
2 - <i>leguminosarum</i>		
L17S	sauvage	U.S.T.L.
3 - <i>phaseoli</i>		
P15S	sauvage	U.S.T.L.
C. - AGROBACTERIUM		
1 - <i>tumefaciens</i>		
B6	sauvage	Université de Gand (Belgique)
2 - <i>rhizogenes</i>		
R1S	sauvage	U.S.T.L.

## II. - PLASMIDES UTILISÉS

pRK2013	Km <sup>R</sup> , Eimm., tra <sup>+</sup> (RK2), Inc ColE1	(1) (2)
pRK290	Tc <sup>R</sup> , mob <sup>+</sup> (pRK2013), Inc P1 (RK2)	(1)
pBR322	Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Inc ColE1	(3)
pBR :: X	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , mob <sup>+</sup> (pRK2013), Inc ColE1	(4)



pBRRM1	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , mob <sup>+</sup> (pRK2013), Inc ColE1, Inc (pRme19a)	(4)
pRme19a	plasmide cryptique de la souche M19S de <i>Rhizobium meliloti</i>	(4)

(1) FIGURSKI et HELINSKI 1979 ; (2) DITTA *et al.* 1980 ;  
 (3) BOLIVAR *et al.* 1977 ; (4) FACON *et al.* 1983.

Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	: conférant la résistance à l'ampicilline, la kanamycine et la tétracycline
imm.	: conférant l'immunité à la colicine E1
tra <sup>+</sup> (RK2)	: portant les gènes de transfert ("transfert ability") <u>tra</u> du plasmide parental RK2
Inc	: groupe d'incompatibilité
mob <sup>+</sup>	: mobilisable par un plasmide "Helper" porteur de gènes <u>tra</u>

pRK290 et pRK2013 nous ont été aimablement fournis par le Professeur D.R. HELINSKI (Université de Californie, San Diego, La Jolla, U.S.A.).

### III. - MILIEUX DE CULTURE

Les compositions des milieux riches et minimums pour *Escherichia coli* et *Rhizobium* ainsi que les conditions générales d'utilisation ont été décrites précédemment (ALI 1982).

*Agrobacterium* utilise les mêmes milieux que *Rhizobium* : milieu minimum R, milieux riches TY glucosé (1 %) (sans CaCl<sub>2</sub> pour *Agrobacterium*) pour les cultures en milieu liquide et RC glucosé (1 %) gélosé pour les isolements.

#### IV. - PRÉPARATION PLASMIDIQUE

Cette méthode de préparation a été décrite par BETLACH *et al.* (1976). Elle est utilisée pour préparer des plasmides de petite taille (< 25 kb), amplifiables chez *E. coli* (pBR322, pBRRM1 et dérivés) ou non-amplifiables chez *Rhizobium meliloti* M19S (pRme19a, pBRRM1).

##### A. - PRINCIPE

###### 1 - Amplification au chloramphénicol

Le chloramphénicol est un antibiotique qui bloque les synthèses protéiques nécessaires à la division de la bactérie et à l'initiation de la réplication du chromosome (CLEWELL 1972).

Certains plasmides, "amplifiables", continuent néanmoins à se répliquer et s'accumulent dans la cellule jusqu'à constituer de 40 à 50 % de l'ADN total (SINSHEIMER 1977).

###### 2 - Lyse

Les bactéries subissent un traitement au lysozyme en présence de saccharose. Cette hydrolyse douce de la paroi bactérienne est complétée par l'addition d'EDTA qui chélate les ions bivalents et accentue la désorganisation de la paroi.

La membrane bactérienne est lysée de façon ménagée par un détergent non-ionique.

Seuls les petits plasmides (masse moléculaire inférieure à 25 kb) sous forme superhélicoïdale peuvent s'échapper dans le milieu extérieur. Les débris cellulaires et l'ADN de grande taille sont éliminés par ultracentrifugation. Le surnageant, enrichi en ADN plasmidique est purifié en gradient de chlorure de césium (CsCl) en présence de bromure d'éthidium (Br Etd).

### 3 - Purification de l'ADN plasmidique en gradient de CsCl/BrEtd

Le bromure d'éthidium s'intercale entre les paires de bases de l'ADN en plus ou moins grande quantité selon la conformation de l'ADN : l'ADN linéaire chromosomique ou plasmidique cassé (formes linéaires et circulaires ouvertes - L et OC DNA) fixe davantage de bromure d'éthidium que l'ADN sous forme superhélicoïdale (CCC DNA). Le bromure d'éthidium intercalé diminuant la densité de l'ADN en gradient de CsCl, l'ADN plasmidique est donc plus dense que les ADN linéaires ou circulaires ouverts, contaminants. Dans un gradient croissant de densité établi de haut en bas d'un tube par ultracentrifugation d'une solution concentrée de CsCl, la bande fluorescente inférieure est constituée d'ADN plasmidique sous forme superhélicoïdale, la bande supérieure, du reste de l'ADN. L'ARN sédimente sous forme de culot, les débris protéiques forment une pellicule en surface.

#### B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La souche d'*E. coli* contenant le plasmide à préparer est cultivée toute une nuit dans 5 ml de milieu Luria avec antibiotique(s) correspondant à (aux) résistance(s) conférée(s) par le plasmide.

1 ml de cette préculture sert à inoculer 200 ml de milieu Luria sélectif (maintien de la pression de sélection). La croissance de la culture bactérienne est suivie par mesure de la densité optique (D.O.) à 600 nm.

Lorsqu'elle atteint la valeur de 0,8, du chloramphénicol (solution-mère : 150 mg/ml dans l'éthanol 100 %) est ajouté jusqu'à la concentration finale de 170 à 200 µg/ml. L'incubation est poursuivie une nuit à 30°C (agitation lente).

Bien que les petits plasmides de *Rhizobium* ne soient apparemment pas amplifiables au chloramphénicol, celui-ci peut néanmoins servir à maintenir les cultures en phase exponentielle de croissance (D.O.

< 1). L'action bactériostatique de cet antibiotique sur les cultures de *Rhizobium* (à 200 µg/ml) est cependant beaucoup moins forte que sur celles d'*E. coli*.

Les bactéries sont récupérées par centrifugation (4°C - 8000 tpm - 15 mn) et remises en suspension dans 3 ml de tampon ST (Tris-HCl 50 mM - saccharose 25 % - pH 8).

Ajouter 1 ml d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml dans du Tris-HCl 50 mM - pH 8.

Mélanger doucement 5 mn à température ambiante puis ajouter 1 ml d'EDTA 200 mM - pH 8.

Mélanger doucement 5 mn dans la glace puis lyser les protoplastes produits par hydrolyse de la paroi bactérienne, en ajoutant 5 ml d'une solution de Triton x100 contenant pour 100 ml : 1 ml de Triton x100 à 10 % - 12,5 ml d'EDTA 200 mM - 5 ml de Tris-HCl 1 M - pH 8.

Mélanger doucement dans la glace jusqu'à ce que tout devienne visqueux.

Centrifuger rotor BECKMAN SW50-1 - 4°C - 25 000 tpm - 1 H ou rotor SW27 - tubes de polycarbonate - 4°C - 22 000 tpm - 1 H.

Pour 0,95 ml de surnageant, ajouter 1 g de CsCl et 50 µl d'une solution de bromure d'éthidium à 1 mg/ml dans l'eau.

Centrifuger 48 H - rotor 50 Ti - 10°C - 38 000 tpm.

La bande inférieure plasmidique (CCC DNA) est prélevée à la pipette automatique après élimination de la bande supérieure.

Le bromure d'éthidium est extrait en ajoutant plusieurs fois 1 volume d'isopropanol saturé en tampon TE (Tris 10 mM - EDTA 1 mM - pH 8) et en CsCl jusqu'à disparition complète de la fluorescence de la phase aqueuse en U.V. (302 nm).

Dialyser une nuit contre du tampon TES (Tris 10 mM - EDTA 1 mM - NaCl 5 mM - pH 7,4) à 4°C.

Mesurer la densité optique à 260 nm et 280 nm pour évaluer la pureté et la concentration de l'ADN plasmidique obtenu.

## V. - LYSÉ DIRECTE SUR LE GEL

### A. - PRINCIPE

La méthode, dérivée de celle d'ECKHARDT (1978), permet la visualisation rapide par électrophorèse du contenu plasmidique de souches d'*Escherichia coli*, de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium*.

Appliquée à un faible nombre de bactéries (environ 1 % de la quantité de cellules nécessaire dans la méthode d'HANSEN et OLSEN précédemment utilisée, PINET 1980), elle permet de mettre en évidence, grâce à la lyse directe des bactéries dans l'alvéole du gel d'agarose, les mégaplasmides de *Rhizobium meliloti*. Ces plasmides de grande taille étaient, dans les méthodes précédentes, éliminés du fait de contraintes physiques trop importantes.

Le traitement des bactéries au lysozyme qui produit des sphéroplastés, a lieu dans l'alvéole du gel (les cellules de *Rhizobium* sont préalablement sensibilisées à l'action du lysozyme par un traitement au sarkosyl 0,1 % - SCHWINGHAMER 1980).

La suspension de sphéroplastés est lysée par un détergent, le SDS, qui migre lentement au travers de celle-ci, grâce à un faible champ électrique.

Dès que les membranes sont complètement dissoutes, un champ électrique plus important fait pénétrer et migrer les molécules plasmidiques dans le gel. L'ADN n'étant pas manipulé au cours de l'expérience, les contraintes physiques sont réduites au minimum.

## B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le gel d'agarose peut être soit horizontal, soit vertical. Dans le premier cas, le gel présente deux rangées d'alvéoles séparées de quelques millimètres. Dans les alvéoles de la rangée la plus proche de l'anode sont placées les suspensions bactériennes traitées au lysozyme ; les alvéoles de la deuxième rangée sont remplies d'un mélange de SDS 1 % - agarose 0,4 % - bleu de bromophénol 0,05 %. SDS et bleu de bromophénol migrent au travers des suspensions de sphéroplastés vers l'anode. Dans le cas d'un gel vertical, les suspensions de sphéroplastés sont directement recouvertes du mélange SDS/agarose/bleu de bromophénol.

- 1°) Pour *Escherichia coli* : 100 µl d'une préculture à saturation (1 clone/5 ml de Luria - incubation toute la nuit, en agitation, à 30°C - D.O. de 3 à 5) sont placés dans un tube Eppendorf stérile. Ajouter 1 volume de tampon TE (Tris-HCl 50 mM - EDTA 20 mM - pH 8).
- 2°) Pour *Rhizobium* et *Agrobacterium* : les cultures bactériennes doivent se trouver en phase exponentielle de croissance. Mesurer la D.O. (600 nm) de la culture et mettre dans un tube Eppendorf l'équivalent de 0,5 ml de culture à D.O. égale à 0,3. Ajouter un volume de tampon Tris-HCl 50 mM - EDTA 20 mM - sarkosyl 0,2 % - pH 8).

Mélanger doucement par inversions et placer dans la glace.

Centrifuger 4 mn à température ambiante (centrifugeuse Eppendorf) puis éliminer immédiatement le surnageant à l'aide d'une seringue.

Le culot cellulaire est remis en suspension dans 60 µl de tampon d'électrophorèse (Tris 89 mM - EDTA 2,5 mM - Borate 89 mM - pH 8,3) contenant 25 % en saccharose, 1 unité/ml de RNase A et 1 mg/ml de lysozyme (ajouté au dernier moment).

La suspension est brièvement homogénéisée et immédiatement déposée dans une alvéole d'un gel d'agarose à 0,8 %.

Après quelques minutes d'attente, ajouter dans chaque alvéole 90 µl de mélange SDS/agarose/bleu de bromophénol (gel vertical) ou couler 80 µl de ce mélange par alvéole de la deuxième rangée (gel horizontal).

Faire migrer 45 mn à 20 V (jusqu'à ce que tous les débris membranaires aient complètement disparu) puis 2 h 30 à 130 V (gel vertical) ou 4 h à 130 V (gel horizontal).

## VI. - PRÉPARATION RAPIDE D'ADN PLASMIDIQUE

### A. - PRINCIPE

Cette méthode (GROSVELD *et al.* 1982) permet d'obtenir rapidement 1 µg d'ADN plasmidique par ml de culture bactérienne initial sans amplification au chloramphénicol et surtout sans purification en gradient de CsCl/BrEtd. L'ADN peut être utilisé dans des expériences soit de restriction enzymatique, soit de transformation bactérienne.

Les bactéries sont lysées par action combinée de la soude et du SDS. L'ADN plasmidique, du fait de sa forme superhélicoïdale, résiste à la dénaturation alcaline alors que les brins complémentaires de l'ADN chromosomique se séparent. Lors de la neutralisation en présence de SDS et d'une forte concentration en sels, l'ADN chromosomique brutalement renaturé, précipite avec les débris cellulaires.

### B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Une culture bactérienne de 5 ml (Luria sélectif), arrivée à saturation (incubation toute la nuit, en agitation, à 30°C), est centrifugée. Le culot est repris dans 200 µl de Tris HCl 25 mM - glucose 50 mM - 10 mM EDTA - pH 8.

Placer cette suspension bactérienne dans un tube Eppendorf stérile puis ajouter 400 µl de NaOH 0,2 M - SDS 1 % - Mélanger par inversions du tube - Laisser 5 mn à température ambiante.

Ajouter 200  $\mu$ l d'acétate de potassium 3 M - pH 4,8 - Mélanger par inversions - Laisser 5 mn dans la glace.

Centrifuger 2 fois 10 mn pour éliminer complètement le précipité.

Extraire les protéines avec 0,5 volume de phénol/0,5 volume de chloroforme puis 2 fois avec 1 volume de chloroforme.

Précipiter l'ADN avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M - pH 8 et 2,5 volumes d'éthanol 100 % - Placer 30 mn à - 70°C.

Laver le précipité à l'éthanol 70 % pour éliminer l'acétate de sodium.

Reprendre le culot d'ADN avec 50  $\mu$ l d'eau distillée.

L'ARN, présent en grandes quantités dans ces préparations, doit être éliminé par action de la RNase A (1  $\mu$ g de RNase A/ $\mu$ g d'ADN - incubé 5 mn à 37°C) juste avant électrophorèse.

## VII. - ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'AGAROSE

### A. - PRINCIPE

L'électrophorèse en gel d'agarose est actuellement la méthode la plus utilisée pour la séparation, l'identification et la purification de molécules d'ADN. Celles-ci, étant chargées négativement (groupements phosphate), migrent vers l'anode lorsqu'elles sont placées dans un gel traversé par un champ électrique, à une vitesse qui dépend de leur masse moléculaire et de leur encombrement stérique.

Les molécules d'ADN traversent un gel d'agarose à une vitesse qui est inversement proportionnelle au logarithme décimal de leur masse moléculaire (HELLING *et al.* 1974). On établit expérimentalement la relation suivante :

$$\log_{10} M.R. = A \log_{10} M.M. + B$$

- ou M.R. = migration relative mesurée sur le gel  
 M.M. = masse moléculaire d'une molécule - souvent l'inconnue que l'on calcule  
 A et B = constantes caractéristiques de l'électrophorèse, déterminées grâce à des molécules d'ADN témoins dont les masses moléculaires sont connues. Les molécules témoins doivent avoir la même configuration spatiale que les molécules dont on veut calculer les masses moléculaires.

Les molécules d'ADN plasmidique peuvent se présenter sous trois formes différentes : une forme superhélicoïdale et les formes circulaire ouverte et linéaire qui dérivent toutes deux de la forme superhélicoïdale respectivement par cassure(s) d'un ou des deux brins de l'ADN. Une préparation d'ADN plasmidique est généralement constituée d'un mélange de ces trois formes qui, bien qu'ayant la même masse moléculaire, n'ont pas les mêmes vitesses de migration dans le gel d'agarose en raison de leurs encombrements stériques différents.

Les migrations relatives de ces trois formes les unes par rapport aux autres dépendent de la concentration du gel en agarose. La forme circulaire ouverte est toujours la moins rapide (pour des plasmides de masse moléculaire supérieure à 30 Mdal., cette forme ne peut pénétrer dans le gel et reste au niveau du dépôt) ; la forme superhélicoïdale migre plus vite que la forme linéaire dans les gels de 0,4 à 0,6 % mais la situation est inversée de 0,8 à 1,2 % en agarose (au moins pour les plasmides de 4 à 10 Mdal.). Les concentrations voisines de 0,7 % sont à éviter car les formes superhélicoïdale et linéaire sont alors confondues.

Les molécules présentant à la fois la même masse moléculaire et la même configuration spatiale migrent à la même vitesse et forment une bande dans le gel qui peut être visualisée grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium. Ce colorant intercalant qui présente une forte affinité pour les acides nucléiques (ADN ou ARN)

émet une radiation rouge-orangée (590 nm - spectre visible) lorsqu'il est irradié en U.V. (260 nm ou 300 à 360 nm).

## B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les électrophorèses sont réalisées horizontalement (l/L/e : 10 cm - 21 cm - 0,8 cm - Biorad electrophoresis cell 1415) ou verticalement (14 cm - 16 cm - 0,3 cm - Biorad Protean cell).

L'agarose (Sigma, grade 1 - IBF indubiose A37NA) est dissous à chaud dans le tampon d'électrophorèse TBE (Tris 89 mM - EDTA 2,5 mM - Borate 89 mM - pH 8,3 - préparé et stocké à température ambiante, 12 fois concentré). Ce tampon d'électrophorèse permet d'obtenir un champ électrique élevé (jusqu'à 10 V/cm) sans provoquer d'échauffement excessif ou l'effondrement du gel (MEYERS *et al.* 1976). Les gels sont néanmoins réfrigérés pendant la durée de l'électrophorèse.

La concentration du gel en agarose varie suivant le type d'expérience envisagé, de 0,6 % (lyse directe sur le gel - visualisation soit de plasmides entiers, soit de gros fragments de restriction) à 0,8 - 1,2 % (cartographie de restriction).

Le bromure d'éthidium est :

- soit incorporé directement dans le gel d'agarose (qsp 0,5 µg/ml) ; le bromure d'éthidium en s'intercalant entre les bases de l'ADN de manières différentes suivant la conformation des molécules (voir purification de l'ADN plasmidique en gradient de CsCl/BrEtd) perturbe légèrement leurs migrations (environ 15 % de réduction pour une forme linéaire - MANIATIS *et al.* 1982), mais cet inconvénient est généralement négligeable comparé à la possibilité offerte d'examiner le gel pendant ou immédiatement après l'électrophorèse ;

- soit placé dans un bain (qsp 0,5 µg/ml) dans lequel est immergé le gel après électrophorèse (45 mn).

Le voltage appliqué (120 à 150 V) permet d'obtenir, suivant la concentration du gel et le type d'électrophorèse (horizontale ou verticale), des durées de 2 h à 4 h.

## VIII. - CROISEMENTS BACTÉRIENS

### A. - PRINCIPE

La mise en évidence et l'utilisation de la sexualité bactérienne furent à l'origine de nombreuses connaissances fondamentales concernant la structure et l'organisation de l'information génétique.

A la base de ces phénomènes sexuels de conjugaison bactérienne, on trouve un contact physique entre bactéries donatrice et réceptrice puis le passage de matériel génétique de l'une à l'autre grâce aux propriétés de transfert (gènes tra : "transfer ability") de facteurs sexuels.

Ceux-ci sont capables à l'état intégré de mobiliser tout ou partie du chromosome bactérien de la bactérie donatrice, ou à l'état de plasmide autonome :

- ou de s'autotransférer seul(s),
- ou de mobiliser certains fragments chromosomiques ou plasmidiques,
- ou de mobiliser un plasmide (mob<sup>+</sup> : mobilisable) de la souche donatrice. Dans ce dernier cas, le facteur sexuel (tra<sup>+</sup>) complète le plasmide mobilisé (mob<sup>+</sup>) en trans et est appelé plasmide "Helper" (voir mécanismes possibles de cette mobilisation dans la partie Discussion).

Tout ou partie de l'information génétique transférée est conservée par la bactérie réceptrice par recombinaison "légitime" (double cross-over, lorsqu'il existe des homologues entre informations exogène et endogène) ou "illégitime" (dans le cas d'éléments génétiques trans-

posables) ou lorsqu'elle fait partie d'un plasmide capable de s'y répliquer.

Des plasmides à large spécificité d'hôte ou comportant plusieurs ensembles différents de fonctions de réplication, natifs ou construits *in vitro*, auto-transférables ou simplement mobilisables peuvent ainsi passer et se maintenir dans des bactéries réceptrices taxonomiquement éloignées de la bactérie donatrice.

Les transferts conjugatifs constituent la seule voie d'accès à l'information génétique de nombreuses bactéries réfractaires à la transformation bactérienne.

#### B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Dans le cas d'un transfert conjugatif d'un plasmide par mobilisation, il convient de préciser que plasmides "Helper" et mobilisé ne doivent pas forcément se trouver dans la même souche avant croisement. Dans ces croisements triparentaux (2 souches donatrices - 1 réceptrice), une souche donatrice "hybride" contenant les deux plasmides se forme par passage du plasmide "Helper" d'une souche donatrice à l'autre. L'ensemble plasmide "Helper" - plasmide mobilisé se transfère ensuite dans la souche réceptrice.

Les précultures (milieux riches, sélectifs si possible) des souches donatrice(s) et réceptrice sont diluées (si nécessaire) de manière à obtenir en 2 ou 3 divisions bactériennes (pour *E. coli*) une densité optique comprise entre 0,3 et 1 (phase exponentielle de croissance) pour la (les) souche(s) donatrice(s) et entre 1 et 2 pour la souche réceptrice.

La (les) souche(s) donatrice(s) sont ensuite placées 30 mn à 37°C sans agitation.

Le croisement est réalisé en mélangeant  $5 \times 10^8$  bactéries de chacune des souches donatrice(s) et réceptrice et en filtrant la suspension sur une membrane de nitrocellulose stérile (Sartorius -

diamètre 35 mm - porosité 0,2  $\mu\text{m}$  ; appareil à filtrer Sartorius stérile).

Le filtre est ensuite déposé aseptiquement sur un milieu riche gélosé (Luria) non-sélectif et incubé à 30°C pendant 3 à 22 h.

Après incubation, les bactéries sont remises en suspension dans 10 ml de milieu minimum et lavées deux à trois fois avec ce même milieu pour éliminer toute trace de milieu riche.

En dernier lieu, les bactéries sont remises en suspension dans 5 ml de milieu minimum et étalées après dilution sur les milieux appropriés.

## IX. - ENZYMES DE RESTRICTION

### A. - PRINCIPE

Les endonucléases de restriction reconnaissent des séquences spécifiques de bases (site de reconnaissance de l'enzyme) sur l'ADN bicaténaire et coupent (restriction) à proximité ou au niveau de leur(s) site(s) de reconnaissance s'il(s) n'est ou ne sont pas protégé(s) par méthylation (modification).

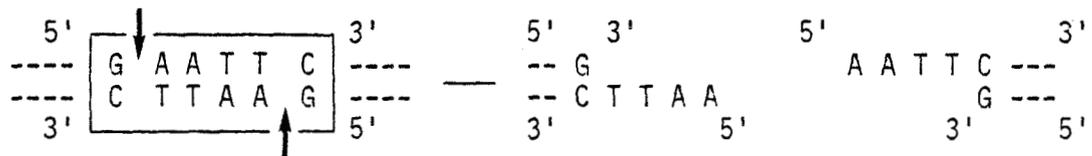
Ces systèmes de restriction et de modification sont à la base des mécanismes de préservation de la spécificité génétique des espèces bactériennes ; la modification protège l'information endogène de l'activité des enzymes de restriction cellulaires qui découpent en morceaux tout ADN exogène "étranger" (non méthylé aux sites de reconnaissance des endonucléases cellulaires).

La spécificité de l'interaction de certaines endonucléases de restriction avec l'ADN *in vitro* a fait de ces enzymes des outils particulièrement précieux en biologie moléculaire.

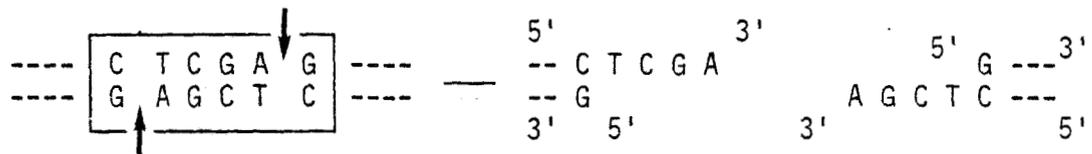


Les enzymes de type 2 sont les seules qui soient utilisables en biologie moléculaire et tout particulièrement dans les expériences de clonage. Elles coupent près de ou dans leur séquence de reconnaissance qui a quatre ou six nucléotides de longueur et un double axe de symétrie. Les coupures décalées de part et d'autre de l'axe de symétrie produisent des "extrémités cohésives" se terminant soit en 5' (ex. : EcoRI), soit en 3' (ex. : PstI).

Ex. : EcoRI



PstI

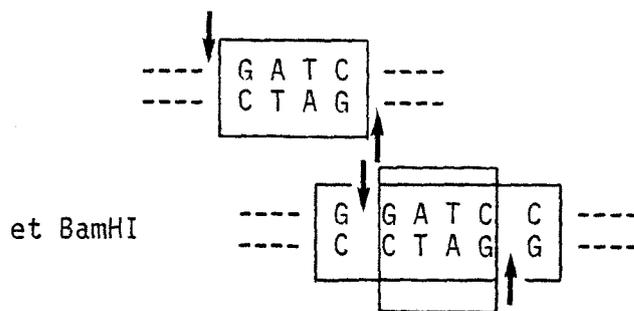


D'autres enzymes de type 2 coupent au niveau de l'axe de symétrie dans les deux brins de l'ADN et donnent naissance à des "bouts francs".

Les extrémités produites sont spécifiques de l'enzyme. Indépendantes de l'origine de l'ADN elles sont à la base des expériences de recombinaison de l'ADN *in vitro*.

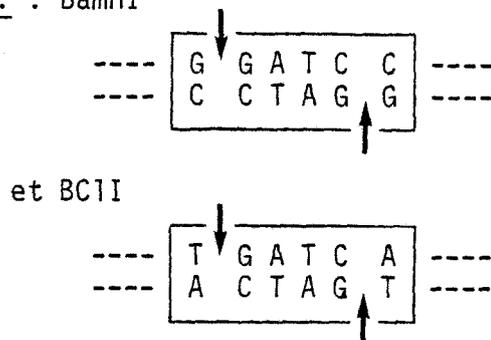
En général, les enzymes de type 2 d'origines différentes, ont des sites de reconnaissance différents. Toutefois, il existe des "isochizomères" qui reconnaissent la même séquence spécifique (ex. : XmaI et SmaI isolées respectivement de *Xanthomonas malvacearum* et de *Serratia marcescens*). Il arrive également que les séquences tétranucléotidiques de certaines enzymes soient incluses dans les sites de reconnaissance hexanucléotidiques d'autres enzymes.

Ex. : MboI et Sau3A (isoschizomères) reconnaissent la séquence



D'autres enzymes produisent, comme dans le cas précédent, des extrémités cohésives compatibles bien qu'elles aient cette fois des sites de reconnaissance différents.

Ex. : BamHI



Ces quelques cas particuliers, loin de compliquer les choses, ne font que multiplier les possibilités de recombinaison et de manipulation de l'ADN *in vitro*.

## B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

### 1 - Digestion enzymatique simple

Les endonucléases de restriction utilisées (type 2) sont commercialisées par Boehringer, Bethesda Research Laboratories, Sigma. Elles sont conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  et doivent séjourner un minimum de temps à température ambiante lors des prélèvements des volumes nécessaires aux réactions enzymatiques. Des embouts de pipette automatique propres et stériles doivent être utilisés pour chaque prélèvement

afin d'éviter la contamination du tube entier par de l'ADN ou une autre enzyme.

Chaque endonucléase a besoin de conditions particulières de réaction. Les principales variables, la température et la composition du tampon de réaction, sont spécifiées par le fabricant. Cependant, les différences de composition sont souvent peu importantes ; aussi est-il commode de diviser les endonucléases commercialisées en trois grands groupes suivant la force ionique - faible, moyenne ou forte - de leur tampon de réaction (voir "core buffers" de Bethesda Research Laboratories ; MANIATIS *et al.* 1982).

COMPOSITION DES TAMPONS DE REACTION DES ENDONUCLEASES  
COMMERCIALISEES (MANIATIS *et al.* 1982)

Force ionique	Composition	NaCl	Tris-HCl pH 7,5	MgCl <sub>2</sub>	DTT
faible		0	10	10	1
moyenne		50	10	10	1
forte		100	50	10	1

DTT : dithiothreitol

Valeurs du tableau en mM

Il ne faut ainsi préparer que trois tampons de réaction différents ; ceux-ci sont conservés à - 20°C, 10 fois concentrés.

Les digestions enzymatiques sont réalisées en tube Eppendorf (1,5 ml) stériles. De 0,2 à 1 µg d'ADN sont chaque fois soumis à 1 unité d'endonucléase dans un volume final de 20 à 50 µl. Une unité d'enzyme est par définition la quantité nécessaire à la digestion totale d'un microgramme d'ADN en une heure, dans 20 µl finaux et dans les conditions optimales de température et de tampon de réaction.

Cependant l'origine de l'ADN intervient également et si, par exemple, il suffit bien d'une unité de SstII pour digérer totalement 1  $\mu$ g d'ADN de phage lambda ou d'adénovirus en une heure, plus de 10 unités de cette même enzyme ne parviendront à couper que 30 % de l'ADN du phage  $\phi$ X174 RF dans les mêmes conditions (voir fiche technique SstII).

Les excès, soit d'enzyme, soit de durée de réaction, ne nuisent pas au résultat obtenu. La réaction est hautement spécifique. Etant donné le prix de ces enzymes, la surconsommation est quand même à éviter. L'augmentation du temps de réaction peut permettre d'obtenir une digestion complète si nécessaire. Pour la cartographie de restriction, les digestions partielles sont au contraire bien utiles pour localiser les fragments les uns par rapport aux autres. Par contre, pour les expériences de clonage, il est utile d'augmenter à la fois la quantité d'enzyme et la durée d'incubation afin d'éviter le "bruit de fond" résultant de digestions incomplètes.

Les températures et compositions des tampons d'incubation, optimisées et fixées par le fabricant, sont d'un point de vue pratique tout à fait relatives. Mis à part les trois groupes de tampons de réaction simplifiés précédemment évoqués, il est possible, par exemple, de jouer sur la température d'incubation pour obtenir des digestions partielles avec des enzymes sensibles aux différences de température, ou pour simplifier la manipulation ; BclI, par exemple, qui agit normalement à une température de 50-60°C, ne semble pas affectée par une incubation à 37°C.

De même, les conditions de réaction sont optimisées jusqu'à preuve du contraire ; BOEHRINGER qui commercialise Pst I, s'est par exemple aperçu qu'on pouvait multiplier l'activité endonucléasique de l'enzyme par trois, en ajoutant du sulfate d'ammonium dans le tampon de réaction qu'il préconisait.

Des températures élevées (65°C - 10 mn ; 70°C - 5 mn) inactivent les endonucléases (certaines sont résistantes à 65°C). De même, des concentrations supérieures à 10 % en glycérol ou à 10 mM en EDTA inhibent la réaction enzymatique (les endonucléases sont conservées à - 20°C dans un tampon contenant 50 % de glycérol ;

l'EDTA chélate les ions  $Mg^{++}$  qui sont indispensables à la réaction). Ces propriétés sont utilisées pour interrompre les réactions.

## 2 - Doubles, triples digestions

Quand l'ADN doit être coupé par plus d'une endonucléase (clonage directionnel, cartographie de restriction, ...), les digestions peuvent être réalisées simultanément si les enzymes réagissent dans le même tampon. Sinon, il faut commencer par l' (les) enzyme(s) qui travaille(nt) dans le tampon ayant la force ionique la plus faible puis ajuster la force ionique grâce aux tampons de réaction dix fois concentrés.

Il est possible également de précipiter l'ADN entre chaque digestion (ajouter 2 volumes d'éthanol à  $-20^{\circ}C$  et placer 30 mn à  $-20^{\circ}C$ ) puis de redissoudre l'ADN dans le tampon de réaction de l'enzyme suivante.

## X. - CLONAGE

### A. - PRINCIPE

La notion de clonage évoque la propagation d'un fragment d'ADN étranger dans une population de bactéries réceptrices. Puisque généralement incapables de s'y maintenir tout seul, les gènes étrangers doivent être préalablement insérés ("clonés") *in vitro* dans un vecteur qui assure leur maintien dans les bactéries.

Il convient de remarquer que l'idée même d'expression des gènes clonés est absente de la seule notion de clonage (voir "vecteurs d'expression" - MANIATIS *et al.* 1982, BERNARD et HELINSKI 1980). Apparaît ici une différence importante existant entre modification du contenu en ADN d'une bactérie et modification de son information génétique.

Un vecteur plasmidique de clonage doit impérativement présenter certaines qualités :

- 1) le plasmide doit être facile à préparer et à utiliser *in vitro* ; un plasmide amplifiable, d'une taille inférieure à 15 kb et corrélativement, une bactérie non-pathogène, croissant rapidement et se lysant facilement, sont indispensables en pratique ;
- 2) il doit posséder un ou plusieurs sites uniques de restriction utilisables pour le clonage ; l'insertion ne doit pas affecter les fonctions de répllication du plasmide ;
- 3) des marqueurs génétiques (le plus souvent des gènes de résistance aux antibiotiques), inactivés ou non par l'insertion d'ADN aux sites de clonage, doivent permettre la sélection des bactéries réceptrices transformées (voir plus loin "transformation bactérienne") et le maintien du vecteur dans la population bactérienne (pression de sélection).

Le clonage consiste simplement :

- a) à couper le vecteur et l'ADN que l'on veut y insérer par la (les) même(s) endonucléase(s) ou tout au moins, par des enzymes produisant des extrémités compatibles ;
- b) à mettre en présence les deux ADN ; des liaisons hydrogène se créent spontanément entre les bases complémentaires d'extrémités cohésives compatibles ;
- c) à reconstituer un squelette continu entre les deux ADN différents ; la T4 - DNA Ligase catalyse la formation de liaisons phosphodiester et "soude" les deux ADN ;
- d) à transformer des cellules bactériennes "compétentes" (aptées à recevoir de l'ADN) avec le mélange et à sélectionner, grâce au(x) marqueur(s) génétique(s) du vecteur, les bactéries transformées. En l'absence de marqueur génétique sur l'ADN cloné dans le vecteur, le problème est de faire la différence entre les bactéries ayant reçu un vecteur reconstitué (sans fragment inséré) et celles qui contiennent un plasmide hybride. Plusieurs techniques, utilisées

au cours de ce travail, permettant de limiter la recircularisation parasite du vecteur et de sélectionner les clones contenant un plasmide recombinant, sont brièvement présentées ci-dessous.

## 1 - Conditions de la réaction de ligature

En jouant sur le volume de la réaction de ligature (action de la ligase), sur les concentrations relatives des deux ADN et de leurs extrémités cohésives (pour une même quantité d'ADN, plus les molécules sont grandes, moins il y a d'extrémités cohésives), il est possible de plus favoriser les appariements intermoléculaires (formation d'hybrides) qu'intramoléculaires (recircularisation du vecteur sur lui-même).

## 2 - Inactivation d'un marqueur génétique par insertion

Dans l'exemple présenté à la figure 1, l'insertion au site de clonage Bam HI du vecteur pBR322 inactive le gène de résistance à la tétracycline. La sélection des clones résistants à l'ampicilline puis sensibles à la tétracycline permet successivement de sélectionner les bactéries transformées et parmi elles, celles qui contiennent un vecteur hybride.

Sortant du schéma théorique traditionnel où tout marche toujours trop bien, il faut remarquer que ce plasmide hybride peut n'être constitué que de deux pBR322 ligaturés ensemble. Deux orientations différentes des plasmides, l'un par rapport à l'autre, sont possibles : l'une reconstitue un gène de résistance à la tétracycline fonctionnel, l'autre un gène inefficace. Dans ce dernier cas, le clone\* est bien résistant à l'ampicilline et sensible à la tétracycline, le plasmide est bien hybride mais il ne nous intéresse pas. De même, la recircularisation du vecteur sur lui-même ne reconstitue pas toujours un gène de résistance fonctionnel (BOLIVAR 1978, MORROW 1979). Il est courant de constater que lors de clonage dans le gène de résistance à la tétracycline du pBR322, 10 % des clones sensibles à la tétracycline (et ampicilline résistants) ne contiennent qu'un vecteur

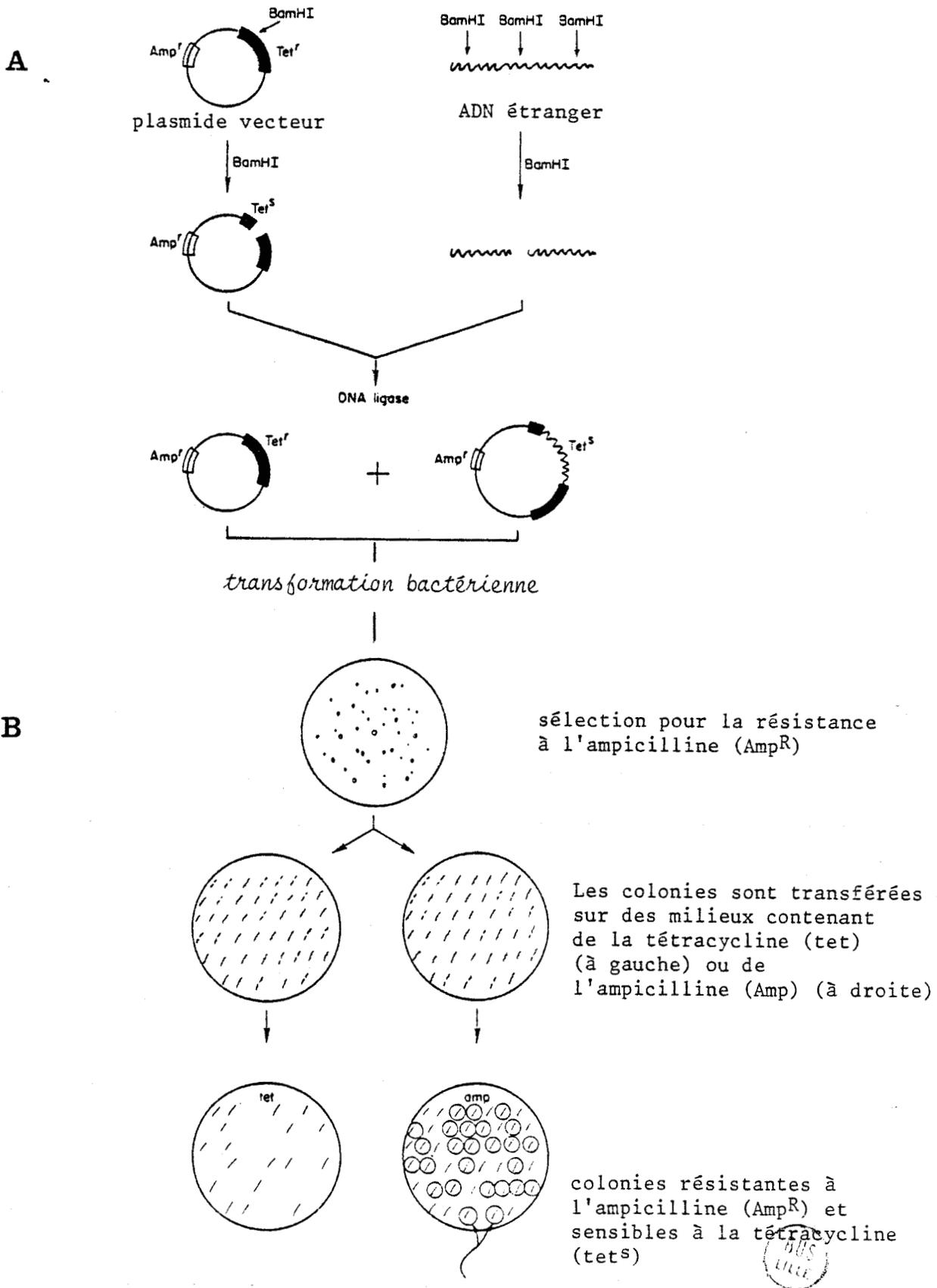


FIGURE 1 - INACTIVATION D'UN MARQUEUR GENETIQUE PAR INSERTION

A : insertion *in vitro* d'ADN au site BamHI du vecteur plasmidique pBR322

B : sélection des bactéries transformées ayant reçu un vecteur, conférant la résistance à l'ampicilline, dont le gène de résistance à la tétracycline a été inactivé par l'insertion.

reconstitué. Le gène de résistance n'est pas fonctionnel sans doute à la suite de phénomènes de délétion. Des cas inverses ont déjà été observés : l'insertion d'un c-DNA\* au site PstI du pBR322 n'a pas inactivé le gène de résistance à l'ampicilline sans doute en raison d'une complémentation par le fragment cloné des fonctions altérées par l'insertion (VILLA-KOMAROFF *et al.* 1978). De même, le clonage au site Hind III du pBR322 inactive le promoteur et empêche l'expression du gène de résistance à la tétracycline. Cependant, dans certains cas, des réarrangements génétiques intraplasmidiques ou l'insertion d'éléments génétiques transposables conduisent à la reconstitution d'un gène fonctionnel (BRUNEL *et al.* 1983).

Le clonage dans le pBR322 semble être particulièrement problématique en raison de tous ces phénomènes secondaires qui viennent interférer. Mais il faut signaler que ce plasmide est un des plus utilisés en biologie moléculaire et de ce fait un des plus connus. C'est pour cela qu'il semble présenter beaucoup de défauts.

Cette méthode de sélection ne concerne que les vecteurs contenant au moins deux marqueurs génétiques. C'est l'une des plus courantes mais malgré sa simplicité, elle peut réserver quelques surprises.

### 3 - Clonage directionnel

Les vecteurs présentent généralement plus d'un site de clonage. Un moyen d'éviter la recircularisation du vecteur consiste à le couper par deux enzymes produisant des extrémités qui ne seront pas compatibles. La forme linéaire du vecteur ne pourra pas se reformer sous l'action de la ligase et aura une efficacité de transformation très faible. Une forme circulaire viable n'est produite à partir de ce vecteur linéarisé que lorsqu'un fragment présentant des extrémités cohésives compatibles avec celles du vecteur, vient les réunir (fig. 2).

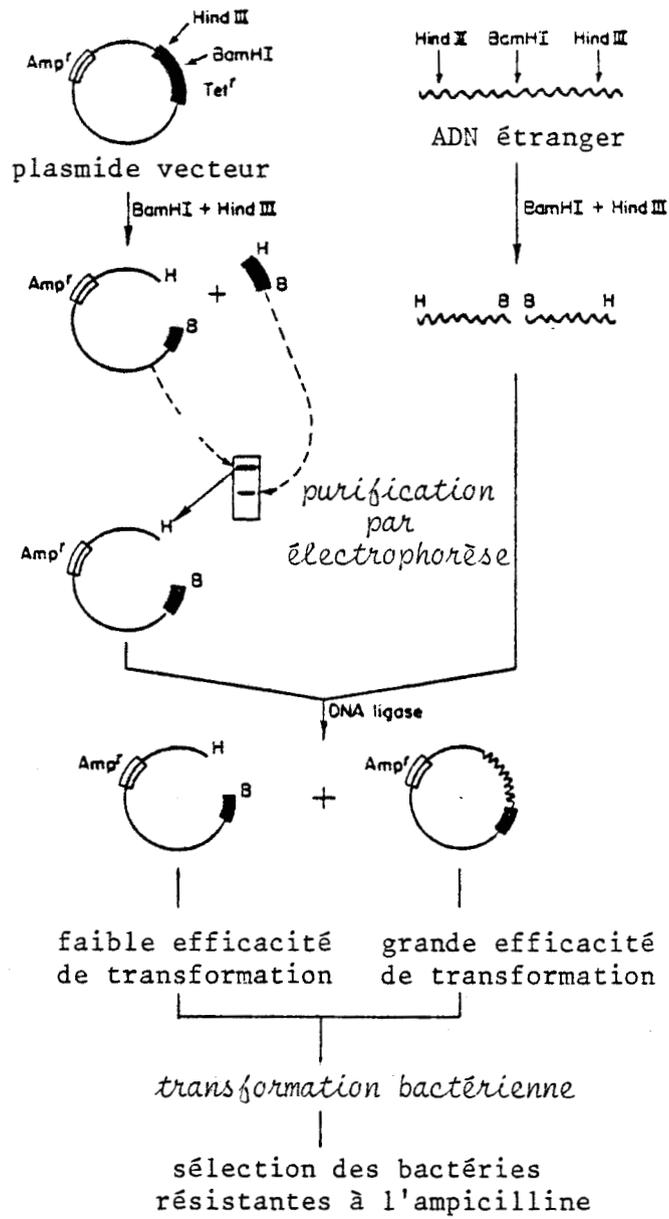


FIGURE 2 - CLONAGE DIRECTIONNEL AUX SITES *Hind* III ET *Bam* HI DU pBR322

Les deux sites de restriction doivent être situés relativement proches l'un de l'autre. L'élimination du plus petit des fragments est impérative car, étant donné sa petite taille, il viendrait s'insérer préférentiellement dans sa position initiale, au détriment du fragment à cloner.

Ce clonage est directionnel puisque, contrairement au clonage habituel dans un seul site de restriction dans lequel le fragment inséré peut présenter deux orientations différentes, il ne peut ici se placer que d'une seule façon, en raison des extrémités produites différentes.

#### 4 - Déphosphorylation du vecteur linéaire

La DNA ligase ne catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre deux nucléotides adjacents que lorsque l'un des nucléotides présente un groupement phosphate en 5' et l'autre un groupement hydroxyl en 3'. Il est possible de minimiser la recircularisation du vecteur sur lui-même ou sa polymérisation en enlevant les groupements phosphate en 5' de chaque extrémité du vecteur grâce à une phosphatase. Un fragment d'ADN présentant des extrémités cohésives compatibles avec celles déphosphorylées du vecteur et des groupements phosphate en 5' peut être ligaturé avec le vecteur et produire ainsi une forme circulaire hybride. L'efficacité de transformation de ce plasmide qui présente deux discontinuités dans son squelette (fig. 3) est légèrement inférieure à celle d'un ADN plasmidique sous forme superhélicoïdale (voir "transformation bactérienne") mais est de beaucoup supérieure à celle du vecteur resté linéaire. Presque tous les clones transformés contiennent des plasmides recombinants (la recircularisation d'une forme linéaire *in vivo* est possible).

Cette sélection directe des plasmides contenant un fragment cloné autorise l'insertion d'ADN dans un site de clonage situé en dehors de marqueurs génétiques, ce qui serait autrement techniquement difficile à réaliser (au niveau des bactéries transformées, le seul critère de sélection applicable serait des différences de taille entre plasmides recombinants et recircularisés).

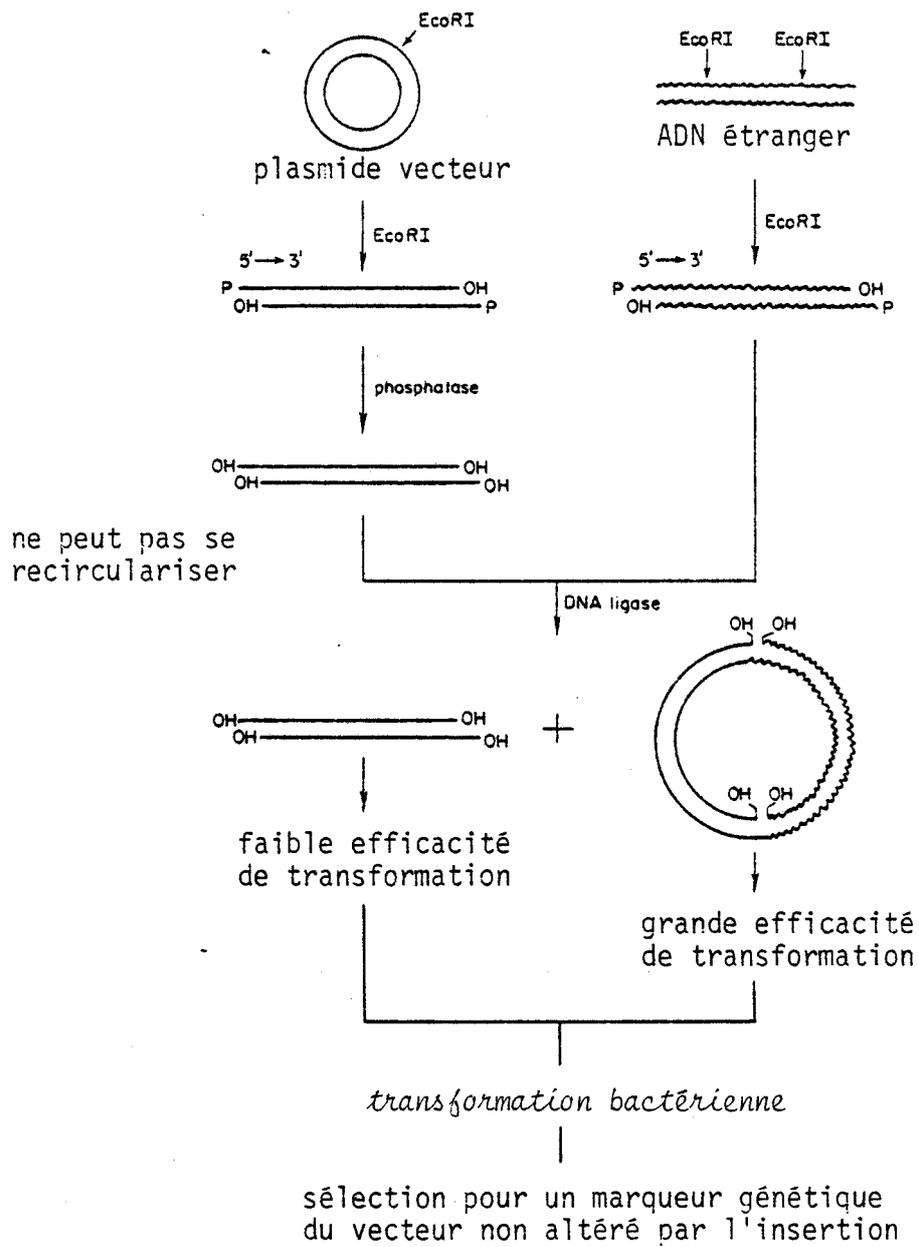


FIGURE 3 - DEPHOSPHORYLATION DU VECTEUR LINEAIRE

(les deux chaînes de l'ADN sont ici représentées)

## B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

### 1 - Conditions de la réaction de ligature

Les enzymes de restriction et la ligase (T4-DNA-Ligase ; Boehringer) travaillent en sens opposés. Il est donc nécessaire d'éliminer toute activité endonucléasique de la préparation avant ligature, soit par inactivation thermique (70°C - 10 mn), soit par dénaturation et extraction des protéines enzymatiques au phénol/chloroforme.

La ligase est inhibée par des concentrations en sels supérieures à 75 mM. Il faut donc, soit diluer les tampons de réaction des endonucléases utilisées, soit précipiter l'ADN avant de le redissoudre dans le tampon de réaction de la ligase.

Un rapport - extrémités cohésives de l'ADN à cloner / extrémités cohésives du vecteur - égal ou supérieur à 3 permet de minimiser la recircularisation du vecteur.

Des volumes faibles de réaction (10-20 µl) favorisent les rencontres aléatoires entre extrémités cohésives de molécules différentes. Des volumes plus importants (supérieurs à 50 µl, pour la même quantité d'ADN) facilitent plutôt la réunion des extrémités cohésives d'une même molécule. Cette recircularisation, à éviter dans le cas d'une expérience de clonage, peut être désirée dans d'autres circonstances (ex. : création de mutants de délétion...).

La quantité totale d'ADN par réaction doit être d'environ 1 microgramme.

Liaisons entre extrémités cohésives	intramoléculaires	intermoléculaires	polymères
Concentrations finale en ADN	10-20 ng/µl	50-100 ng/µl	< 200 ng/µl
Utilisation	recircularisation du vecteur	formation de plasmides hybrides	clonage dans des cosmides

La concentration en enzyme de la préparation commerciale, la composition du tampon de réaction et la quantité de T4-DNA-Ligase à utiliser par réaction, sont spécifiées par le fabricant.

Les températures et durées d'incubation sont très variables suivant les sources (de 37°C à 4°C et de 2 h à plusieurs jours). Un à trois jours d'incubation à 4°C donnent de bons résultats.

## 2 - Clonage directionnel

Lorsque les deux sites de restriction utilisés sont très proches l'un de l'autre, le petit fragment d'ADN non-désiré, générateur d'interférences, peut être éliminé par précipitation sélective. En effet, les fragments d'une taille inférieure à 100 bp précipitent très mal à l'éthanol. Cela évite une purification fastidieuse du vecteur par électrophorèse.

## 3 - Déphosphorylation

Après restriction du vecteur, vérifier la coupure par électrophorèse. Les digestions partielles sont absolument à éviter - Augmenter les quantités d'endonucléases et les durées d'incubation. L'absence de formes superhéliçoidales et circulaires ouvertes du vecteur, constatée par électrophorèse, est une condition strictement nécessaire (mais malheureusement pas toujours suffisante).

Ajuster à 10 mM en EDTA et 0,1 % en SDS ; l'élimination par déprotéinisation des enzymes de restriction sera plus facile et entraînera moins de pertes en ADN.

Extraire les protéines une fois avec 0,5 volume de phénol saturé en Tris-HCl 100 mM - pH 8 et 0,5 volume de chloroforme, puis 2 fois avec un volume de chloroforme. Il est possible d'extraire l'ADN piégé dans la phase phénolique avec un volume de TE (Tris-HCl 1 mM - EDTA 1 mM - pH 8).

Précipiter l'ADN avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2,5 volumes d'éthanol - placer 30 mn à - 70°C.

Après lavage à l'éthanol à 70 %, reprendre le culot dans 100 µl de Tris-HCl 10 mM - pH 8 (WAIN-HOBSON *et al.* 1983) - Ajouter 0,01 unité de phosphatase alcaline de l'intestin de veau (Boehringer) pour 1 picomole d'extrémités 5' ou 3' (1 picomole d'extrémités d'un ADN linéaire de 4 kb est égale à 1,6 µg - MANIATIS *et al.* 1982).

Incuber 45 mn à 37°C puis extraire les protéines 2 fois avec 0,5 volume phénol/0,5 volume de chloroforme et 3 fois avec 1 volume de chloroforme.

Précipiter l'ADN à l'éthanol et reprendre le culot dans du TE à la concentration finale de 1 µg/µl.

## XI. - TRANSFORMATION BACTÉRIENNE

### A. - PRINCIPE

La caractéristique principale du génie génétique est certainement le passage et la manipulation du support de l'information génétique *in vitro*. L'extraction de l'ADN à partir de cellules vivantes marque le passage de l'information génétique *in vitro*, là où travaillent de nombreuses enzymes de la cellule mais dans un sens et une séquence voulus par l'homme.

La transformation bactérienne est le pendant de l'extraction, la méthode qui permet le retour *in vivo*.

En observant l'augmentation de la pénétration de l'ADN de phage lambda dans des cellules bactériennes, MANDEL et HIGA (1970) furent à la base des méthodes de transformation bactérienne. COHEN *et al.* (1973) démontrèrent que le traitement au CaCl<sub>2</sub> permettait également l'introduction d'ADN plasmidique dans des bactéries.

Les méthodes actuelles optimisées du point de vue efficacité de transformation, permettent d'obtenir de  $10^5$  à  $10^7$  bactéries transformées (ayant reçu de l'ADN) par microgramme d'ADN de pBR322 sous forme superhélicoïdale. Cette fréquence peut paraître impressionnante mais il faut réaliser qu'un microgramme de plasmide de 4 kb correspond à quelques  $10^{11}$  molécules ; au mieux, un plasmide environ sur 10 000 arrive donc à destination. Très peu de bactéries traitées au  $\text{CaCl}_2$  sont vraiment "compétentes".

L'efficacité de transformation, pour une souche donnée, est fonction de la configuration spatiale, de la taille (masse moléculaire), de l'ADN transformant et de la compétence des cellules réceptrices.

Le  $\text{CaCl}_2$  doit désorganiser localement les barrières physiques séparant l'intérieur de la bactérie du milieu extracellulaire. Plus une molécule d'ADN est petite et compacte mieux elle arrive à pénétrer dans la bactérie grâce à ces discontinuités et à un choc thermique. Pour un même plasmide, les formes superhélicoïdales sont les plus efficaces, viennent ensuite les formes circulaires ouvertes (75 % du rendement des formes superhélicoïdales) et très loin derrière, les formes linéaires (0,4 %/formes superhélicoïdales) (HANAHAN 1983). Pour une même configuration spatiale, le rendement de transformation diminue linéairement en fonction de l'augmentation de la masse moléculaire (HANAHAN 1983). Lorsque le clonage de grands fragments est nécessaire (ex. : établissement de banques de gènes), il est préférable d'utiliser un vecteur cosmique (plasmide + site cos du phage lambda) et l'encapsidation *in vitro*. Dans ces cas extrêmes, l'insertion classique de tels fragments dans un vecteur ainsi que la transformation bactérienne ne sont pas réalisables (voir MANIATIS *et al.* 1982, WAIN-HOBSON *et al.* 1983).

La compétence des cellules réceptrices évolue en fonction du temps ; l'efficacité de transformation augmente de 4 à 6 fois lorsque les bactéries sont maintenues dans le  $\text{CaCl}_2$  à  $4^\circ\text{C}$  pendant de 12 à 24 h (DAGERT et EHRLICH 1979) ; elle diminue ensuite pour retrouver sa valeur initiale 24 h après.

## B. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La souche réceptrice doit être déficiente du point de vue des systèmes de restriction et de recombinaison ( $r^-$ ,  $m^-$ ,  $recA$  - les phénomènes de recombinaison ne sont quand même pas toujours évités - TOMILIN et HOFEMEISTER 1982).

Le  $CaCl_2$  a une action délétère sur les bactéries (plus ou moins sensibles suivant les souches), aussi est-il nécessaire :

- de maintenir pipettes,  $CaCl_2$ , tubes - et les bactéries dans la glace,
- de ne pas "vortexer" les souches HB101 et C600 en présence de  $CaCl_2$  (les souches GM272 et GM161, beaucoup moins fragiles, doivent au contraire être un peu malmenées).

Inoculer 100 ml de Luria (fiolle de 250 ml) avec de 1 à 3 ml (suivant la D.O.) d'une préculture de la souche réceptrice. Mettre en incubation à 30°C (idéalement 37°C) sous agitation vigoureuse.

Lorsque la densité optique (600 nm) atteint la valeur de 0,6 - 0,7 (la culture doit être en phase exponentielle de croissance), récupérer les bactéries par centrifugation (5 mn - 7 000 tpm - 0°C).

Reprendre le culot dans 0,5 volume de  $CaCl_2$  100 mM (non tamponné) froid.

Centrifuger comme précédemment et reprendre le culot dans 0,5 volume de  $CaCl_2$  froid - Laisser de 20 à 30 mn dans la glace.

Centrifuger et reprendre dans 1/20ème (du volume initial) de  $CaCl_2$  100 mM - conserver les bactéries dans un tube à hémolyse en verre, dans la glace, jusqu'au lendemain.

- Mélanger :
- 2 volumes de bactéries compétentes
  - 1 volume d'ADN (réaction de ligature, par exemple).

Laisser 15 mn dans la glace.

Choc thermique : 30 s. - 37°C/30 s. - 0°C, cinq fois.

Diluer au 1/10ème avec du Luria (non-sélectif) et incubé de 45 mn à 1 h 30 (30 ou 37°C, agitation vigoureuse).

Etaler 100 µl par boîte de Pétri.

Incuber à 37°C pendant la nuit.

## RESULTATS

## I. - pRme 19a

## A. - DETECTION

La souche M19S de *Rhizobium meliloti* contient 3 plasmides, pRme 19a (plasmide - p - le plus petit - a - de la souche M19S - 19 - de *Rhizobium* - R - *meliloti* - me - ROSENBERG *et al.* 1981 ; environ 7,5 kb), pRme 19b (environ 220 kb) et pRme 19c (Mégaplasmide > 700 kb) (photo 4). Mises en évidence au cours d'une étude systématique du contenu plasmidique des souches de *R. meliloti* du laboratoire (PINET 1980), cette souche et surtout la fréquence d'apparition et la taille du pRme 19a retinrent l'attention. En effet, sur les quelques 50 souches étudiées, une seule présentait un plasmide d'une masse moléculaire aussi faible (la masse moléculaire du pRme 19a est de 5 à 6 fois plus faible que celle du plasmide que l'on considérerait comme le plus petit chez *Rhizobium*). PÜHLER *et al.* (1982) ont depuis décrit 2 souches présentant un plasmide de masse moléculaire identique à celle du pRme 19a, sur 250 souches de *R. meliloti* isolées dans la région de Cologne (Allemagne).

Sans préjuger des implications biologiques de ces plasmides cryptiques\*, les deux laboratoires se sont lancés pragmatiquement dans l'exploitation de leurs fonctions de répllication chez *Rhizobium*.

Nous présentons dans ce travail la construction, à partir du pRme 19a, d'un plasmide utilisable comme vecteur de clonage chez *Rhizobium* mais également chez *Agrobacterium*.

## B. - ISOLEMENT

Au cours de notre travail de D.E.A., nous avons expérimenté plusieurs méthodes de préparation d'ADN plasmidique adaptées à *Rhizobium* (FACON 1981). Ces méthodes se sont révélées plus inadéquates les unes que les autres, produisant des quantités dérisoires d'un mélange des pRme 19 a et b qu'il était nécessaire de purifier par électrophorèse

(séparation suivant la masse moléculaire) après ultracentrifugation en CsCl/BrEtd (séparation suivant la configuration spatiale de l'ADN). Le rendement final en pRme 19a était tellement faible qu'il fallait produire en fermenteur la masse cellulaire nécessaire à la production des quelques microgrammes d'ADN utilisés dans les premiers essais de cartographie de restriction.

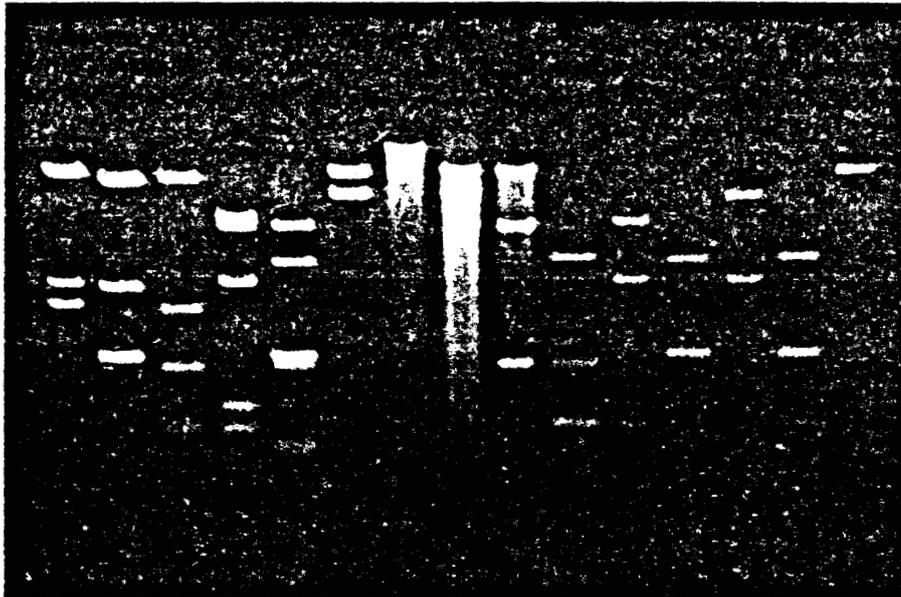
Paradoxalement, une méthode utilisée chez *Escherichia coli* pour la préparation de vecteurs plasmidiques de petite taille (< 22 kb), nous donna satisfaction. Appliquée à une culture de *R. meliloti* M19S en phase exponentielle de croissance, elle permet d'obtenir sélectivement l'ADN du pRme 19a, avec un rendement d'environ 50 µg/200 ml de culture bactérienne, ce qui est correct pour un plasmide non-amplifiable au chloramphénicol. Les plasmides de grande taille, en particulier pRme 19 b et c restent coincés dans les débris cellulaires et sont totalement éliminés. La culture bactérienne doit impérativement avoir une densité optique (600 nm) inférieure à 1 ; au-delà, des modifications physiologiques intervenant en particulier au niveau de la paroi bactérienne affectent les conditions de lyse et le rendement.

### C. - CARTE DE RESTRICTION

Les enzymes de restriction suivantes ne coupent pas pRme 19a : BamHI, BglII, Bst EII, EcoRI, Hind III, KpnI, PstI, SmaI, XbaI.

SalI, BclI et ClaI coupent pRme 19a respectivement en 1, 2 et 5 points (photo 1, B). La carte de restriction du pRme 19a, présentée à la figure 4, situe, les uns par rapport aux autres, les différents fragments de restriction produits en simples et doubles digestions par les enzymes BclI, ClaI et SalI.

dépôts



1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6
pBRRM 1									pRme 19 a					
M19S					C600				M19S					

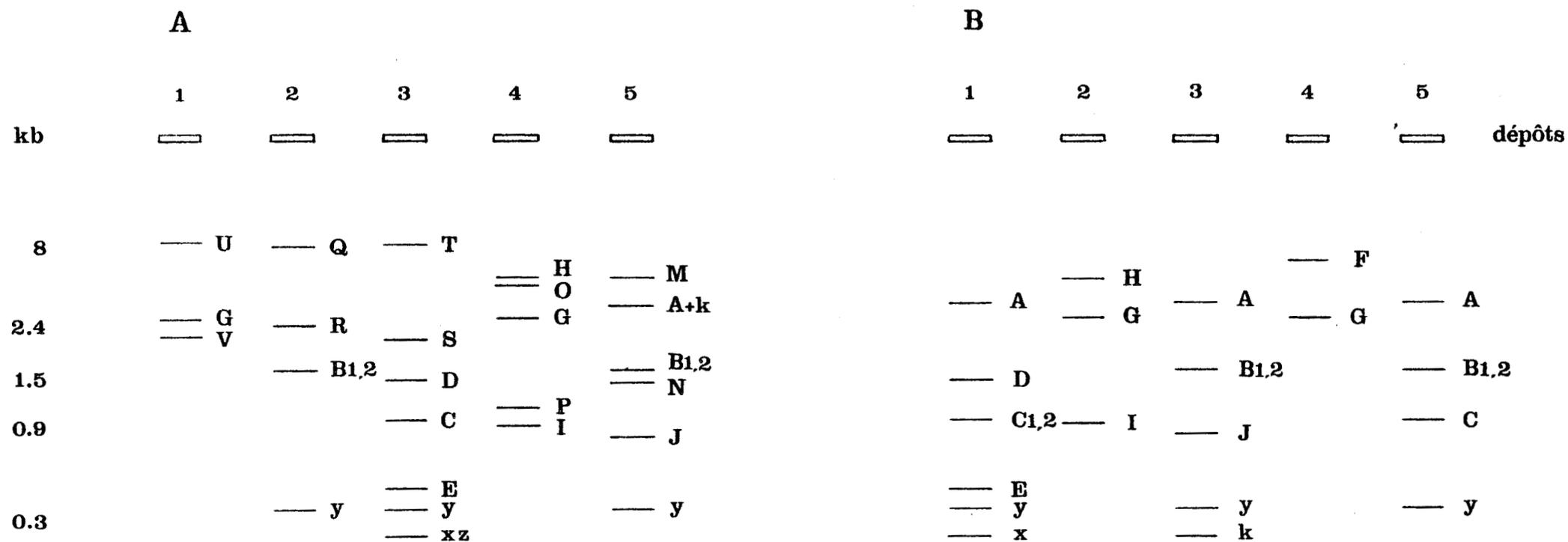
PHOTO 1 - PROFILS DE RESTRICTION DES PLASMIDES pRme 19a et pBRRM1  
(ISOLE DE RHIZOBIUM MELILOTI M19S ET D'ESCHERICHIA COLI  
C600) POUR LES ENDONUCLEASES BclI, ClaI et SalI

Electrophorèse horizontale en gel d'agarose (1,2 %)  
(tampon TBE, 2 H 45 - 150 V)

De gauche à droite :

- pBRRM1 isolé de *R. meliloti* M19S :  
1. BclI ; 2. ClaI ; 3. BclI - ClaI ; 4. BclI - SalI ; 5. SalI - ClaI
- pBRRM1 isolé d'*E. coli* C600 :  
1. SalI ; 2. ClaI ; 3. BclI - SalI ; 4. SalI - ClaI
- pRme 19a isolé de *R. meliloti* M19S :  
1. BclI - ClaI ; 2. BclI - SalI ; 3. SalI - ClaI ; 4. BclI ; 5. ClaI ;  
6. SalI





Représentation schématique de la photo 1 :

A : pBRRM1 isolé de *Rhizobium meliloti* M19S :

1. BclI ; 2. ClaI ; 3. BclI - ClaI ; 4. BclI - SalI ; 5. SalI - ClaI

B : pRme 19a isolé de *R. meliloti* M19S :

1. BclI - ClaI ; 2. BclI - SalI ; 3. SalI - ClaI ; 4. BclI ; 5. ClaI

(voir les cartes de restriction des pRme 19a et pBRRM1 aux figures 4 et 5)



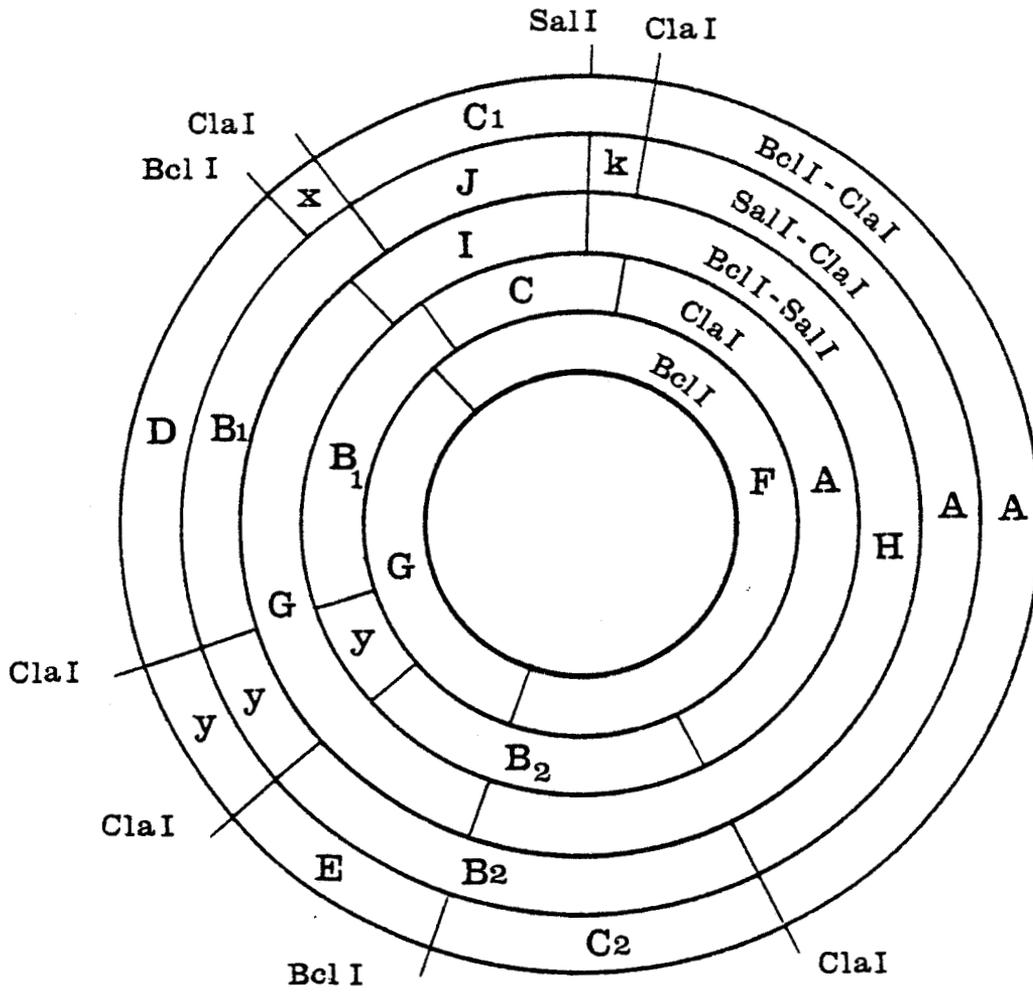


FIGURE 4 - CARTE DE RESTRICTION DE pRme 19a POUR LES ENDONUCLEASES Bcl I, Cla I, Sal I

## II. - CLONAGE DU pRme 19a DANS LE pBR322

pBR322 est l'un des vecteurs plasmidiques de clonage les plus utilisés chez *Escherichia coli*. De petite taille (4,3 kb), amplifiable au chloramphénicol, il confère les résistances à l'ampicilline et à la tétracycline et porte de nombreux sites uniques de clonage (BOLIVAR *et al.* 1977). Non-conjugatif et peu mobilisé par la plupart des plasmides auto-transmissibles connus (BOLIVAR *et al.* 1977), il présente un niveau de sécurité appréciable dans les expériences de génie génétique. Cependant, des systèmes de mobilisation ont été récemment développés ; ils permettent le transfert conjugatif du pBR322 et de ses dérivés, en particulier vers les Rhizobiacées (COVARRUBIAS *et al.* 1981, VAN HAUTE *et al.* 1983, LONG *et al.* 1983).

Le clonage des fonctions de réplication du pRme 19a pouvait s'envisager de deux manières différentes :

- soit par insertion dans un plasmide d'*Escherichia coli*, mobilisable vers *Rhizobium*, de fragments de restriction du pRme 19a, produits par digestion partielle de ce plasmide par une enzyme de restriction ayant de nombreux sites de coupure (séquence de reconnaissance tétranucléotidique). Le fragment inséré contenant les fonctions de réplication du pRme 19a intactes, assurerait le maintien du plasmide hybride après transformation chez *E. coli* et mobilisation vers *Rhizobium*,
- soit par insertion dans ce vecteur d'*Escherichia coli*, du pRme 19a entier, linéarisé par une enzyme de restriction coupant en dehors des fonctions essentielles à la réplication. Ne pouvant savoir *a priori* si la coupure inactive ou non ces fonctions du pRme 19a, il ne reste qu'à tenter le clonage. C'est cette voie que nous avons choisi en insérant pRme 19a linéarisé par SallI dans le pBR322, au site de cette même enzyme situé dans le gène de résistance à la tétracycline.

pRme 19a et pBR322, linéarisés séparément par SallI, ont été précipités à l'éthanol et mélangés dans un rapport 4/1 (pRme 19a/pBR322) après redissolution des ADN dans le tampon de réaction de la T4-DNA ligase (Boehringer) - 0,025 unité de ligase/ $\mu$ l de réaction

(volume final : 27  $\mu$ l) assura la ligature du mélange pendant 48 h à 4°C.

Ce mélange servit à transformer des bactéries de la souche C600 d'*E. coli* rendues compétentes par traitement au  $\text{CaCl}_2$ .

Les colonies apparues après une nuit à 37°C sur milieu de Luria additionné d'ampicilline (50  $\mu$ g/ml) furent repiquées sur des milieux Luria - ampicilline et Luria - tétracycline (10  $\mu$ g/ml) (voir Matériels et Méthodes : Inactivation par insertion d'un marqueur génétique). Les bactéries résistantes à l'ampicilline et sensibles à la tétracycline furent passées en électrophorèse (lyse directe sur le gel) et la taille de leur plasmide comparée à celle de plasmides témoins (pKC7 : 5,8 kb ; pBR322 dimère : 8,6 kb).

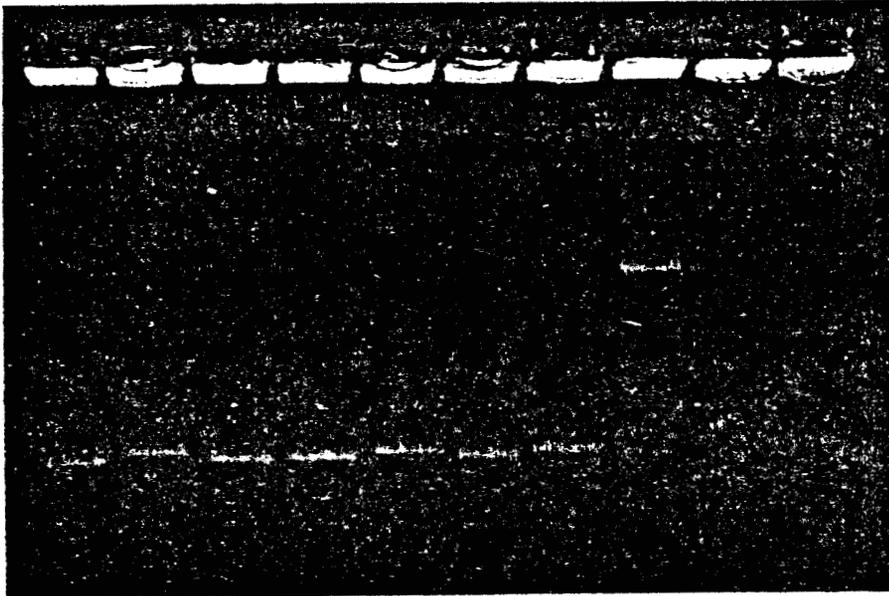
Sur 35 clones résistants à l'ampicilline, 30 étaient sensibles à la tétracycline mais un seul, parmi eux, hébergeait un plasmide dont la taille semblait correspondre à un hybride pBR322 - pRme 19a (photo 2). La nature hybride de ce plasmide, appelé pBRRM1 (pBR pBR322 - RM1 - *Rhizobium meliloti* -) fut par la suite confirmée.

Préparé à partir de ce clone *E. coli* C600 (pBRRM1), ce plasmide se révéla parfaitement amplifiable au chloramphénicol (rendement : 600  $\mu$ g d'ADN plasmidique pour 200 ml de culture bactérienne).

La photo 3 nous présente l'électrophorèse de l'ADN du pBRRM1 traité (2, 5, 6) ou non (1) par les endonucléases SalI (6) et ClaI (2), seules ou en combinaison (5), entouré des ADN témoins du pRme 19a (3, 4) et du pBR322 (7, 8), tous deux à l'origine du pBRRM1, soumis aux mêmes enzymes, dans les mêmes conditions.

Les pistes 6 et 4 mettent en évidence le caractère hybride du pBRRM1 (l'enzyme SalI sert au clonage) et la présence du pRme 19a entier dans ce plasmide. Mais le vecteur pBR322 de cet ADN de *Rhizobium* chez *E. coli* a augmenté de taille par rapport au plasmide de départ (6, 8).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



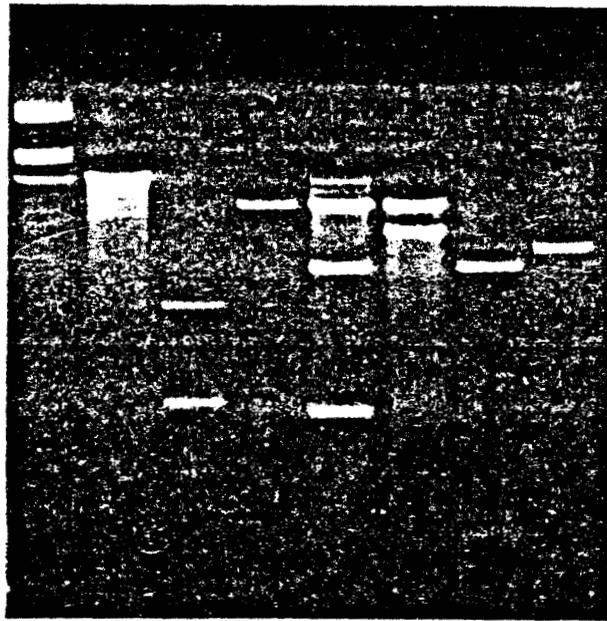
alvéoles

PHOTO 2 - LYSE DIRECTE SUR LE GEL DE CLONES D'*ESCHERICHIA COLI* C600  
RESISTANTS A L'AMPICILLINE ET SENSIBLES A LA TETRACYCLINE  
APRES TRANSFORMATION PAR LE MELANGE DE LIGATURE  
pBR322-SalI/pRme19a-SalI

Electrophorèse horizontale en gel d'agarose (0,8 %)  
(tampon TBE, 1 H - 20 V/4 H - 130 V)

1. à 8. clones résistants à l'ampicilline et sensibles à la tétracycline  
(piste 8 = C600 (pBRRM1))
9. témoin *E. coli* HB101 (pKC7) (5,8 kb)
10. témoin *E. coli* HB101 (pBR322 dimère) (8,6 kb)





Electrophorèse horizontale en gel d'agarose (1 %)  
(tampon TBE, 3 H - 130 V)

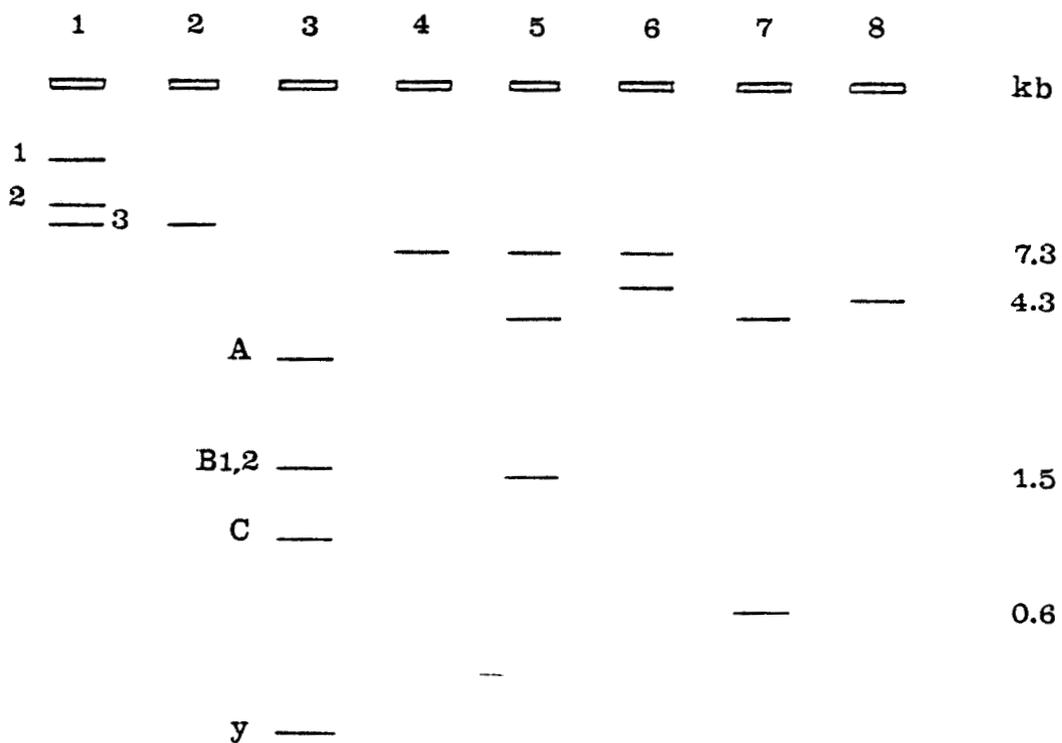


PHOTO 3 - ANALYSE DU pBRRM1 ISOLE DE LA SOUCHE C600 D'ESCHERICHIA COLI



1. témoin pBRRM1 (1 : forme circulaire ouverte, 2 : forme superhélicoïdale, 3 : forme linéaire) ; 2. pBRRM1 ClaI (voir photo 1) ; 3. pRme 19a ClaI ; 4. pRme 19a SalI ; 5. pBRRM1 SalI - ClaI ; 6. pBRRM1 SalI ; 7. pBR322 SalI - ClaI ; 8. pBR322 SalI

L'enzyme ClaI, bien que coupant l'ADN du pRme 19a isolé de *R. meliloti* M19S de manière tout à fait normale (3), ne semble pas agir sur celui-ci lorsqu'il fait partie du pBRRM1 (5) et qu'il est isolé de la souche C600 d'*E. coli*.

Des 6 sites ClaI, théoriquement présents dans l'ADN du pBRRM1 (5 pour pRme 19a, 1 pour pBR322), un seul est encore reconnu par l'enzyme (2), celui du pBR322 (5).

Une double digestion Sall - ClaI du vecteur pBR322 avant (7) et après clonage (5), nous permet de localiser la zone modifiée qui a augmenté de taille, dans le petit fragment Sall - ClaI du pBR322.

Le plasmide pBRRM1 retenu est donc bien un hybride entre le pRme 19a et le pBR322, mais ce dernier semble avoir subi dans la souche C600 quelques modifications qui se traduisent par une augmentation de taille d'environ 1 000 bp du petit fragment Sall - ClaI de ce plasmide.

L'enzyme de restriction ClaI paraît trouver des différences :

- entre ses sites de reconnaissance situés sur l'ADN du pRme 19a lorsque celui-ci est isolé à partir de la souche M19S de *R. meliloti* et à partir de la C600 d'*E. coli*,
- entre son site unique situé dans le pBR322 et ceux du pRme 19a lorsque pBRRM1 est isolé de la souche C600.

De même, l'enzyme BclI, qui coupe pRme 19a en 2 points lorsqu'il est isolé de la souche M19S, ne coupe pas pBRRM1 (il n'y a pas de site BclI sur le pBR322 - SUTCLIFFE 1979).

Les enzymes BclI et ClaI ne reconnaissant plus l'ADN du pRme 19a, il n'était pas possible de déterminer l'orientation de celui-ci dans le pBR322 et d'établir la carte de restriction du pBRRM1.

### III. - UNE RÉSISTANCE INATTENDUE

Alors qu'il devait servir de témoin de sensibilité à un milieu sélectif, le clone C600 (pBRRM1) se révéla fortuitement résistant à la kanamycine.

Après vérification de la sensibilité à la kanamycine des souches C600 (qui sert de souche réceptrice pour la transformation du mélange de ligature pBR322 SalI/pRme 19a SalI) et HB101 (pBR322) (à partir de laquelle a été préparé le pBR322 dans lequel a été inséré pRme 19a : le pBR322 initial ne confère donc pas de résistance à la kanamycine) et puisque cette résistance semblait indubitablement liée au plasmide pBRRM1 (la souche C600, sensible à la kanamycine, retransformée par pBRRM1, devenait résistante), il restait trois possibilités à envisager :

- ou cette résistance est liée à la modification intervenant au niveau du pBR322,
- ou elle est due à la présence du pRme 19a dans pBRRM1,
- ou les deux à la fois.

Une expérience simple consistant à récupérer le vecteur pBR322 modifié, nous permit d'être fixé (fig. 6). pBRRM1 fut successivement coupé par SalI, soumis à l'action de la T4-DNA ligase dans des conditions favorisant la recircularisation et servit à transformer la C600 compétente. Des clones résistants à l'ampicilline, présentant en électrophorèse des plasmides légèrement plus gros que le pBR322 mais tous de taille identique, furent sélectionnés et se révélèrent aussi résistants à la kanamycine que la C600 contenant pBRRM1.

Cette résistance est donc :

- bien conférée par pBRRM1 et pBR::x (pBR322 modifié),
- indépendante du pRme 19a,
- liée à la modification "x" du pBR322 (puisque le pBR322 de départ ne confère pas cette résistance).

Elle est au moins égale à 500 µg de kanamycine/ml de milieu riche liquide chez *E. coli*, à 250 µg/ml en milieu liquide et gélosé, riche ou minimum chez *E. coli* ou chez *Rhizobium* et *Agrobacterium*.

#### IV. - MOBILISATION DU pBRRM1

Les fonctions de réplication du pBR322 sont, comme nous venons de le voir, capables d'assurer le maintien du pBRRM1 chez *E. coli*. Inversement, pRme 19a, dans lequel est inséré pBR::x, devrait pouvoir se répliquer chez *Rhizobium* sauf :

- si l'insertion au site SalI a inactivé les fonctions de réplication,
- si ces fonctions ont été altérées lors du séjour dans la souche C600 ; en effet, l'information génétique portée par le pRme 19a peut se révéler délétère pour *E. coli* et entraîner la mise en marche de mécanismes de défense provoquant des délétions, des recombinaisons ou l'insertion d'éléments transposables dans l'ADN cloné (AMSTER *et al.* 1982). De même, l'absence de pression sélective pour l'information originaire de *Rhizobium* peut autoriser une certaine dérive génétique (MORROW 1979),
- si les systèmes de restriction ou de recombinaison des souches de *Rhizobium* ne tolèrent pas la présence de séquences d'ADN étrangères.

En l'absence de méthode de transformation bactérienne utilisable chez *Rhizobium*, le seul moyen de vérifier si les fonctions de réplication du pRme 19a sont toujours fonctionnelles, est de mobiliser pBRRM1 d'*E. coli* vers *Rhizobium*. Il fallait donc trouver un système de mobilisation.

COVARRUBIAS *et al.* (1981) ont développé un système de mobilisation du pBR322, composé de deux plasmides mobilisateurs. L'un, ColK, synthétise au moins une protéine qui interagit avec une région du pBR322 et rend possible sa mobilisation par R64 drd 11, un plasmide conjugatif.

En attendant de recevoir ce système spécifique de mobilisation que j'avais demandé aux auteurs, j'expérimentais, vis-à-vis du pBRRM1, les possibilités du pRK2013, un plasmide mobilisateur portant les gènes de transfert (tra) d'un plasmide à large spécificité d'hôte, le RK2 (FIGURSKI et HELINSKI 1979). Spécialement conçu pour mobiliser pRK290 (portant les fonctions de réplication à large spécificité d'hôte du RK2) vers de nombreuses bactéries à gram-négatif (DITTA *et al.* 1980), pRK2013 n'était pas *a priori* particulièrement adapté à la mobilisation de plasmides dérivés du pBR322 et ce d'autant plus que pRK2013 et pBR322 appartiennent au même groupe d'incompatibilité\*.

#### A. - MOBILISATION VERS *ESCHERICHIA COLI*

Dans un premier temps, pour mettre en évidence un éventuel phénomène de mobilisation des pBRRM1 et pBR::x par le pRK2013, je me limitais à des croisements entre souches d'*E. coli*, car le plasmide, s'il est mobilisé, peut utiliser dans la bactérie réceptrice les mêmes fonctions de réplication que dans la bactérie donatrice.

Ces croisements mettent en jeu trois souches d'*E. coli* (croisements triparentaux) : 2 souches donatrices, l'une contenant le plasmide à mobiliser, l'autre le plasmide "Helper", pRK2013, et une souche réceptrice.

Les souches donatrices HB101 (pRK2013), HB101 (pRK290) (témoin positif de mobilisation par pRK2013) C600 (pBRRM1), HB101 (pBR322), C600 (pBR::x) sont auxotrophes et la souche réceptrice, W3350, prototrophe.

Un milieu minimum contenant de la tétracycline (10 µg/ml) ou de l'ampicilline (50 µg/ml) permet de sélectionner les bactéries réceptrices (prototrophes) ayant reçu par mobilisation le plasmide conférant la résistance à la tétracycline (pRK290) ou à l'ampicilline (pBR322 ou pBR::x ou pBRRM1).

Les pBR::x et pBRRM1 devaient se révéler mobilisables par pRK2013, mais pas pBR322. Comme la résistance à la kanamycine, la mobilisation semble être indépendante du pRme 19a et être liée à la modification du pBR322. De plus, l'incompatibilité des plasmides mobilisateur et mobilisé ne semble pas jouer ou tout au moins empêcher la mobilisation.

## B. - MOBILISATION VERS RHIZOBIUM MELILOTI M19S

Même sachant pBRRM1 mobilisable par pRK2013 vers *E. coli*, il faut bien admettre que cette tentative de mobilisation vers *Rhizobium* comportait plusieurs inconnues :

- bien qu'il soit mobilisable vers *E. coli*, pBRRM1 ne l'est pas forcément vers *Rhizobium* qui est taxonomiquement éloigné d'*E. coli* ;
- les fonctions de réplication du pRme 19a qui seules peuvent assurer le maintien du pBRRM1 chez *Rhizobium* (les fonctions de réplication du pBR322 sont limitées aux entérobactéries, KONDOROSI *et al.* 1982) ne sont peut-être plus fonctionnelles. Il était important de tenter ce premier croisement avec la souche M19S dont provient pRme 19a, pour éliminer les problèmes éventuels pouvant résulter d'une spécificité d'hôte étroite des fonctions de réplication du pRme 19a, limitées à *R. meliloti*, par exemple ;
- la résistance à la kanamycine qui semble être le marqueur génétique le plus approprié puisque le taux d'apparition de mutants résistants à la kanamycine (200 µg/ml) est inférieur à  $4 \times 10^{-9}$  chez la M19S (ALI 1982), n'est peut-être pas utilisable chez *Rhizobium* ;
- pBRRM1, même capable de se répliquer, peut être instable chez *Rhizobium*. La souche réceptrice est sauvage et n'est pas déficiente comme la C600 d'*E. coli* pour les systèmes de restriction et de modification ; la présence d'ADN étranger dans le pRme 19a ou/et la seule provenance d'*E. coli* C600 qui a, nous l'avons vu, entraîné des modifications au niveau de l'ADN du pRme 19a (voir : Enzymes de restriction BclI et ClaI), peuvent être sources d'instabilité.

Ce croisement devait, par son succès, écarter ces indéterminations. Dans le cas contraire, aucune conclusion n'aurait pu être tirée.

Trois croisements triparentaux vers la M19S, impliquant comme souche mobilisatrice, la HB101 (pRK2013) et les souches HB101 (pRK290) (témoin positif de croisement : témoin de mobilisation par pRK2013, de réceptivité de la souche et de maintien du plasmide chez *Rhizobium*) ou C600 (pBR::x) (témoin négatif de croisement : les fonctions de répllication du pBR322 sont à spécificité d'hôte étroite) ou C600 (pBRRM1), furent simultanément réalisés.

Les *Rhizobium* prototrophes ayant reçu le pRK290, le pBRRM1 ou le pBR::x sont sélectionnés sur milieu minimum (élimination des souches donatrices auxotrophes) contenant de la tétracycline (10 µg/ml) dans le cas du pRK290 et de la kanamycine (250 µg/ml) dans les deux derniers cas. Les fréquences d'apparition de *Rhizobium* spontanément résistants aux antibiotiques sont déterminées ainsi que les fréquences de mobilisation des différents plasmides (tab. 4).

pBRRM1 s'avère non seulement mobilisable d'*E. coli* à *R. meliloti* M19S mais également capable de s'y maintenir. Le gène de résistance à la kanamycine constitue un bon marqueur génétique.

Les fonctions de répllication du pRme 19a sont restées fonctionnelles ; le site SalI du pRme 19a se situe donc en dehors de toute région essentielle à la répllication ; le passage du pRme 19 a chez *E. coli* et la présence du pBR322 ne semble pas causer d'instabilité et ce d'autant plus que pBRRM1 est stable en l'absence de toute pression sélective. Repiqués plusieurs fois sur milieu minimum puis sur milieu riche et finalement cultivés en milieu riche liquide, tous ces milieux étant non-sélectifs, des clones abritant initialement pBRRM1 restent en fin de compte résistants à la kanamycine et le plasmide peut toujours être mis en évidence par électrophorèse (lyse directe sur le gel).

TABLEAU 4 - MOBILISATION DES pRK290 et pBRRM1 PAR LE pRK2013  
VERS LES DEUX GENRES RHIZOBIUM ET AGROBACTERIUM  
DE LA FAMILLE DES RHIZOBIACEES

souches réceptrices	souches donatrices	Fréquences de transfert		Durée de croisement	Fréquences de mutation spontanée	
		HB101 (pRK2013)			Km <sup>R</sup> (250 µg/ml)	Tc <sup>R</sup> (10 µg/ml)
		C600 (pBRRM1) (1)	HB101 (pRK290) (2)			
<i>R. meliloti</i> M19S		6,6 x 10 <sup>-4</sup>	3,5 x 10 <sup>-3</sup>	3 h 30	5,0 x 10 <sup>-7</sup>	1,7 x 10 <sup>-6</sup>
<i>R. meliloti</i> 17		6,3 x 10 <sup>-5</sup>	6,0 x 10 <sup>-4</sup>	3 h 45	< 3,3 x 10 <sup>-9</sup>	
<i>R. meliloti</i> RCR2011		1,3 x 10 <sup>-4</sup>	6,2 x 10 <sup>-4</sup>	3 h 45	< 2,5 x 10 <sup>-9</sup>	
<i>R. leguminosarum</i> L17S		5,4 x 10 <sup>-6</sup>	7,5 x 10 <sup>-8</sup>	21 h 30	< 2,0 x 10 <sup>-10</sup>	
<i>R. phaseoli</i> P15S		2,0 x 10 <sup>-4</sup>	4,0 x 10 <sup>-3</sup>	4 h 00	< 9,0 x 10 <sup>-10</sup>	9,0 x 10 <sup>-9</sup>
<i>A. rhizogenes</i> R1S		6,5 x 10 <sup>-5</sup>	8,4 x 10 <sup>-4</sup>	22 h 00	< 1,0 x 10 <sup>-10</sup>	
<i>A. tumefaciens</i> B6		4,0 x 10 <sup>-7</sup>	4,0 x 10 <sup>-6</sup>	18 h 00	< 1,6 x 10 <sup>-10</sup>	

Marqueurs génétiques : (1) résistance à la kanamycine (Km<sup>R</sup>)  
(250 µg/ml)

(2) résistance à la tétracycline (Tc<sup>R</sup>)  
(10 µg/ml)



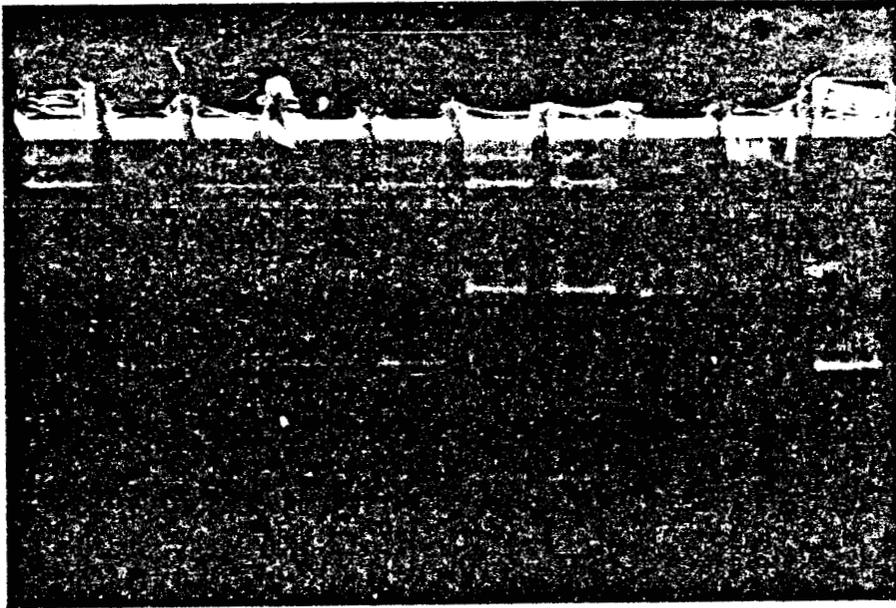
Ce sont bien les fonctions de répllication du pRme 19a qui assurent le maintien du pBRRM1 chez *Rhizobium meliloti* M19S puisque :

- 1) le pBR::x est incapable de s'y répliquer. Le croisement de la M19S avec la C600 (pBR::x), pourtant réalisé dans des conditions identiques à celles des croisements impliquant pRK290 et pBRRM1, n'a donné naissance à aucun transconjugant résistant à la kanamycine. pBR::x étant tout autant mobilisé que pBRRM1 chez *E. coli* et puisque pBRRM1 n'est qu'après tout que pBR::x dans lequel est inséré pRme 19a, ce croisement négatif doit être attribué à une absence, non pas de mobilisation, mais bien de fonctions de répllication adéquates dans pBR::x ;
- 2) la photo 4 nous présente la lyse directe sur le gel de clones de *R. meliloti* M19S contenant pBRRM1 ou pRK290. Dans le premier cas (2, 3, 4, 5), on s'aperçoit que pBRRM1 et le pRme 19a indigène (dont dérive pBRRM1 !) ne peuvent coexister dans la même cellule. Si ces deux plasmides sont incompatibles, c'est que pBRRM1 utilise chez *Rhizobium* les fonctions de répllication du pRme 19a. pRK290 est, quant à lui, tout à fait compatible avec le pRme 19a indigène.

#### C. - MOBILISATION VERS D'AUTRES ESPECES DE RHIZOBIUM ET VERS AGROBACTERIUM

Le système était-il extensible à d'autres Rhizobiacées ? pRme 19a peut ne pouvoir se répliquer que chez *R. meliloti* et peut même être limité à la seule M19S. pBRRM1 est-il, d'autre part, mobilisable et stable dans d'autres souches sauvages ?

Les conditions de croisement restent globalement les mêmes que dans le cas de la M19S. pRK290 sert toujours de témoin positif de croisement ; les *Rhizobium* et *Agrobacterium* prototrophes, ayant reçu pRK290 ou pBRRM1 sont sélectionnés sur milieu minimum additionné de tétracycline (10 µg/ml) ou de kanamycine (250 µg/ml.) Les durées de croisement sont variables suivant les souches réceptrices (tab. 4) et fixées de manière arbitraire, afin , par exemple, de compenser



Electrophorèse horizontale en gel d'agarose (0,8 %)  
(tampon TBE, 1 H - 20 V/4 H - 130 V)

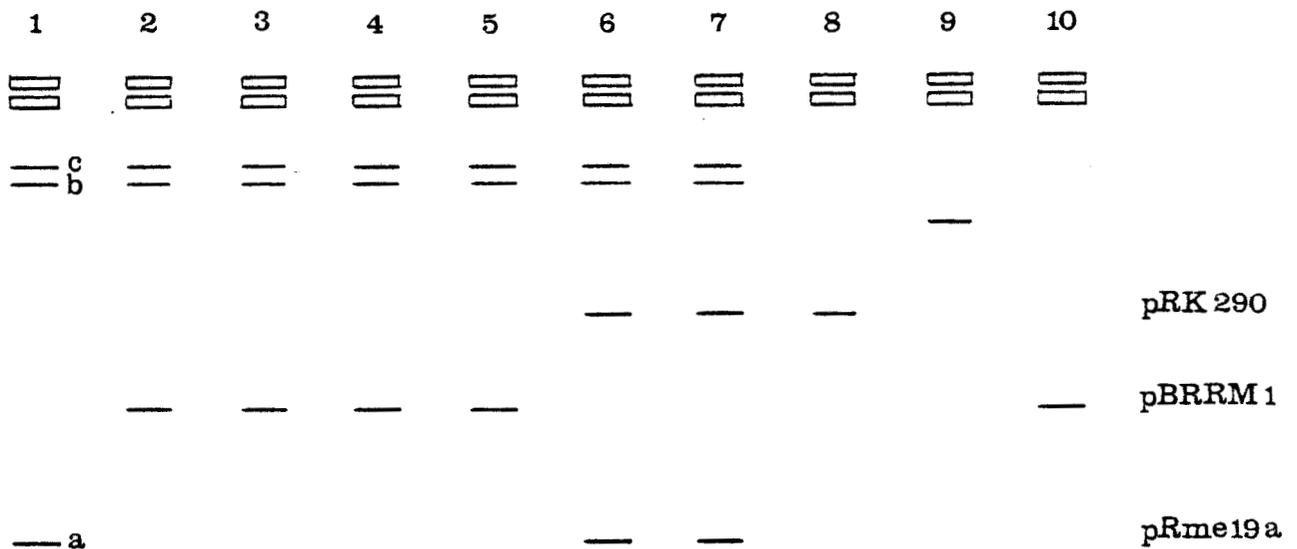


PHOTO 4 - LYSE DIRECTE SUR LE GEL DE CLONES DE *RHIZOBIUM MELILOTI* M19S  
RESISTANTS A LA KANAMYCINE OU A LA TETRACYCLINE APRES  
MOBILISATION PAR pRK2013 RESPECTIVEMENT DES PLASMIDES  
pBRRM1 ou pRK290



1. témoin *R. meliloti* M19S  
a : pRme 19a (7,5 kb), b : pRme 19b (220 kb), c : pRme 19c (> 700 kb)
2. à 5. clones de *R. meliloti* M19S résistants à la kanamycine
6. à 7. clones de " " " à la tétracycline
8. témoin *Escherichia coli* HB101 (pRK290)
9. témoin *E. coli* HB101 (pRK2013)
10. témoin *E. coli* C600 (pBRRM1)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

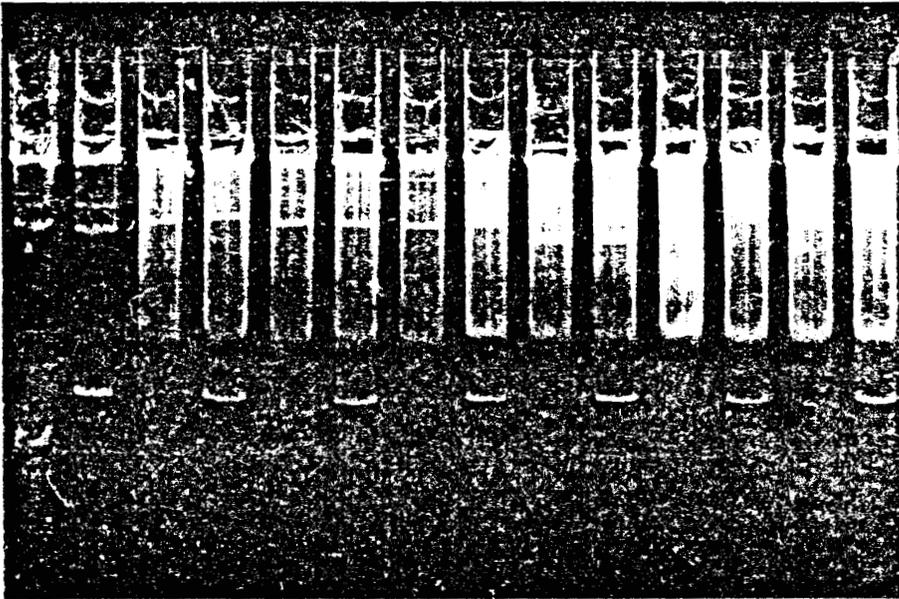


PHOTO 5 - MOBILISATION DE pBRRM1 PAR pRK2013 VERS LES GENRES  
RHIZOBIUM ET AGROBACTERIUM

Lyse directe sur le gel - Electrophorèse verticale en gel d'agarose (0,7 %)  
(tampon TBE, 45 mn - 20 V/2 H 15 - 130 V)

- |                                    |   |                          |   |
|------------------------------------|---|--------------------------|---|
| 1. <i>Rhizobium meliloti</i> M19S  | ; | 2. R.m. M19S (pBRRM1)    | ; |
| 3. <i>R. meliloti</i> 17           | ; | 4. R.m. 17 (pBRRM1)      | ; |
| 5. <i>R. meliloti</i> RCR2011      | ; | 6. R.m. RCR2011 (pBRRM1) | ; |
| 7. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> | ; | 8. A.r. R1S (pBRRM1)     | ; |
| 9. <i>A. tumefaciens</i> B6        | ; | 10. A.t. B6 (pBRRM1)     | ; |
| 11. <i>R. leguminosarum</i> L17S   | ; | 12. R.l. L17S (pBRRM1)   | ; |
| 13. <i>R. phaseoli</i> P15S        | ; | 14. R.p. P15S (pBRRM1)   |   |

Toutes ces souches ont été cultivées en milieu non-sélectif.



des conditions de croisement qui n'étaient, par ailleurs, visiblement pas optimales (ce fut le cas pour *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*). Le but de ces croisements était en effet de mettre en évidence d'éventuels mobilisation et maintien du pBRRM1 dans ces souches réceptrices et non de rechercher les conditions de croisement les meilleures.

Le tableau 4 et la photo 5 résument les résultats de ces expériences. Il convient de remarquer que les souches, dont le contenu plasmidique est présenté à la photo 5, ont toutes été cultivées en l'absence de kanamycine.

pBRRM1 est donc mobilisable par le pRK2013, sélectionnable grâce à la résistance à la kanamycine qu'il confère, et capable de se maintenir chez les Rhizobiacées sans pression sélective.

Ces croisements sont intergénériques lorsqu'on s'intéresse aux bactéries donatrices et réceptrices mais sont pour le pRme 19a, intra ou interspécifiques (mobilisation vers d'autres *R. meliloti* ou vers d'autres espèces de *Rhizobium*) et même intergénériques (mobilisation vers *Agrobacterium*). Les fonctions de réplication du pRme 19a sont en quelque sorte à large spécificité d'hôte (chez les Rhizobiacées).

## V. - CARTE DE RESTRICTION DU pBRRM1

pBRRM1 fut préparé à partir de la souche M19S. Le chloramphénicol qui provoque une amplification de ce plasmide chez *E. coli* n'a apparemment aucune action sur lui lorsqu'il se trouve chez *Rhizobium*. L'action bactériostatique de cet antibiotique est d'ailleurs beaucoup moins sensible à la concentration employée.

Singulièrement, les sites ClaI et BclI du pRme 19a qui n'existaient plus sur pBRRM1 isolé à partir de la C600, réapparaissent lorsque l'ADN du même plasmide est préparé à partir de la M19S. La photo 1 (A) nous présente les profils de restriction obtenus quand cet ADN est soumis aux endonucléases SallI, ClaI et BclI, en simples ou doubles digestions.

Outre l'orientation du pRme 19a dans le pBR::x, ces digestions enzymatiques mettent en évidence deux modifications du nombre de sites fonctionnels :

- 1 site BclI est apparu dans la zone modifiée, située entre les sites SalI et ClaI du pBR322 (fig. 5 et 6). Rappelons que pBR322 ne contient aucun site BclI que ce soit par digestion enzymatique ou d'après sa séquence (SUTCLIFFE 1979, MANIATIS *et al.* 1982) ;
- 1 site ClaI du pRme 19a, situé près du site SalI d'insertion, a par contre disparu.

La figure 5 présente la carte de restriction du pBRRM1 déduite des profils de restriction observés (photo 1, A), pour les enzymes BclI, ClaI et SalI.

Les sites BclI du pRme 19a et du pBR::x ainsi que les sites ClaI du pRme 19a ne sont donc pas fonctionnels lorsque l'ADN du pBRRM1 provient de la C600 mais le redeviennent après mobilisation vers la M19S et préparation de l'ADN à partir de cette souche.

Le site ClaI du pBR322 ainsi que les deux sites SalI du pBRRM1 sont insensibles à ce phénomène qui semble bien spécifique de la souche dans laquelle se trouve le plasmide.

En fait, ces problèmes sont imputables à la dam méthylation ("DNA adenine methylation"). La dam méthylase d'*Escherichia coli* introduit des groupements méthyl en position N<sup>6</sup> de l'adénine de la séquence 5' GATC<sup>3'</sup> (HATTMAN *et al.* 1978). Les enzymes de restriction ayant des sites de reconnaissance contenant tout ou partie de la séquence GATC peuvent être ou non affectées par cette modification (MANIATIS *et al.* 1982). Ainsi, les enzymes BamHI et BclI qui reconnaissent les séquences G GATC C pour l'une et T GATC A pour l'autre sont respectivement insensible et inhibée par la méthylation de l'adénine de la séquence GATC. Les sites BclI n'existent donc jamais dans les bactéries Dam<sup>+</sup>. L'enzyme SalI qui reconnaît la séquence GTCGAC n'est pas du tout concernée par ce phénomène de dam méthylation puisque la séquence GATC n'existe pas même partiellement dans son site de reconnaissance.

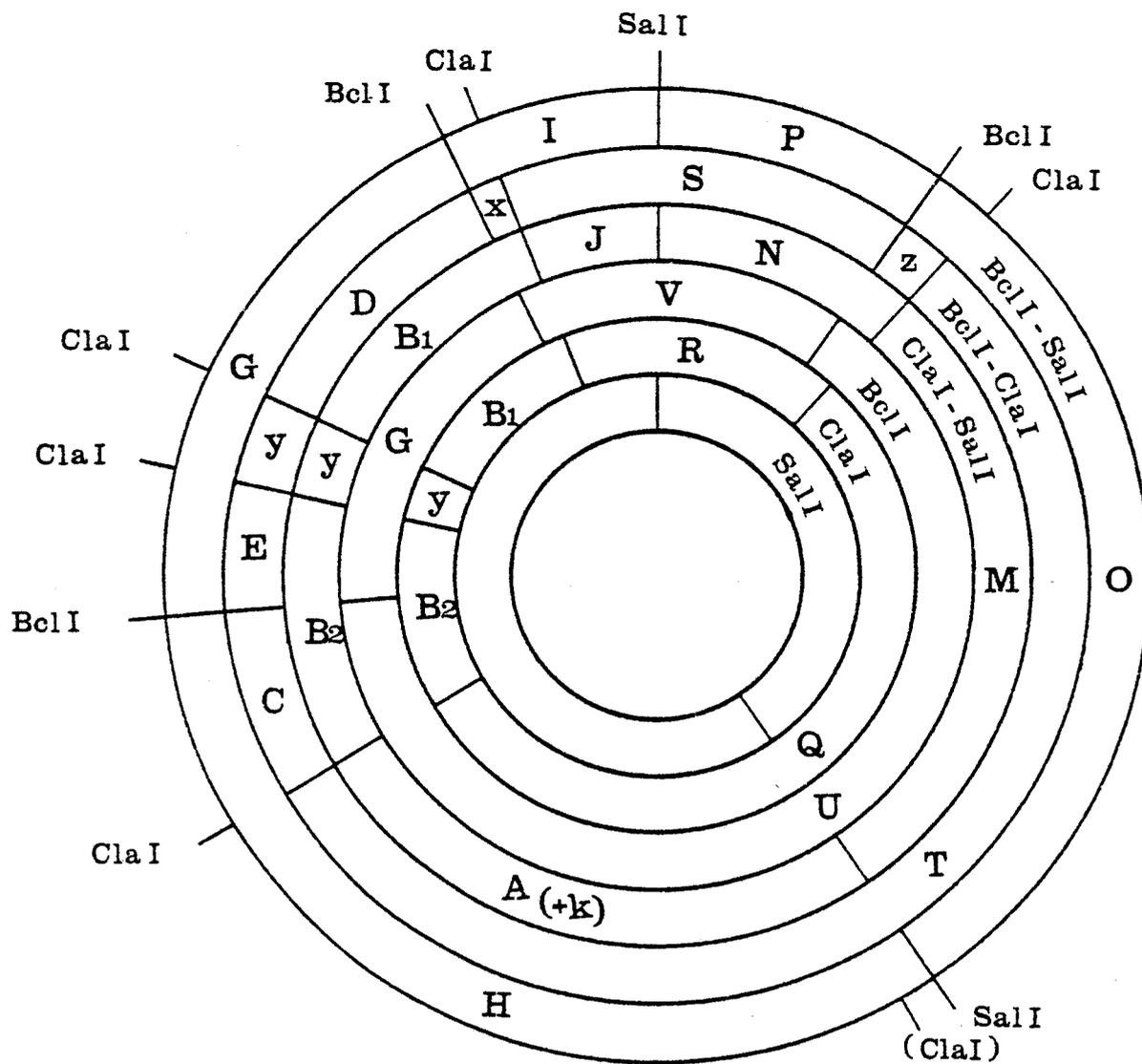


FIGURE 5 - CARTE DE RESTRICTION DU PLASMIDE pBRRM1 POUR LES  
ENDONUCLEASES BclI, ClaI ET SalI

*Le site ClaI, figurant entre parenthèses, n'est plus fonctionnel*

L'enzyme ClaI n'est sensible à la dam méthylation, statistiquement qu'une fois sur quatre. En effet, son site de reconnaissance ATC GAT ne contient que les trois premiers nucléotides de la séquence spécifique de la dam méthylase. La méthylation et donc l'inhibition dépendent du nucléotide suivant immédiatement la séquence de reconnaissance de ClaI ; une cytosine n'arrive statistiquement qu'une fois sur quatre.

L'adénine du site ClaI du pBR322 n'est jamais méthylée car c'est une adénine (et non une cytosine) qui suit les trois derniers nucléotides GAT du site de reconnaissance de ClaI (SUTCLIFFE 1979). Inversement, comme les quatre sites ClaI du pRme 19a, restant fonctionnels après clonage, sont affectés par la dam méthylation, c'est qu'une cytosine suit à chaque fois le site de reconnaissance de l'enzyme ClaI dans l'ADN du pRme 19a.

Les enzymes BclI et ClaI nous ont permis de mettre en évidence l'absence, tout au moins chez la souche M19S de *R. meliloti*, d'un mécanisme de méthylation équivalent à la dam méthylation d'*E. coli*. Le retour de l'inhibition des sites BclI et ClaI fonctionnels, obtenu par transformation du pBRRM1 isolé de la M19S dans la souche C600, ainsi que la réapparition de ces sites après transformation du pBRRM1 isolé de la C600 dans deux souches d'*E. coli* Dam<sup>-</sup> (GM272 et GM161), ont confirmé ce résultat.

## VI. - RECHERCHE DES SITES UNIQUES DE CLONAGE DANS pBRRM1

Les propriétés du pBRRM1 nous amenèrent à envisager son utilisation comme vecteur de clonage chez les Rhizobiacées ; il est en effet :

- amplifiable et facile à préparer chez *E. coli*,
- de taille modérée (12,6 kb),
- porteur de gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine,

ce dernier caractère étant parfaitement utilisable comme marqueur génétique chez les Rhizobiacées,

- pouvant être introduit par transformation chez *E. coli* et mobilisable vers les Rhizobiacées,
- capable de se maintenir avec ou sans pression sélective chez ces différentes souches réceptrices.

Il restait à mettre en évidence des sites de restriction utilisables comme sites d'insertion dans le pBRRM1. Ces sites doivent être uniques (couper le plasmide en un seul point), être situés en dehors de la zone modifiée du pBR::x qui semble déterminer la mobilisation et la résistance à la kanamycine et ne pas inactiver les fonctions de répllication du pBR322 et du pRme 19a.

Les sites ClaI et BclI du pRme 19a sont à éliminer : ils ne sont pas uniques, n'existent que dans les bactéries Dam<sup>-</sup> et peuvent inactiver les fonctions de répllication du pRme 19a dont on ne connaît pas la localisation.

Il fallait donc s'intéresser aux sites de clonage du pBR322.

#### A. - LES SITES DE CLONAGE DU pBR322

Hormis le site SalI dans lequel est maintenant inséré pRme 19a, pBr322 possède 9 autres sites uniques de clonage pour les enzymes BamHI, EcoRI, HindIII, PstI, AvaI, PvuII, PvuI, BalI, ClaI.

Si l'on sait que les quatre premières enzymes ne coupent pas l'ADN du pRme 19a, on ignore ce qu'il en est des suivantes. En effet, même si elles n'ont qu'un seul site dans pBR322, elles peuvent en reconnaître plusieurs sur le pRme 19a et couper de ce fait pBRRM1 en plusieurs morceaux. De plus, la zone modifiée du pBR322 semble apporter des sites de restriction supplémentaires (pour l'instant, au moins un site BclI).

Les sites HindIII, EcoRI et ClaI (lorsque l'ADN est isolé d'une bactérie Dam<sup>+</sup>) du pBR322 sont encore uniques dans pBRRM1. Pratiquement confondus (les trois sites de reconnaissance hexanucléotidiques, sans se recouper, sont compris dans une zone de 35 nucléotides), ils sont situés juste en bordure de la zone modifiée. Leur utilisation pour le clonage peut être envisagée si celui-ci n'affecte pas cette zone indispensable aux applications pratiques du pBRRM1.

Le site BamHI, situé à l'origine dans le petit fragment Sall -ClaI du pBR322, c'est-à-dire en pleine zone modifiée, a quant à lui totalement disparu.

Les enzymes AvaI et PvuI coupent pRme 19a en de nombreux points et ne sont donc pas utilisables.

Les enzymes Ball, PvuII et PstI, bien que ne coupant pas pRme 19a, reconnaissent au moins un site supplémentaire dans la zone modifiée (un pour PvuII et Ball, deux pour PstI). PstI coupe maintenant pRme 19a en un point. Les photos 6, 7, 8 présentent les profils de restriction obtenus par simples, doubles, voire même triples digestions par les enzymes Sall, ClaI, BclI, PstI, PvuII, Ball, profils permettant de localiser les sites de coupure les uns par rapport aux autres (fig. 6).

## B. - SITES UNIQUES DE RESTRICTION DU pRme 19a

A l'exception des sites EcoRI, HindIII et ClaI dont l'utilisation reste conditionnelle, tous les sites uniques du pBR322 ne sont plus utilisables pour le clonage dans pBRRM1. Il faut donc chercher des sites uniques de restriction ailleurs, dans l'ADN du pRme 19a.

Le principe est simple : il suffit de trouver parmi les enzymes de restriction ne coupant pas pBR322, celle(s) qui coupe(nt) pBRRM1 en un point, cette coupure pouvant intervenir soit au niveau de la zone modifiée du pBR322, soit au niveau du pRme 19a. pBRRM1 coupé par Sall est alors soumis à cette (ces) enzyme(s) sélectionnée(s), et l'on observe si la coupure affecte la bande supérieure (pRme 19a) ou inférieure (pBr::x) (photo 9).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

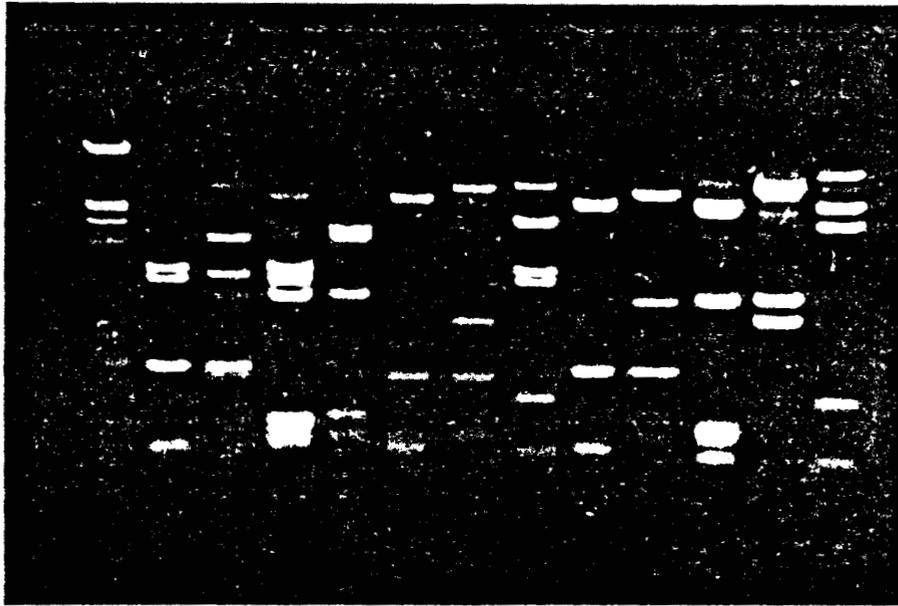


PHOTO 6 - LOCALISATION DES SITES PstI DANS pBRRM1 (Dam<sup>-</sup>)(1)  
PAR DOUBLES ET TRIPLES DIGESTIONS

Electrophorèse horizontale en gel d'agarose (1,2 %)  
(tampon TBE, 2 H 45 - 150 V)

1. phage lambda EcoRI - HindIII (témoin de masse moléculaire) ;
2. SalI - ClaI - PstI ; 3. SalI - ClaI ; 4. BclI - SalI - Pst I ;
5. BclI - SalI ; 6. BclI - ClaI - PstI ; 7. BclI - ClaI ;
8. SalI - PstI ; 9. ClaI - PstI ; 10. ClaI ; 11. BclI - PstI ;
12. BclI ; 13. PstI

(1) ADN isolé d'une bactérie Dam<sup>-</sup> (en l'occurrence la souche M19S)



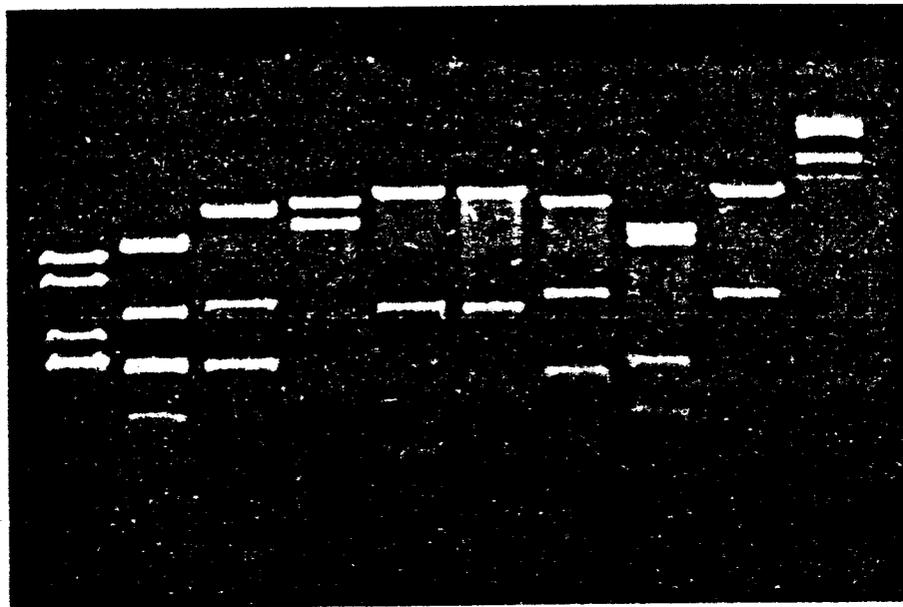


photo 7 : 1. ClaI-BalI ; 2. ClaI-PvuII ; 3. ClaI ; 4. SalI ; 5. PvuII-HindIII ;  
6. PvuII-EcoRI ; 7. PvuII-SalI ; 8. PvuII-PstI ; 9. PstI ; 10. Témoin  
pBRRM1

1 2 3 4 5 6 7 8 9

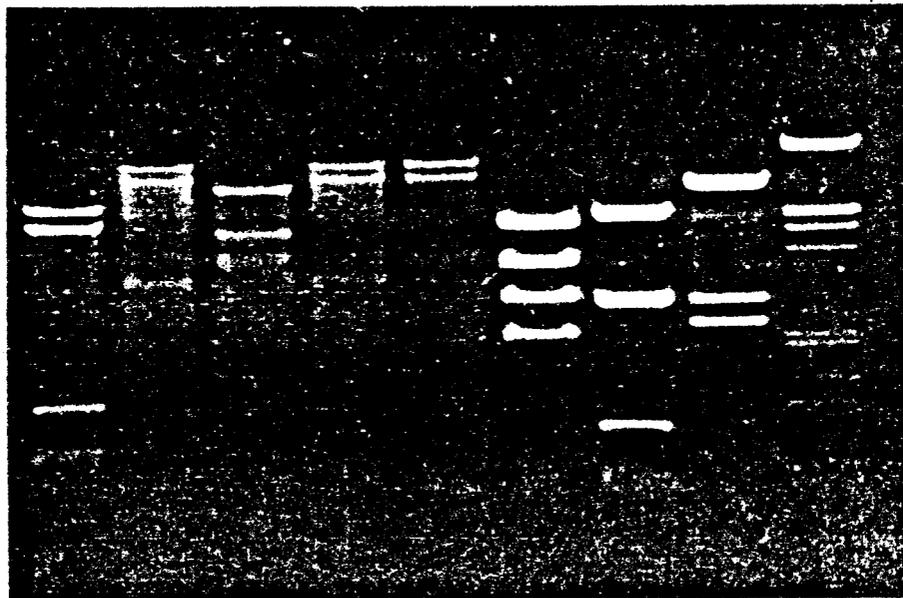


photo 8 : 1. PstI ; 2. BalI-EcoRI ; 3. BalI-SalI ; 4. BalI-HindIII ; 5. BalI ;  
6. BclI-BalI ; 7. BclI-PvuII ; 8. BclI ; 9. phage lambda HindIII (Témoin de  
masse moléculaire)

PHOTOS 7-8 - LOCALISATION DES SITES BalI et PvuII dans pBRRM1 (Dam<sup>-</sup>)

Electrophorèse horizontale en gel d'agarose (1 %)  
(tampon TBE, 3 H - 140 V)



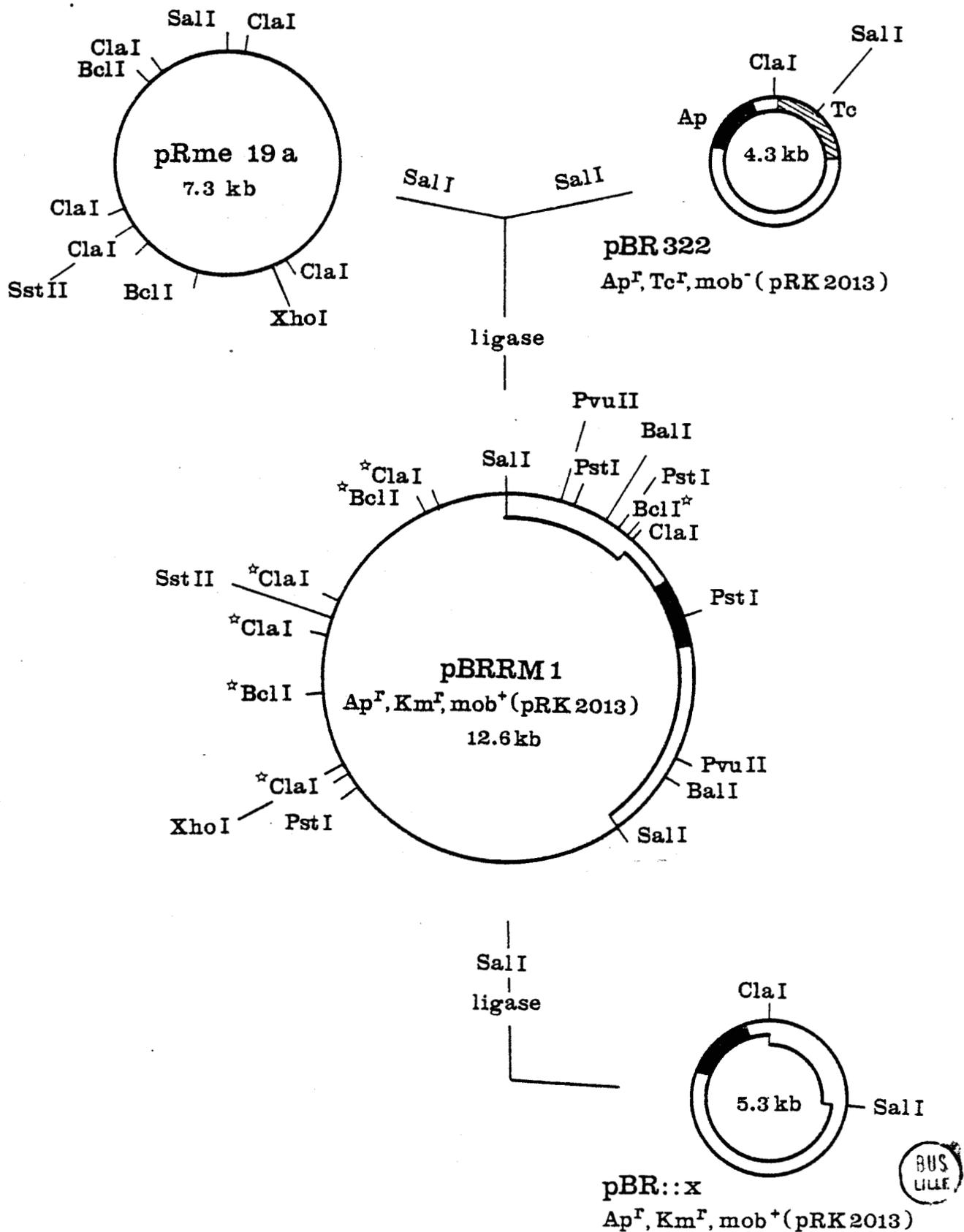


FIGURE 6 - CONSTRUCTION DES PLASMIDES pBRRM1 ET pBR::x - CARTE DE RESTRICTION DE pBRRM1 POUR LES ENZYMES BalI, BclI, ClaI, PstI, PvuII, SalI, SstII, XhoI

☆ sensibles à la dam méthylation

BUS  
LILLE

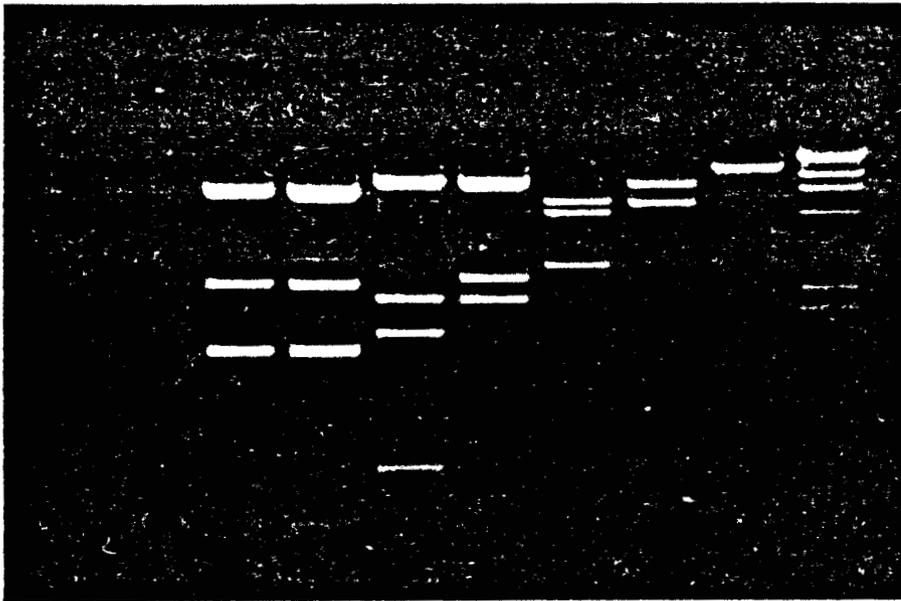
Deux enzymes, XhoI et SstII, devaient ainsi se révéler couper pBRRM1 en un point, dans pRme 19a. Ces deux sites uniques de restriction ont été situés sur la carte de restriction du pBRRM1 (photo.9, fig. 6).

## VII. - RECHERCHE DES FONCTIONS DE RÉPLICATION DU pRme 19a

Le clonage aux sites SstII et XhoI du pBRRM1, situés dans l'ADN du pRme 19a en dehors de tout marqueur génétique, ne devrait néanmoins pas poser de problème technique. Le traitement à la phosphatase alcaline du vecteur linéarisé par l'une de ces enzymes permettra en effet la sélection directe des clones contenant des plasmides recombinants (voir Matériels et Méthodes).

Ces deux sites uniques de restriction peuvent être à juste titre considérés comme des sites de clonage potentiels chez *E. coli* mais pas chez les Rhizobiacées. En effet, si ces deux sites n'interfèrent pas avec les fonctions de répllication utilisées par pBRRM1 chez *E. coli* on ne sait pas, par contre, s'ils ne sont pas situés dans celles qu'utilise le plasmide chez *Rhizobium* et *Agrobacterium*.

Il fallait donc, soit cloner de l'ADN aux sites SstII et XhoI, soit localiser les fonctions de répllication du pRme 19a avant tout clonage. Cette dernière possibilité fut envisagée puisque les sites ClaI et BclI du pRme 19a nous offraient la possibilité de construire des dérivés du pBRRM1 délétés de certains fragments de restriction produits, soit par BclI, soit par ClaI. Outre la production de dérivés plus petits que pBRRM1, ces délétions permettent la localisation des fonctions de répllication du pRme 19a : tout fragment manquant est facilement identifié et il est aisé d'établir s'il est ou non essentiel à la répllication chez les Rhizobiacées.



Electrophorèse horizontale en gel d'agarose (1,2 %)  
(tampon TBE, 3 H - 150 V)

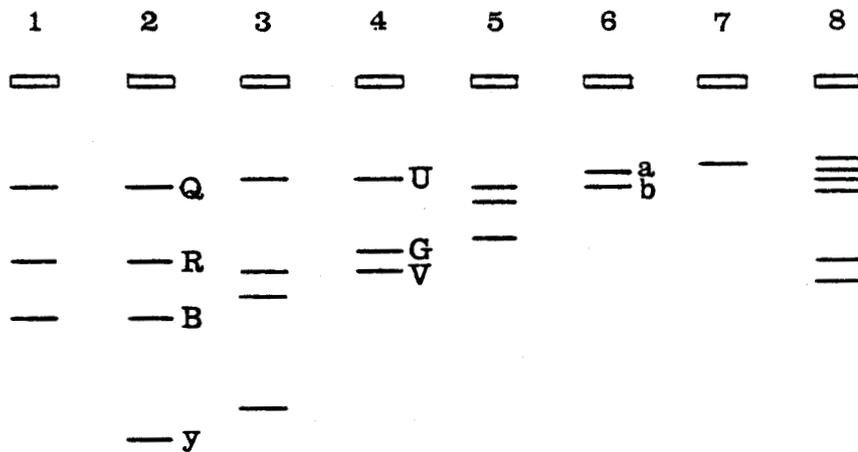


PHOTO 9 - LOCALISATION DU SITE DE COUPURE DE L'ENZYME SstII DANS pBRRM1 (Dam)

1. ClaI-SstII ; 2. ClaI ; 3. BclI-SstII ; 4. BclI ; 5. SalI-SstII ; 6. SalI ;  
7. SstII ; 8. phage lambda HindIII (témoin de masse moléculaire)

L'enzyme de restriction SstII coupe pBRRM1 en 1 point (7) dans l'ADN du pRme 19a (5,6). Les fragments G (3,4) ou y (1,2) sont touchés.

a : pRme 19a

b : pBR::x

## A. - MUTANTS DE DELETION $\Delta 2B$ et $\Delta G$

Les plasmides dérivés du pBRRM1 doivent impérativement conserver la résistance à la kanamycine et la mobilisation par pRK2013. La présence des fragments V et R (fig. 5), produits respectivement par ClaI et BclI, est absolument nécessaire chez ces "mutants de délétion".

Après ligature des fragments de restriction obtenus par action, soit de BclI, soit de ClaI, sur pBRRM1 (Dam<sup>-</sup>) et transformation d'une souche d'*E. coli* Dam<sup>-</sup> (GM272), les clones résistants à l'ampicilline (50 µg/ml) et à la kanamycine (250 µg/ml) ont été passés en électrophorèse (lyse directe sur le gel). Les clones contenant un plasmide plus petit que le pBRRM1 initial ont été sélectionnés et analysés. Les plasmides de deux de ces clones (photo 10), sont représentés à la figure 7. Ils ont conservé respectivement les fragments R et V mais ont perdu B1 et B2 pour l'un (pBRRM1  $\Delta 2B$ ) et G pour l'autre (pBRRM1  $\Delta G$ ). La mobilisation et le maintien de ces dérivés chez *Rhizobium* est actuellement à l'étude.

## B. - CLONAGE DIRECTIONNEL ClaI - HindIII DU pBR322 DANS pBRRM1

Afin de vérifier la faisabilité d'un clonage aux sites HindIII et ClaI du pBR322, l'ADN du pBR322 a été inséré directionnellement aux sites HindIII et ClaI du pBRRM1 (Dam<sup>+</sup>). Le clonage directionnel permet d'un seul coup de vérifier si les deux sites sont utilisables pour le clonage et surtout la sélection directe des plasmides hybrides (voir Matériels et Méthodes).

Ce clonage permettait en outre d'envisager, à partir de cet hybride pBRRM1/pBR322, la production, par l'enzyme ClaI, de dérivés délétés de certaines parties du pRme 19a, conservant à coup sûr la zone modifiée du pBR::x et récupérant en plus le site BamHI du pBR322 (fig. 8).

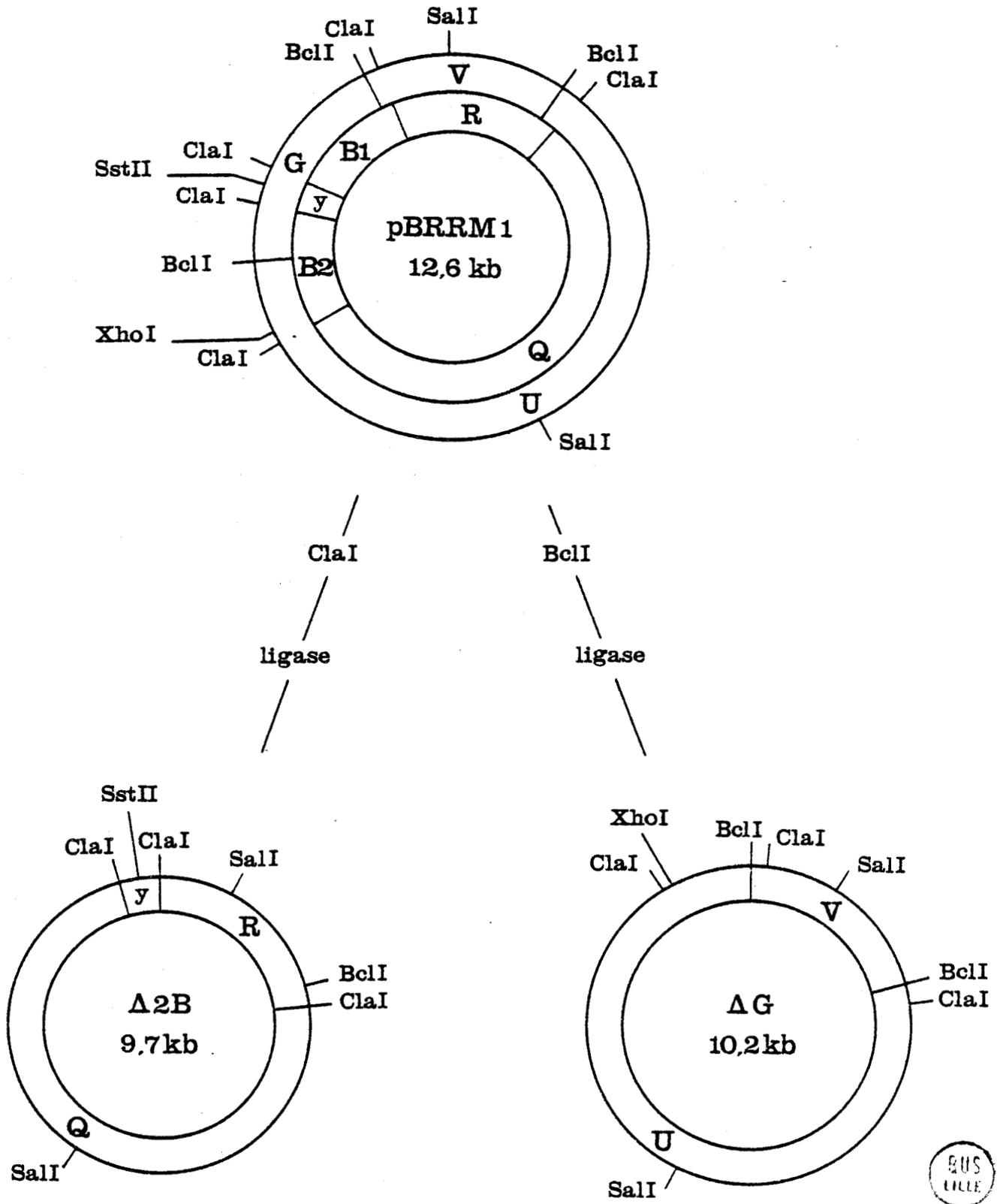
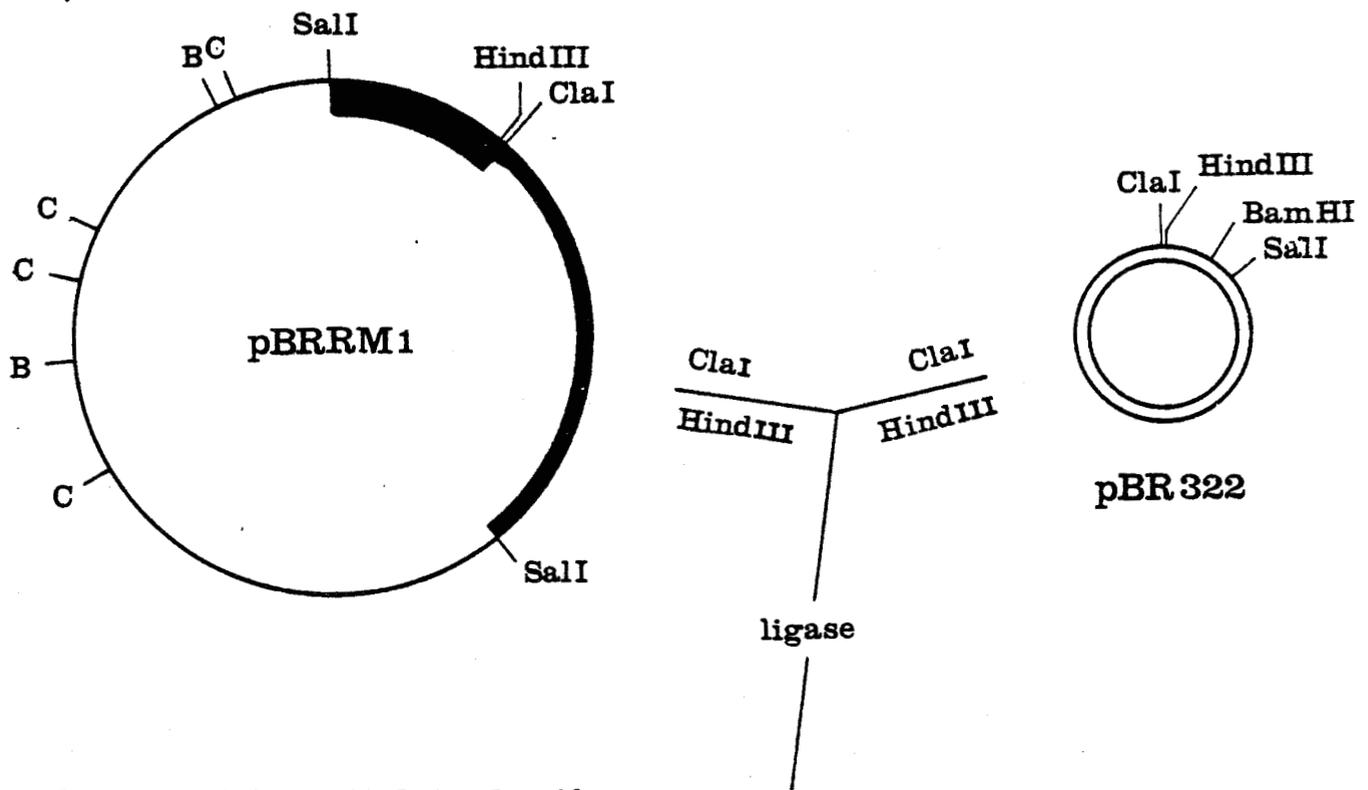
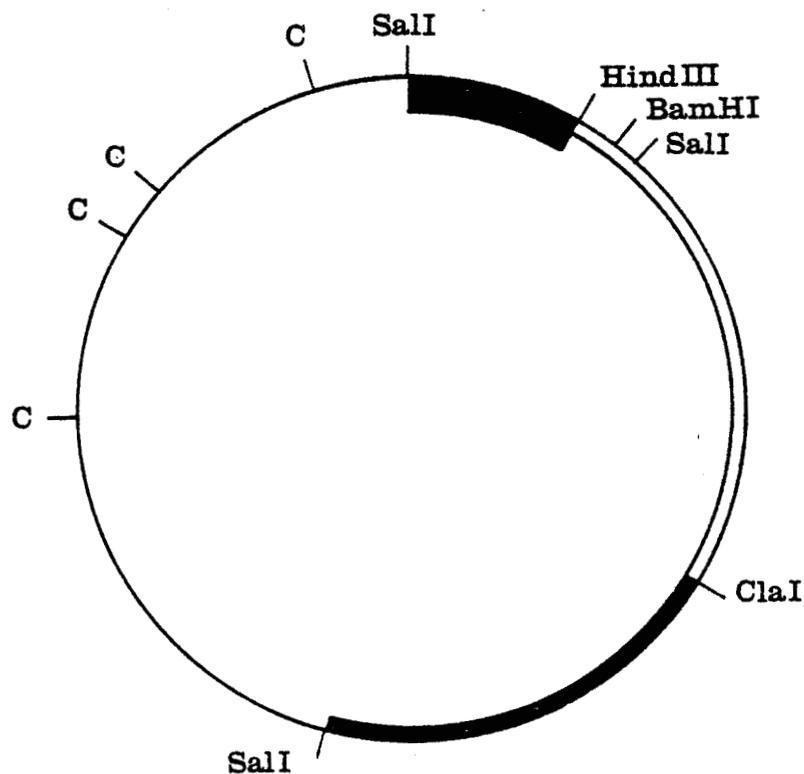


FIGURE 7 - CONSTRUCTION DE DEUX MUTANTS DE DELETION DU PLASMIDE pBRRM1, Δ2B et ΔG, AYANT RESPECTIVEMENT PERDU LES FRAGMENTS B1 ET B2 PRODUITS PAR ClaI ET LE FRAGMENT G ENGENDRE PAR BclI



B,C : sites BclI et ClaI du pRme 19a

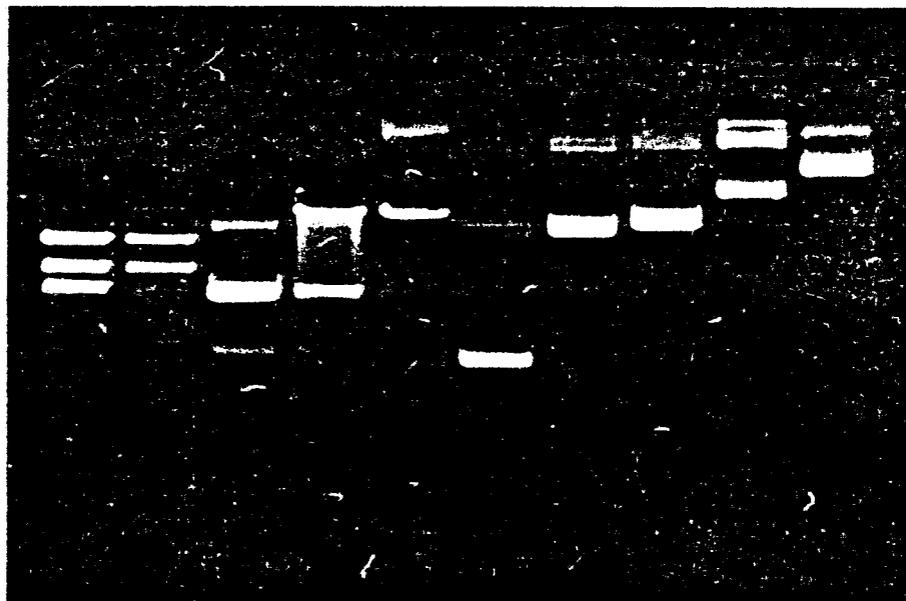


BUS  
LILLE

FIGURE 8 - CLONAGE DIRECTIONNEL THEORIQUE DU pBR322 AUX SITES ClaI ET HindIII du pBRRM1

Hypothèses avant clonage : Puisque pBR::x (partie foncée du pBRRM1) dérive directement du pBR322, les sites HindIII et ClaI doivent avoir la même orientation relative dans les 2 plasmides - L'hybride pBRRM1/pBR322 permettrait de produire, grâce à l'enzyme ClaI, des mutants de délétion du pRme 19a, conservant les fonctions de répllication et le site BamHI du pBR::x ainsi que la zone modifiée du pBR::x - La digestion de ce plasmide hybride par l'enzyme SalI donnerait le profil de restriction représenté dans la partie A de la photo 10.

Le plasmide hybride pA6'1 (pBRRM1-pBR322) (photo 10) devait bien sûr révéler la possibilité de clonage dans le pBRRM1, soit au site ClaI, soit au site HindIII, mais surtout mettre en évidence l'orientation réelle des sites HindIII et ClaI dans le pBRRM1 (photo 10, fig. 8 et 9). La digestion de pA6'1 par SalI (photo 10, B - piste 1) montre que les sites HindIII et ClaI ne sont pas situés d'une manière identique sur pBR322 et pBRRM1 alors qu'ils devraient l'être (hypothèse faite *a priori* avant clonage : partie A du diagramme de la photo 10 et figure 8 ; situation réelle : photo 10, piste 1 et figure 9).



Electrophorèse horizontale en gel d'agarose (1,2 %)  
(tampon TBE, 3 H - 150 V)

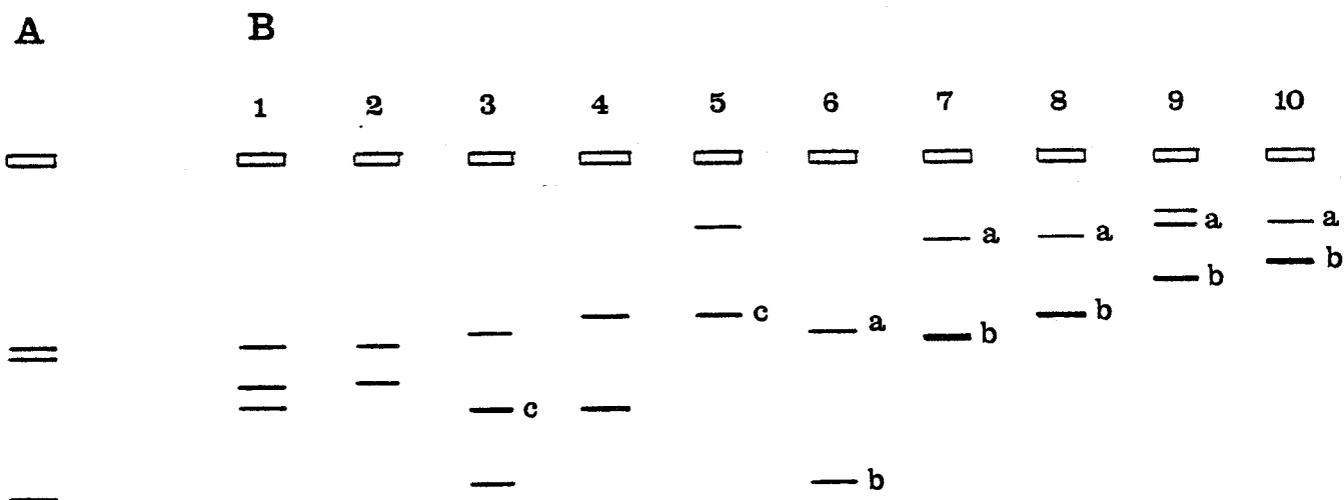


PHOTO 10 - MUTANTS DE DELETION  $\Delta 2B$  ET  $\Delta G$  DU pBRRM1 - CLONAGE DIRECTIONNEL DE pBR322 DANS pBRRM1 ; ORIENTATIONS THEORIQUE (PARTIE A - fig. 8) ET REELLE (PARTIE B - fig. 9)

- A. Profil de restriction théorique obtenu par digestion d'un plasmide hybride pBRRM1/pBR322 (présenté à la fig. 8) par l'enzyme Sall (hypothèse d'une même orientation relative des sites HindIII et ClaI dans les deux plasmides)
- B. 1. pA6'1 (pBR322/pBRRM1) Sall (profil de restriction réel) ; 2. pBRRM1 Sall ; 3. pBR322 HindIII ; 4. pA6'1 HindIII-ClaI ; 5. pBRRM1 HindIII ; 6. pBR322 témoin ; 7. (pBRRM1)  $\Delta 2B$  témoin ; 8. (pBRRM1)  $\Delta G$  témoin ; 9. pBRRM1 témoin ; 10. pA6'1 témoin

(a : forme circulaire ouverte, b : forme superhéliçoïdale, c : forme linéaire des plasmides).



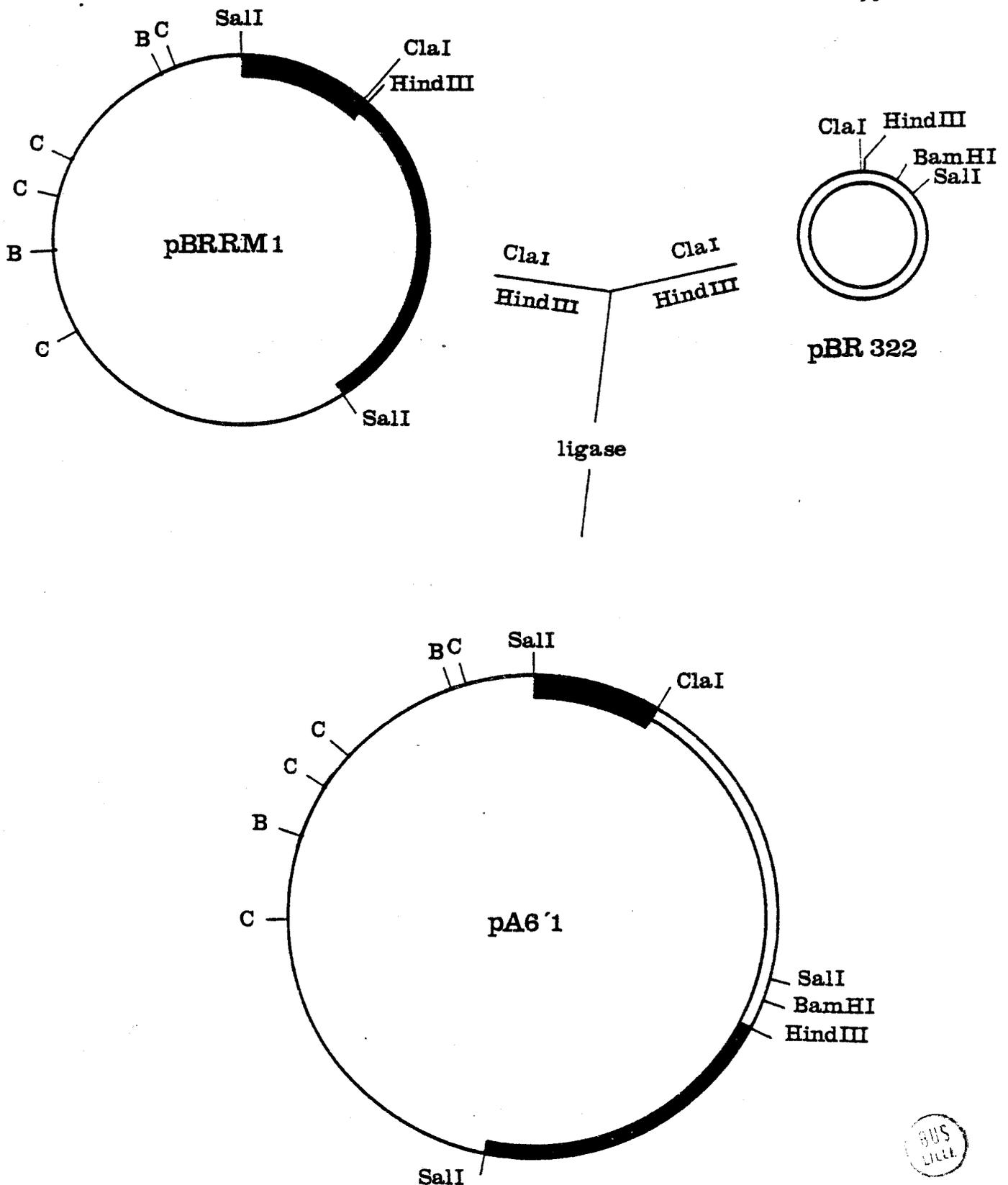


FIGURE 9 - CLONAGE DIRECTIONNEL REEL DU pBR322 AUX SITES ClaI ET HindIII du pBRRM1

Le plasmide pA6'1 obtenu (photo 10, B) est bien un hybride pBRRM1/pBR322 (pistes 3, 4, 5). L'analyse par l'enzyme SalI (1) révèle que pBR322 n'est pas orienté comme dans l'hypothèse présentée à la figure 8 (comparer les profils de restriction théorique - partie A - et réel - partie B, piste 1 -) mais en sens inverse (fig. 9). Les sites HindIII et ClaI du pBRRM1 n'ont plus leur orientation initiale (celle du pBR322).

## DISCUSSION

## I. - SITES DE RESTRICTION DU pRme 19a

Les différentes enzymes de restriction qui ont interagi avec pRme 19a ont permis d'établir sa carte d'identité moléculaire (carte de restriction) et de montrer, dans le cas des enzymes ClaI et BclI, l'absence de dam méthylation au moins dans la souche M19S de *R. meli-*  
*loti*.

Ce phénomène de méthylation nous amena logiquement à nous intéresser à la séquence GATC dans pRme 19a par le biais des différentes enzymes de restriction présentant tout ou partie de cette séquence dans leur site de reconnaissance.

Le tableau 5 souligne quelques différences intéressantes entre les nombres théorique et réel de sites de restriction de certaines enzymes. Le nombre théorique de sites de reconnaissance pour une endonucléase donnée a été calculé en supposant une répartition au hasard des nucléotides dans l'ADN. Ceci ne correspond bien évidemment pas à la réalité puisque, l'ADN étant le support de l'information génétique, les nucléotides ne peuvent être répartis en séquence stochastique qui n'a aucune signification. Mais cette différence entre ce qui résulterait d'une simple distribution statistique et ce qui existe réellement sur de l'ADN qui a une valeur biologique certaine, constitue une approche originale des séquences n'existant pas par hasard dans l'ADN.

En effet, dans une hypothèse de répartition au hasard des nucléotides, il est vraiment très peu probable que les enzymes PvuI, ClaI et BamHI réagissent avec l'ADN du pRme 19a comme elles le font. Il faut donc rejeter cette hypothèse, ce que nous savions déjà, mais également admettre qu'une partie ou la totalité du site de reconnaissance de Pvu I et ClaI constitue ou fait partie d'une séquence impliquée biologiquement dans pRme 19a.

TABLEAU 5 - APPROCHE DE LA SEQUENCE DE L'ADN DU pRme 19a PAR LE BIAIS DES ENDONUCLEASES DE RESTRICTION

Enzyme de restriction	Site de reconnaissance	62,5 % en GC*	théorique (m)	observé (x)	Probabilité (1) d'obtenir le nombre de sites de restriction observés (x) pour une enzyme donnée sur pRme 19a, dans l'hypothèse d'une répartition au hasard des nucléotides dans l'ADN
PvuI (3)	C <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GATC</span> G	2983	2,45	≥ 8	$P(x=8) = 0,0028$
BclI (2)	T <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GATC</span> A	8285	0,89	2	$P(x=2) = 0,1626$
ClaI	ATC <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GAT</span>	8285	0,89	5	$P(x=5) = 0,0019$
ClaI + 1 cytosine (2)	ATC <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GATC</span>	26512	0,28	4	$P(x=4) = 0,0002$
BamHI (3)	G <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GATC</span> C	2983	2,45	0	$P(x=0) = 0,086$

(1) la variable x suit une loi de Poisson  
 la probabilité que x prenne la valeur k est égale à :  $P(x=k) = e^{-m} \times \frac{m^k}{k!}$

m étant le nombre théorique de site(s) de restriction  
 (2) sensibles à la dam méthylation

(3) insensibles à la dam méthylation

\* ADN de *Rhizobium* - Les nucléotides A,T/G,C ne sont pas équiprobables.



## II. - MODIFICATIONS DU pBR322

La zone modifiée du pBR322, située dans le petit fragment SalI-ClaI (photo 3, fig. 5), est indéniablement liée aux phénomènes de mobilisation par pRK2013 et à la résistance à la kanamycine. pBRRM1 et pBR::x possèdent en effet tous deux ces mêmes qualités alors que pBR322 en est dépourvu.

Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour tenter d'expliquer l'augmentation de taille du pBR322 et ses qualités nouvelles.

Certaines supposaient la duplication, l'inversion de certaines régions du pBR322 ou une recombinaison entre les ADN du pBR322 et du pRme 19a. Mise à part l'inversion des sites HindIII et ClaI du pBR322 dans pBRRM1, rien ne vient soutenir ces hypothèses ; au contraire, le fait que les sites de restriction de la zone modifiée ne correspondent ni à ceux du pBR322, ni à ceux du pRme 19a, tend plutôt à les infirmer.

La nomenclature utilisée pour désigner la modification du pBR322 (:x) indique que l'insertion d'un élément génétique transposable, provenant de la souche C600, nous paraît beaucoup plus probable. En effet, l'insertion d'un tel élément explique à la fois la disparition du site BamHI, l'apparition de nombreux sites de restriction nouveaux et l'augmentation de taille d'environ 1 000 bp. Celle-ci pourrait être la résultante de l'insertion d'un transposon (d'une masse moléculaire supérieure à l'augmentation de taille constatée), conférant la résistance à la kanamycine, et d'une délétion concomitante d'une partie de l'ADN avoisinant. La souche C600 n'étant pas résistante à la kanamycine et les sites de restriction de part et d'autre de la zone modifiée n'ayant pas été perturbés, il est plus vraisemblable d'attribuer cette modification de taille du pBR322 à une séquence d'insertion (IS X), longue de 1 000 bp environ, venue s'insérer dans le pBR322.



## A. - MOBILISATION

Cette séquence d'insertion pourrait expliquer la mobilisation par PRK2013. En effet, plusieurs auteurs ont déjà signalé que la capacité qu'ont certains plasmides à mobiliser ou à être mobilisés (Pma : "plasmid mobilization ability") par un autre plasmide pouvait être la conséquence de la transposition d'un élément génétique transposable d'un plasmide à l'autre. Un "cointegrate" se forme entre plasmides mobilisateur et mobilisé grâce à cette homologie et se dissocie ensuite dans la bactérie réceptrice. Ces transpositions ont déjà été observées, du plasmide mobilisateur au plasmide mobilisé (HOOYKAAS *et al.* 1980, McCOMBIE *et al.* 1983, pour une revue voir CLARK et WARREN 1979) ou inversement (OLSEN et HANSEN 1976, OLSEN 1978, CRISONA *et al.* 1980). Bien que dans les cas précédents les éléments transposables soient des transposons, cela n'exclut absolument pas l'implication possible de séquences d'insertion dans de tels processus de mobilisation, suivant des mécanismes identiques aux précédents (KISS et KALMAN 1982, SCOTT et RONSON 1982).

Le "cointegrate" qui se transfère d'une bactérie à l'autre peut ne pas résulter de telles transpositions mais être produit par recombinaison entre des séquences homologues existant sur les deux plasmides (BROOME-SMITH 1980, KILBANE et MALAMY 1980, WARREN et CLARK 1980, PETERSON *et al.* 1982).

La recombinaison homologue et la transposition d'éléments génétiques d'un plasmide à l'autre, permettant la formation d'un "cointegrate" transférable, grâce aux homologies existantes ou créées, ne semblent pas impliquées dans la mobilisation de plasmides, tel le RSF1010. Aucune homologie entre plasmides mobilisé et mobilisateur, ne peut en effet être mise en évidence après mobilisation (WILLETTS et CROWTHER 1981, OBUKOWICZ et SHAW 1983).

D'autre part, certains plasmides conjugatifs, pourtant intégrés dans le chromosome de la bactérie donatrice, sont capables de mobiliser de la souche donatrice à une autre, réceptrice, des plasmides dans lesquels a été insérée la région mob du plasmide intégré (SIMON *et al.* 1983). Cette région contient le site de relaxation, encore

appelé, origine de transfert conjugatif (GUINEY et HELINSKI 1979, NORDHEIM *et al.* 1980). Les produits des gènes tra du plasmide conjugatif viennent compléter cette région mob et permettent le transfert conjugatif du plasmide. La mobilisation du RSF1010 pourrait s'expliquer par cette complémentation puisqu'un site de relaxation a été récemment mis en évidence (OBUKOWICZ et SHAW 1983).

La mobilisation du pRK290 par pRK2013 correspond très certainement à ce mécanisme car pRK2013 porte les gènes tra du plasmide RK2 parental et pRK290, la région mob. Dans ce cas, il est également possible qu'un "cointegrate" transitoire se forme puisque les deux plasmides présentent certaines homologues et puisque le transfert du pRK290 s'accompagne toujours de celui du pRK2013 (DITTA *et al.* 1980).

L'insertion dans pBRRM1 d'un élément génétique transposable provenant de pRK2013 n'est pas concevable puisque pBRRM1 avant (isolé de la souche C600 d'*E. coli* puis transformé dans une souche Dam<sup>-</sup> d'*E. coli*) et après mobilisation (isolé de la souche M19S) présente non seulement la même taille mais également les mêmes profils de restriction pour BclI et ClaI.

Par contre, la transposition de l'IS X du pBRRM1 sur le pRK2013 n'est pas à rejeter. L'examen du pRK2013 après mobilisation du pBRRM1 vers une souche d'*E. coli* (pRK2013 ne peut se maintenir que chez les entérobactéries) devrait ou non confirmer cette hypothèse.

La mobilisation pourrait résulter également d'une certaine homologie existant entre cette zone modifiée du pBR322 qui confère d'une manière ou d'une autre une résistance à la kanamycine, et le pRK2013 qui possède également un tel gène de résistance.

Le problème reste cependant entier puisque pBR325, un pBR322 dans lequel a été inséré *in vitro* un gène de résistance au chloramphénicol, est mobilisable par pRK2013 (LONG *et al.* 1983) alors que pBR322 ne l'est pas. Dans ce cas, comme dans le nôtre, l'incompatibilité des fonctions de répllication des plasmides mobilisateur et mobilisé ne semble pas interférer.

## B. - RESISTANCE A LA KANAMYCINE

La résistance à la kanamycine pourrait résulter de l'activation de l'information structurale de résistance, portée par l'IS X, par le promoteur P2 du gène de résistance à la tétracycline du pBR322 (STÜBER et BUJARD 1981). Un cas de ce genre a déjà été signalé (SCHUPP *et al.* 1983) : dans un plasmide hybride composé de deux plasmides différents, l'un, pBR325, provenant d'*E. coli*, l'autre de *Streptomyces*, un gène de résistance à la néomycine du second plasmide, normalement inactif chez *E. coli*, est venu se mettre, à la suite de phénomènes de recombinaison, sous la dépendance du promoteur P2 du pBR325 et est devenu actif avant que ne soit appliquée une quelconque pression de sélection.

Il n'est pas possible d'envisager, comme dans l'exemple précédent, l'activation d'un gène de résistance, préexistant dans pRme 19a, puisque les sites de restriction de la zone modifiée du pBR322 ne correspondent pas à ceux du pRme 19a (et que la M19S n'est pas résistante à la kanamycine). Bien que la résistance à la kanamycine ne soit pas typiquement caractéristique d'*E. coli*, l'hypothèse d'une séquence d'insertion, provenant de la C600, portant une information non-fonctionnelle (car sans promoteur actif) activée par le promoteur P2, semble dans notre cas plus plausible. En effet, compte tenu de la longueur du gène de résistance à la kanamycine du plasmide pKC7 (RAO et ROGERS 1979), une séquence d'insertion de 1 000 bp suffit à contenir l'information nécessaire.

Inversement, l'IS X pourrait porter un promoteur et être venue activer une information préexistante dans le pBR322. Ces activations, voire même inactivations de gènes par des promoteurs mobiles portés par des séquences d'insertion, sont relativement fréquentes chez *E. coli* mais concernent généralement plus les gènes clonés par le vecteur et semblent être une adaptation du génome bactérien à une pression de sélection, activation de gènes complétant une auxotrophie dans un cas (WALZ *et al.* 1978, JUND et LOISON 1982, CHARLIER *et al.* 1982), inactivation des effets délétères des gènes clonés, dans l'autre (AMSTER *et al.* 1982). Cependant, il semblerait que certains arrangements nouveaux au niveau de la séquence de l'ADN, créés en particulier

lors de recombinaisons génétiques *in vitro*, puissent déclencher la transposition à haute fréquence de séquences d'insertion, en l'absence de toute pression de sélection. Même si certaines de ces insertions peuvent se révéler conférer un avantage sélectif à la bactérie par la suite, elles ne répondent qu'à un message génétique interne que ne vise pas à faire disparaître l'insertion (AMSTER *et al.* 1982).

L'information structurale de résistance à la kanamycine pourrait n'être qu'un héritage d'un des plasmides parentaux du pBR322 ou être constituée d'un des gènes de résistance à la tétracycline qui aurait une action pléiotrope ou encore d'un des gènes potentiels de cette zone. En effet, la séquence nucléotidique du pBR322 a révélé que la zone conférant la résistance à la tétracycline pouvait coder pour 7 polypeptides de plus de 100 acides aminés (SUTCLIFFE 1979). En condition normale, 5 protéines sont synthétisées à partir de cette région (MEAGHER *et al.* 1977, TAIT et BOYER 1978) ; plusieurs d'entre elles seraient impliquées dans le mécanisme de résistance mais elles ne le sont pas nécessairement toutes. La résistance à la kanamycine pourrait très bien résulter de l'intervention de certains de ces polypeptides ou de l'activation de l'information potentielle habituellement non-exprimée.

En l'absence de données précises concernant la filiation du pBR322, les mécanismes de résistance à la tétracycline et à la kanamycine des pBR322 et pBRRM1, il est difficile de formuler autre chose que des hypothèses.

Une dernière remarque s'impose : lors de l'expérience de clonage dont est issu pBRRM1, certains clones, résistants à l'ampicilline et sensibles à la tétracycline, se révélèrent contenir des pBR322 reconstitués, plus gros que les autres (un peu comme certains clones de la photo 2 - rappelons que tous ces clones sont résistants à l'ampicilline et sensibles à la tétracycline). Les plasmides de deux de ces clones ont des tailles différentes, pratiquement équivalentes à celle du pBR::x, confèrent une résistance à la kanamycine (250 µg/ml) et l'un au moins de ces deux plasmides, est mobilisable par pRK2013.

Bien que dans ce dernier cas, l'origine de la différence de taille entre les deux plasmides (qui ont en commun au moins l'aptitude à conférer la résistance à la kanamycine) ne soit pas claire, la corrélation augmentation de taille du pBR322/mobilisation et résistance à la kanamycine semble de plus en plus évidente.

L'état physiologique particulier des bactéries C600, ayant servi à la transformation, ou certaines séquences nouvelles portées par pRme 19a (les deux plasmides dont nous venons de parler pourraient être délétés de la quasi-totalité du pRme 19a, ce qui expliquerait la différence de taille entre les deux plasmides), créées lors du clonage ou de la transformation (certains réarrangements génétiques peuvent avoir lieu lors de la transformation bactérienne, GARAEV *et al.* 1982) peuvent avoir déclenché la transposition de séquences d'insertion du génome de la C600 sur l'ADN du pBR322, provoquant une augmentation de taille concomitante. Il serait intéressant d'étudier dans ces deux plasmides assimilables au pBR::x, l'augmentation de taille, sa localisation, ses sites de restriction, etc...

Les mécanismes exacts de mobilisation et de résistance restent encore du domaine de l'hypothèse. L'exception étant bien souvent la règle, il convient d'être prudent.

### III. - MODIFICATIONS DU pRme 19a

pRme 19a n'a pas beaucoup souffert de son clonage et de son maintien chez *E. coli*. Ses propriétés fondamentales, ses fonctions de réplication, n'ont été inactivées, ni par l'insertion au site SallI, ni par le maintien prolongé en l'absence de pression sélective.

Un site ClaI, situé très près ( $\approx 100$  bp) du site SallI a disparu, sans doute inactivé, comme c'est assez souvent le cas, par des phénomènes secondaires résultant de l'insertion du pBR322 au site SallI.

Il est encore possible que cette disparition, tout comme l'apparition d'un site PstI un peu plus loin sur pRme 19a, résulte d'une mutation ponctuelle de l'ADN (DOMINGO *et al.* 1978, SUTCLIFFE 1979). En effet, dans le cas du site PstI, ni les sites de restriction environnants, ni la longueur des fragments de restriction, n'ont été affectés. Le maintien chez *E. coli* sans pression sélective pourrait être responsable de ces mutations ponctuelles. Ces petites modifications de la séquence de l'ADN, souvent sans incidence biologique, sont démesurément amplifiées lorsqu'elles inactivent ou créent une séquence nouvelle de reconnaissance d'une endonucléase. La très grande spécificité des enzymes de restriction est presque un inconvénient.

#### IV. - MOBILISATION VERS LES RHIZOBIACÉES : PROPRIÉTÉS D'UN PLASMIDE DE RHIZOBIUM MELILOTI

Les expériences de mobilisation du pBRRM1 vers diverses espèces de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* ont établi que les fonctions de répliation du pRme 19a sont non seulement toujours fonctionnelles mais également "à large spécificité d'hôte". Un plasmide provenant de l'espèce *meliloti* assure en effet son maintien et celui d'un plasmide d'*Escherichia coli* chez les *Rhizobium* à croissance rapide (y compris *R. trifolii*, BECHET -comm. pers-) et chez *Agrobacterium*.

Ceci vient confirmer les résultats d'expériences de mobilisation de pSym de *R. meliloti* (KONDOROSI *et al.* 1983, TRUCHET *et al.* 1983), de *R. japonicum* (ENGWALL *et al.* 1983) et de *R. leguminosarum* (HOOYKAAS *et al.* 1982) qui se montrèrent capables de se répliquer et de s'exprimer, au moins en partie, chez d'autres espèces de *Rhizobium* et chez *Agrobacterium*. La cohérence de cette division taxonomique qu'est la famille des Rhizobiacées, s'affirme maintenant au niveau moléculaire.

Les fréquences de mobilisation et la stabilité de pBRRM1, sans pression sélective chez les Rhizobiacées (les souches de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium*, présentées à la photo 5, ont toutes été cultivées en l'absence de kanamycine) confirment que le transfert conjugatif permet dans une certaine mesure d'éviter les systèmes de restriction et de recombinaison de ces souches sauvages (DITTA *et al.* 1980, KISS et KALMAN 1982).

Il serait intéressant de vérifier, chez *Rhizobium*, la stabilité du pBRRM1 dans la forme endosymbiotique (bactéroïde). pRK290, actuellement très utilisé dans les expériences de complémentation chez *Rhizobium*, présente une certaine instabilité dans le bactéroïde qui peut être attribuée, soit à une déficience ou une inhibition des fonctions de réplication du plasmide, soit à des phénomènes de recombinaison entre le fragment d'ADN inséré dans le plasmide et l'information endogène (LONG *et al.* 1982, CANTRELL *et al.* 1983). Intrinsèquement, pRme 19a est stable dans le bactéroïde, il n'existerait pas autrement ; pBRRM1 devant logiquement l'être également, il devient possible, en utilisant pBRRM1 pour le clonage, d'éliminer la première possibilité d'instabilité.

Les conditions des croisements résumés au tableau 4, ne sont pas les mêmes que celles que DITTA *et al.* (1980) employèrent pour tester leur système binaire pRK2013/pRK290. Nous n'avons, semble-t-il, pas utilisé les pleines possibilités de mobilisation du pRK2013 puisque, dans notre cas, la moyenne des fréquences de transfert du pRK290 vers *R. meliloti* est 60 fois plus faible que celle obtenue par ces auteurs avec ce même plasmide et la même espèce réceptrice.

Pour certaines souches réceptrices, on remarque que, malgré l'augmentation de la durée du croisement, les fréquences de mobilisation du pBRRM1 diminuent. Cela pourrait signaler une augmentation de la distance taxonomique séparant *R. meliloti* de ces différentes espèces ou/et une instabilité plus grande du pBRRM1 dans ces bactéries réceptrices. Mais il faut souligner que les fréquences de mobilisation du pRK290 évoluent dans le même sens et que le rapport des fréquences de mobilisation des pRK290 et pBRRM1 reste à peu près constant (pRK290 est de 5 à 10 fois plus mobilisable que pBRRM1, ce qui est

tout à fait normal, compte tenu de la parfaite correspondance entre pRK290 et pRK2013) quel que soit l'espèce ou le genre. Cette diminution de la fréquence ne fait en définitive que refléter une inadéquation des conditions de croisement qui n'ont pas été optimisées.

Après quelques mises au point, ce système binaire pRK2013/pBRRM1 constituera une voie d'accès aux Rhizobiacées tout à fait opérationnelle.

#### V. - pBRRM1, VECTEUR DE CLONAGE ,

Nous avons vu que l'utilisation pour le clonage des sites uniques de restriction SstII et XhoI dépendait de la localisation des fonctions de réplication du pRme 19a.

Les propriétés de mobilisation et de réplication des deux mutants de délétion du pBRRM1,  $\Delta 2B$  et  $\Delta G$ , sont actuellement à l'étude mais il semble, au vu de premières expériences, qu'ils aient conservé les caractéristiques fondamentales du plasmide parental. Si ces résultats devaient se confirmer par la suite, cela voudrait dire que les fonctions de réplication du pRme 19a sont localisées sur le fragment A ou/et C (fig. 4 - digestion ClaI). Les sites SstII et XhoI seraient donc situés en dehors des fonctions essentielles à la réplication chez les Rhizobiacées et pourraient être considérés comme des sites de clonage.

Les plasmides (pBRRM1)  $\Delta 2B$  et  $\Delta G$  ont conservé respectivement les sites SstII et XhoI, tout en perdant quand même 40 et 30 % de l'ADN du pRme 19a. Respectivement 23 % et 20 % plus petits que le plasmide pBRRM1 initial, ils pourraient être utilisés, tout comme pBRRM1 le sera (pour l'instant, grâce à ses sites HindIII et ClaI), comme vecteurs de clonage dans les expériences de complémentation chez les Rhizobiacées.

Des séquences d'ADN nécessairement présentes dans l'ADN du pRme 19a et spécifiquement reconnues par les systèmes de transcription et de traduction des Rhizobiacées, peuvent permettre l'expression, dans ces bactéries, des gènes clonés dans pBRRM1 et ses dérivés éventuels.

N.B. : pBR::x peut, quant à lui, servir de vecteur d'homogénéisation puisqu'il est mobilisable par pRK2013 mais incapable de se répliquer chez les Rhizobiacées ; le site SalI, dans lequel était inséré pRme 19a, servant de site de clonage.

## CONCLUSION

La construction et la mobilisation de pBRRM1 vers les Rhizobiacées a permis de mettre en évidence :

- l'absence d'interférence entre les fonctions d'incompatibilité et les aptitudes à mobiliser ou à être mobilisé de deux plasmides d'une même bactérie,
- l'absence de dam méthylation au moins chez la souche M19S de *R. meliloti*,
- l'implication biologique probable de certaines séquences de nucléotides dans l'ADN du pRme 19a,
- la large spécificité d'hôte des fonctions de répllication d'un plasmide de *R. meliloti* chez les Rhizobiacées,
- la possibilité qu'offre le transfert conjugatif d'éviter, dans une certaine mesure, les systèmes de restriction et de recombinaison de la bactérie.

De nouveaux problèmes ont été posés concernant :

- les mécanismes de mobilisation des plasmides,
- les origines et les effets de certaines "modulations" génétiques dans la bactérie,
- l'apparition d'une résistance inattendue dans le plasmide peut-être le mieux connu en biologie moléculaire.

pBRRM1 se maintenant chez différentes espèces de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium*, il sera possible de vérifier assez facilement si l'absence de dam méthylation est ou non une caractéristique des Rhizobiacées. Mais au-delà de ces considérations, somme toute, fondamentales, pBRRM1 devrait trouver de nombreuses applications pratiques dans le clonage de gènes.

La grande originalité de ce vecteur de clonage, composé de deux ensembles différents de fonctions de répllication, réside dans l'ADN qui assure le maintien et qui permettra peut-être l'insertion, voire même l'expression des gènes clonés, chez les Rhizobiacées.

La stabilité dont fait preuve pBRRM1 dans les formes bactériennes des différents *Rhizobium* à croissance rapide ainsi que celle, "naturelle", du pRme 19a dans la forme symbiotique, laissent supposer les potentialités importantes de ce vecteur dans l'amélioration génétique des symbioses existantes. pBRRM1 pourrait, en effet, servir à introduire, maintenir et exprimer durablement des gènes "améliorants". Une information génétique, même véhiculée par un vecteur incapable de se répliquer ou instable, peut être quand même conservée par la bactérie réceptrice mais uniquement lorsqu'il existe des homologues entre informations exogène et endogène (voir dans la première partie : expériences et vecteurs d'homogénéisation). Lorsque les gènes introduits n'ont pas d'homologues dans le génome endogène, ils ne peuvent, dans ces conditions, qu'être perdus. L'introduction, par exemple, des gènes hup clonés dans pBRMM1 ("Hydrogen uptake" - système récupérateur de l'énergie perdue secondairement au cours de la réduction de l'azote atmosphérique. Ce(s) gène(s) n'existe(nt) pas chez de nombreux fixateurs symbiotiques) chez de nombreuses souches de *Rhizobium*, serait une voie sûre d'amélioration du rendement des légumineuses (voir première partie).

Le problème de l'implication biologique du pRme 19a reste en suspens. Nous avons vu précédemment que des plasmides de cette taille étaient assez peu fréquents chez *Rhizobium* et que deux autres plasmides, ayant singulièrement pratiquement la même masse moléculaire que pRme 19a, ont été observés, toujours chez *R. meliloti* (PÜHLER *et al.* 1982).

Ces faits n'ont-ils aucune signification particulière ou révèlent-ils un mécanisme fondamental de la relation symbiotique, tout comme la mutation témoigne de l'existence d'un gène ?

En effet, les genres *Agrobacterium* et *Rhizobium*, qui constituent la famille des Rhizobiacées, présentent de nombreuses analogies, ne serait-ce que dans leurs interactions avec les cellules végétales. Or, chez *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*, le pouvoir oncogène est contrôlé par les plasmides Ti (VAN LAREBEKE *et al.* 1975, WATSON *et al.* 1975) et Ri (WHITE et NESTER 1980) et une partie de ces plasmides, appelée T-DNA ("transfer DNA"), est transférée, s'intègre et s'exprime dans le génome de la cellule végétale tumorale (DRUMMOND *et al.* 1977,

WHITE *et al.* 1982).

L'homologie entre *Agrobacterium* et *Rhizobium* s'affirmant maintenant au niveau moléculaire, puisqu'ont été mises en évidence des relations entre plasmides symbiotiques de *Rhizobium* et des plasmides Ti (PRAKASH et SCHILPEROORT 1982) et entre le T-DNA d'*A. tumefaciens* et l'ADN total des souches de *Rhizobium* (HADLEY et SZALAY 1982), il semble logique de rechercher chez *Rhizobium* un élément génétique analogue au T-DNA d'*Agrobacterium* qui serait impliqué dans l'établissement des relations symbiotiques bactérie/légumineuses.

pBRRM1, marqué radioactivement, servira à vérifier l'hypothèse selon laquelle pRme 19a, intégré en conditions normales, par exemple, dans le pSym, mais exceptionnellement sous une forme autonome plasmidique dans la souche M19S, correspondrait au T-DNA de *Rhizobium*. Retrouve-t-on des séquences homologues du pRme 19a chez d'autres *meliloti* et chez d'autres espèces ?

Mais qu'il soit ou non ce "médiateur génétique", pRme 19a, en tant que partie intégrante de pBRRM1, est appelé à servir le biologiste moléculaire et l'agronome.

## CONCLUSION EN FORME DE

## R E S U M E

*Rhizobium*, bactérie du sol fixatrice d'azote atmosphérique, établit des relations symbiotiques avec des plantes supérieures d'intérêt agronomique, les légumineuses.

La compréhension des bases moléculaires des interactions symbiotiques est un préalable indispensable à l'amélioration et à l'extension de ce système naturel. Cette domestication, objectif de nombreux laboratoires de recherche, aura une incidence sur le bilan énergétique de l'agriculture et sur la production alimentaire mondiale.

L'analyse génétique de *Rhizobium* a rapidement progressé ces dernières années grâce à l'application et à l'adaptation à cette bactérie de techniques de génétique et de biologie moléculaire, mises au point initialement chez *Escherichia coli*.

Mais les spécificités de *Rhizobium*, en particulier, la distance taxonomique le séparant d'*E. coli*, l'absence de méthode de transformation bactérienne utilisable en pratique et la différenciation de la bactérie en bactéroïde au cours de l'établissement de la symbiose, limitent l'extension de l'expérience génétique acquise chez les entérobactéries, compliquent l'analyse et entravent les possibilités d'amélioration des symbioses existantes.

Afin de concilier et de répondre au mieux aux exigences que nous imposent les particularités de *Rhizobium* et nos objectifs fondamentaux et appliqués, nous avons développé au cours de notre travail, un système de clonage à partir d'un petit plasmide de *Rhizobium meliloti*. Grâce aux techniques de génie génétique, ce plasmide a été transformé en vecteur de clonage :

- porteur de marqueurs génétiques utilisables chez *E. coli*, *Rhizobium* et *Agrobacterium*,
- possédant des sites uniques de restriction,
- capable de se répliquer, amplifiable chez *E. coli*,
- mobilisable d'*E. coli* aux *Rhizobium* à croissance rapide (*R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*) et vers *Agrobacterium*

(*A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*),

- stable sans pression sélective chez ces Rhizobiacées.

Ce vecteur et ce système de clonage (préparation de l'ADN vecteur par amplification chez *E. coli*, insertion de gènes *in vitro*, transformation bactérienne chez *E. coli*, mobilisation vers *Rhizobium* ou *Agrobacterium*, passage sur plante) enrichissent indubitablement la panoplie du biologiste moléculaire et devraient participer à et simplifier l'étude des gènes bactériens impliqués dans l'établissement et la régulation des relations bactérie/plante supérieure. Mais l'agronome pourrait également tirer profit des propriétés de réplication et de stabilité que confèrent à ce vecteur ses origines. Le rendement des légumineuses pourrait être augmenté grâce à l'introduction et surtout à la conservation, *via* ce vecteur, de gènes "améliorants" chez les différentes espèces de *Rhizobium*.

Mots-clés : *Rhizobium meliloti*, génie génétique, vecteur de clonage, mobilisation, Rhizobiacées.

BIBLIOGRAPHIE

- AGUILAR O.M., P. MÜLLER and A. PÜHLER, 1983. - Molecular analyses of *Rhizobium meliloti* genes involved in nodulation.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- ALBRECHT S.L., R.J. MAIER, F.J. HANUS, S.A. RUSSELL, D.W. EMERICH and H.J. EVANS, 1979. - Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans.  
*Science* 203 : 1255-1257.
- ALI H., 1982. - Obtention de mutants chez *Rhizobium meliloti* par l'insertion du transposon Tn5 et étude de leurs révertants.  
Thèse de 3ème Cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- AMSTER O., D. SALOMON and A. ZAMIR, 1982. - A cloned immunoglobulin c-DNA fragment enhances transposition of IS elements into recombinant plasmids.  
*Nucl. Acid Res.* 10 (15) : 4525-4542.
- AUSUBEL F.M. and F.C. CANNON, 1980. - Molecular genetic analysis of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes.  
*Cold Spring Harbor Symp.* 45 (P2) : 487-492.
- BACHMANN B.J., 1983. - Linkage map of *Escherichia coli* K12. Edition 7.  
*Microbiol. Rev.* 47 : 180-230.
- BADENOCH-JONES J., C. BATES, K. SCOTT, B. ROLFE and J. SHINE, 1983. - Nitrogenase structural genes in the fast-growing broad-host range *Rhizobium* strain, ANU240.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- BAGDASARIAN M., R. LURZ, B. RÜCKERT, F.C.H. FRANKLIN, M.M. BAGDASARIAN, J. FREY and K.N. TIMMIS, 1981. - Specific-purpose plasmid cloning vectors. II - broad host range, high copy number, RSF1010 derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*.  
*Gene* 16 : 237-247.

- BANFALVI Z., V. SAKANYAN, C. KONCZ, A. KISS, I. DUSHA and A. KONDOROSI,  
1981. - Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a  
high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*.  
*Mol. Gen. Genet.* 184 : 318-325.
- BANFALVI Z., G.S. RANDHAWA, E. KONDOROSI, A. KISS and A. KONDOROSI,  
1983. - Construction and characterization of R-prime plasmids  
carrying symbiotic genes of *Rhizobium meliloti*.  
*Mol. Gen. Genet.* 189 : 129-135.
- BENDER G.L., J.M. WATSON, J. PLAZINSKI, J.E. OLSSON and B.G. ROLFE,  
1983. - A genetic analysis of the fast-growing *Rhizobium* strains  
IHP100 and ORS 571.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- BERGERSEN F.J., 1977. - Physiological chemistry of dinitrogen fixation  
by legumes.  
*In* : A treatise on dinitrogen fixation, Section 3, Ed. R.W.F. Har-  
dy and W.S. Silver . J. Wiley and Sons, New-York, p. 519-555.
- BERINGER J.E., S.A. HOGGAN and A.W.B. JOHNSTON, 1978a. - Linkage map-  
ping in *Rhizobium leguminosarum* by means of R plasmid-mediated  
recombination.  
*J. Gen. Microbiol.* 104 : 201-207.
- BERINGER J.E., J.L. BEYNON, A.V. BUCHANAN-WOLLASTON and A.W.B. JOHNSTON,  
1978b. - Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to  
*Rhizobium*.  
*Nature* 276 : 633-634.
- BERINGER J.E., N.J. BREWIN and A.W.B. JOHNSTON, 1980. - The genetic  
analysis in relation to symbiotic nitrogen fixation.  
*Heredity* 45 (2) : 161-186.
- BERNARD H.U. and D.R. HELINSKI, 1980. - Bacterial plasmid cloning  
vehicles.  
*In* : Genetic engineering, principles and methods. Ed. J. Setlon  
and A. Hollaender, Plenum Press, 2 : 133-168.

- BETLACH M.C., V. HERSHFELD, L. CHOW, W. BROWN, H.M. GOODMAN and H.W. BOYER, 1976. - A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the EcoRI restriction and modification of DNA.  
*Fed. Proc.* 35 : 2037-2043.
- BETTER M., D. CORBIN, B. LEWIS, G. DITTA and D.R. HELINSKI, 1983. - Coordinate expression of symbiotic genes in *Rhizobium meliloti*.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- BEYNON J.L., J.E. BERINGER and A.W.B. JOHNSTON, 1980. - Plasmids and host-range in *Rhizobium leguminosarum* and *R. phaseoli*.  
*J. Gen. Microbiol.* 120 : 421-429.
- BOLIVAR F., R.L. RODRIGUEZ, P.J. GREENE, M.C. BETLACH, H.L. HEYNECKER, H.W. BOYER, J.H. CROSA and S. FALKOW, 1977. - Construction and characterization of new cloning vehicles. II - A multi-purpose cloning system.  
*Gene* 2 : 95-113.
- BREWIN N.J., T.M. DE JONG, D.A. PHILLIPS and A.W.B. JOHNSTON, 1980. - Co-transfer of determinants for hydrogenase activity and nodulation ability in *Rhizobium leguminosarum*.  
*Nature* 288 : 77-79.
- BROOME-SMITH J., 1980. - RecA independent, site-specific recombination between ColE1 or ColK and a miniplasmid they complement for mobilization and relaxation : implications for the mechanism of DNA transfer during mobilization.  
*Plasmid* 4 : 51-63.
- BRUNEL F., M. HEUSTERSPREUTE, M. MERCHEZ, V.H. THI, M.F. PILAETE and J. DAVISON, 1983. - Gene rearrangements leading to the expression of an insertion-inactivated tetracycline resistance gene in pBR322.  
*Plasmid* 9 : 201-214.

- BUCHANAN-WOLLASTON A.V., J.E. BERINGER, N.J. BREWIN, P.R. HIRSCH and A.W.B. JOHNSTON, 1980. - Isolation of symbiotically defective mutants in *Rhizobium leguminosarum* by insertion of the transposon Tn5 into a transmissible plasmid.  
*Mol. Gen. Genet.* 178 : 185-190.
- CALDWELL B.E. and H.G. VEST, 1977. - Genetic aspects of nodulation and nitrogen fixation by legumes : the macrosymbiont.  
*In* : A treatise on dinitrogen fixation, section 3, Ed. R.W.F. Hardy and W.S. Silver. J. Willey and Sons, New-York, p.557-576.
- CANNON F., G.E. RIEDEL and F.M. AUSUBEL, 1977. - Recombinant plasmid that carries part of the nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 2963-2967.
- CANNON F.C., G.E. RIEDEL and F.M. AUSUBEL, 1979. - Overlapping sequences of *Klebsiella pneumoniae nif* DNA cloned and characterized.  
*Molec. Gen. Genet.* 174 : 59-66.
- CANTRELL M.A., R.E. HICKOK and H.J. EVANS, 1982. - Identification and characterization of plasmids in Hydrogen uptake positive and Hydrogen uptake negative strains of *Rhizobium japonicum*.  
*Arch. Microbiol.* 131 : 102-106.
- CANTRELL M.A., R.A. HAUGLAND and H.J. EVANS, 1983. - Construction of a *Rhizobium japonicum* gene bank and use in isolation of a hydrogen uptake gene.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 181-185.
- CASSE F., C. BOUCHER, J.S. JULLIOT, M. MICHEL and J. DENARIE, 1979. - Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose electrophoresis.  
*J. Gen. Microbiol.* 113 : 229-242.
- CHARLIER D., J. PIETTE and N. GLANSDORFF, 1982. - IS3 can function as a mobile promoter in *E. coli*.  
*Nucl. Acid Res.* 10 (19) : 5935-5948.

- CHUA K.Y., B.D.W. JARVIS, C.E. PANKHURST and D.B. SCOTT, 1983. - Transposon mutagenesis and molecular cloning of symbiotic genes from *Rhizobium loti*.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- CLARK A.J. and G.J. WARREN, 1979. - Conjugal transmission of plasmids.  
*Annu. Rev. Genet.* 13 : 99-125.
- CLEWELL D.B., 1972. - Nature of ColE1 plasmid replication in the presence of chloramphenicol.  
*J. Bacteriol.* 110 : 667-676.
- COHEN S.N., A.C.Y. CHANG and L. HSU, 1973. - Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria : genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 : 2110-2114.
- COLLINS J.C. and B. HOHN, 1978. - Cosmids a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable *in vitro* in bacteriophage lambda heads.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 : 4242-4246.
- COVARRUBIAS L., L. CERVANTES, A. COVARRUBIAS, X. SOBERON, I. VICHIDO, A. BLANCO, Y.M. KUPERSZTOCH-PORTNOY and F. BOLIVAR, 1981. - Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328.  
*Gene* 13 : 25-35.
- CRISONA N.J., J.A. NOWAK, H. NAGAISHI and A.J. CLARK, 1980. - Transposon-mediated conjugal transmission of non-conjugative plasmid.  
*J. Bacteriol.* 142 : 701-713.
- CURRIER T.C. and E.W. NESTER, 1976. - Isolation of covalently circular DNA of high molecular weight from bacteria.  
*Anal. Biochem.* 76 : 431-441.
- DAGERT M. and S.D. EHRLICH, 1979. - Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells.  
*Gene* 6 : 23.

- DALTON H., 1974. - Fixation of dinitrogen by free-living microorganisms.  
*Critical Rev. Microbiol.* 3 : 183-220.
- DAVID M., O. DOMERGUE and D. KAHN, 1983a. - The Sym plasmid of *Rhizobium meliloti*. Transcription studies.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- DAVID M., M. VIELMA and J.S. JULLIOT, 1983b. - Introduction of IncQ plasmids into *Rhizobium meliloti*. Isolation of a host-range mutant of RSF 1010 plasmid.  
*FEMS Microbiol. Lett.* 16 : 335-341.
- DE JONG T.M., N.J. BREWIN, A.W.B. JOHNSTON and D.A. PHILLIPS, 1982. - Improvement of symbiotic properties in *Rhizobium leguminosarum* by plasmid transfer.  
*J. Gen. Microbiol.* 128 : 1829-1838.
- DENARIE J. et G. TRUCHET, 1979. - La symbiose *Rhizobium*-légumineuses : rôles respectifs des partenaires.  
*Physiol. Vég.* 17 (4) : 647-667.
- DIBB N.J., G.M. SORENSEN, J.A. DOWNIE, G. HOMBRECHER and N.J. BREWIN, 1983. - 24K. protein - a genetic marker for the symbiotic region of *Rhizobium leguminosarum*.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on nitrogen Fixation*, sous presse.
- DITTA G., S. STANFIELD, D. CORBIN and D.R. HELINSKI, 1980. - Broad host-range DNA cloning system for gram-negative bacteria : construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (12) : 7347-7351.
- DIXON R.A. and J.R. POSTGATE, 1972. - Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*.  
*Nature* 237 : 102-103.
- DIXON R., F. CANNON and A. KONDOROSI, 1976. - Construction of a P-plasmid carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*.  
*Nature* 260 : 268-271.

- DOMINGO E., D. SABO, T. TANIGUCHI and C. WEISSMAN, 1978. - Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population.  
*Cell* 13 : 735.
- DOWNIE J.A., Q.S. MA, C.D. KNIGHT, G. HOMBRECHER and A.W.B. JOHNSTON, 1983a. - Cloning of the symbiotic region of *Rhizobium leguminosarum* : the nodulation genes are between the nitrogenase genes and a nifA-like gene.  
*EMBO J.* 2 (6) : 947-952.
- DOWNIE J.A., C.D. KNIGHT and G. HOMBRECHER, 1983b. - Genetic and physical analysis of the symbiotic genes of *Rhizobium leguminosarum*.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- DRUMMOND M.H., M.P. GORDON, E.W. NESTER and M.D. CHILTON, 1977. - Foreign DNA of bacterial origin is transcribed in crown gall tumors.  
*Nature* 269 : 535-536.
- DUNICAN L.K. and F.C. CANNON, 1971. - Genetic control of symbiotic properties in *Rhizobium* : evidence for plasmid control.  
*Plant and Soil*, special volume : 73-79.
- EADY R.R. and J.R. POSTGATE, 1974. - Nitrogenase.  
*Nature* 249 : 805-810.
- ECKHARDT T., 1978. - A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria.  
*Plasmid* 1 : 584-588.
- ELMERICH C., J. HOUMARD, L. SIBOLD, I. MANHEIMER and N. CHARPIN, 1978. - Genetic and biochemical analysis of mutants induced by bacteriophage Mu DNA integration into *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes.  
*Mol. Gen. Genet.* 165 : 181-189.
- ELMERICH C., 1979. - Génétique de la fixation de l'azote.  
*Physiol. vég.* 17 (4) : 883-906.

- EMERICH D.W., T. RUIZ-ARGUESO, T.M. CHING and H.J. EVANS, 1979. - Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids.  
*J. Bacteriol.* 137 : 153-160.
- ENGWALL K., N. DU TEAU and A.G. ATHERLY, 1983. - Sym plasmids in *Rhizobium japonicum*.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- EVANS H.J., K. PUROHIT, M.A. CANTRELL, G. EISBRENNER, S.A. RUSSELL, F.J. HANUS and J.E. LEPO, 1981. - In : Current perspectives in nitrogen fixation. Ed. A.H. Gibson et W.E. Newton. Elsevier/ North Holland Biomedical Press, p.84-96.
- FACON J.P., 1981. - Etude d'un petit plasmide de *Rhizobium meliloti*.  
*Diplôme d'Etudes approfondies*, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- FACON J.P., M. BECHET and J.B. GUILLAUME, 1983. - A cloning vector derived from an indigenous small plasmid of *Rhizobium meliloti*. Construction and mobilization into the *Rhizobiaceae*.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- FIGURSKI D.H. and D.R. HELINSKI, 1979. - Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (4) : 1648-1652.
- FORRAI T., E. VINCZE, Z. BANFALVI, G.B. KISS, G.S. RANDHAWA and A. KONDOROSI, 1983. - Localization of symbiotic mutations in *Rhizobium meliloti*.  
*J. Bacteriol.* 153 (2) : 635-643.
- FRIEDMAN A.M., S.R. LONG, S.E. BROWN, W.J. BUIKEMA and F.M. AUSUBEL, 1982. - Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants.  
*Gene* 18 : 289-296.

- FUHRMANN M., K. KALUZA and H. HENNECKE, 1983. - In *Rhizobium japonicum* the nifDK and nifH genes are separated.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- GARAEV M.M., A.F. BOBKOV, A.F. BOBKOVA, V.N. KALININ, V.D. SMIRNOV, Y.E. KHUDAKOV and T.I. TIKCHONENKO, 1982. - The site-specific deletion in plasmid pBR322.  
*Gene* 18 : 21-28.
- GRASSE P.P., 1978. - L'évolution du vivant.  
Ed. Albin M., Paris, 477 p.
- GRASSE P.P., 1980. - L'Homme en accusation. De la biologie à la politique.  
Ed. Albin M., Paris, 354 p.
- GROSVELD F.G., T. LUND, E.J. MURRAY, A.L. MELLOR, H.H.M. DAHL and R.A. FLAVELL, 1982. - The construction of cosmid libraries which can be used to transform eucaryotic cells.  
*Nucl. Acid Res.* 10 : 6715-6728.
- GUINEY D.G. and D.R. HELINSKI, 1979. - The DNA-protein relaxation complex of the plasmid RK2 : location of the site-specific nick in the region of the proposed origin of transfer.  
*Mol. Gen. Genet.* 176 : 183-189.
- HADLEY R.G. and A.A. SZALAY, 1982. - DNA sequences homologous to the T-DNA region of *Agrobacterium tumefaciens* are present in diverse *Rhizobium* species.  
*Mol. Gen. Genet.* 188 (3) : 361-369.
- HAHN M. and H. HENNECKE, 1983. - Site-directed Tn5 mutagenesis in *Rhizobium japonicum*.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.

- HANAHAHAN D., 1983. - Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.  
*J. Mol. Biol.* 166 : 557-580.
- HANSEN J.B. and R.H. OLSEN, 1978. - Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5.  
*J. Bacteriol.* 135 : 227-238.
- HANUS F.J., S.L. ALBRECHT, R.M. ZABLOTOWICZ, D.W. EMERICH, S.A. RUSSELL and H.J. EVANS, 1981. - Yield and N content of soybean seed as influenced by *Rhizobium japonicum* inoculants possessing the hydrogenase characteristic.  
*Agronom. J.* 73 : 368-372.
- HARDY R.W.F. and U.D. HAYELKA, 1975. - Nitrogen fixation research : a key to world food ?  
*Science* 188 : 633.
- HATTMAN S., J.E. BROOKS and M. MASUREKAR, 1978. - Sequence specificity of the P1 modification methylase (M.Eco P1) and the DNA methylase (M.Eco dam) controlled by the *Escherichia coli* dam gene.  
*J. Mol. Biol.* 126 : 367.
- HELLING R.B., H.M. GOODMAN and H.W. BOYER, 1974. - Analysis of R. EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis.  
*J. Virol.* 14 : 1235.
- HENNECKE H., 1981. - Recombinant plasmids carrying nitrogen fixation genes from *Rhizobium japonicum*.  
*Nature* 291 : 354-355.
- HIGASHI S., 1967. - Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor.  
*J. Gen Appl. Microbiol.* 13 : 391-403.
- HIRSCH P.R., M. VAN MONTAGU, A.W.B. JOHNSTON, N.J. BREWIN and J. SCHELL, 1980. - Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*.  
*J. Gen. Microbiol.* 120 : 403-412.

- HOHN B. and J. COLLINS, 1980. - A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments.  
*Gene* 11 : 291-298.
- HOLL F.B. and T.A. LA RUE, 1976. - Genetics of legume plant hosts.  
*Proc. of the First Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, Ed. Newton W.E. et C.J. Nyman, Washington, State University Press, p. 391-399.
- HONTELEZ J.G.J., P. MOL, C. VAN DUN, T.M.P. SCHETGENS, A. VAN KAMMEN and R.C. VAN DEN BOS, 1983. - Identification and characterization of *Rhizobium leguminosarum* PRE symbiotic genes by DNA-RNA hybridization.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- HOOYKAAS P.J.J., H. DEN DULK-RAS and R.A. SCHILPEROORT, 1980. - Molecular mechanism of Ti plasmid mobilization by R-plasmids : isolation of Ti plasmids with transposon insertion in *Agrobacterium tumefaciens*.  
*Plasmid* 4 : 65-74.
- HOOYKAAS P.J.J., A.A.N. VAN BRUSSEL, H. DEN DULK-RAS, G.M.S. VAN SLOGTEREN and R.A. SCHILPEROORT, 1981. - Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*.  
*Nature* 291 : 351-353.
- HOOYKAAS P.J.J., F.G.M. SNIJDEWINT and R.A. SCHILPEROORT, 1982. - Identification of the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* strain 1001 and its transfer to and expression in other rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens*.  
*Plasmid* 8 : 73-82.
- JACOB F., 1978. - La logique du vivant.  
Ed. Gallimard, Paris, 352 p.
- JACOB F., 1981. - Le jeu des possibles. Essai sur la diversité du vivant.  
Ed. Fayard, Paris, 135 p.

- JACOBSEN E., 1983. - A new pea mutant efficiently nodulating in the presence of nitrate.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- JOHNSTON A.W.B., M.J. BIBB and J.E. BERINGER, 1978a. - Tryptophan genes in *Rhizobium*. Their organization and their transfer to other bacterial genera.  
*Mol. Gen. Genet.* 165 : 323-330.
- JOHNSTON A.W.B., S.M. SETCHELL and J.E. BERINGER, 1978b. - Interspecific crosses between *Rhizobium leguminosarum* and *R. meliloti* : formation of haploids recombinants and of R-primes.  
*J. Gen. Microbiol.* 104 : 209-218.
- JOHNSTON A.W.B., J.L. BEYNON, A.V. BUCHANAN-WOLLASTON, S.M. SETCHELL, P.R. HIRSCH and J.E. BERINGER, 1978c. - High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*.  
*Nature* 276 : 634-636.
- JOHNSTON A.W.B., J.E. BERINGER, J.L. BEYNON, N. BREWIN, A.V. BUCHANAN-WOLLASTON and P.R. HIRSCH, 1979. - Plasmids and the *Rhizobium*-legume symbiosis.  
In : Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Ed. K.N. Timmis et A. Pühler, Elsevier North Holland Biochemical Press, p. 317-325.
- JULLIOT J.S. and P. BOISTARD, 1979. - Use of RP4-prime plasmids constructed *in vitro* to promote a polarized transfer of the chromosome in *Escherichia coli* and *Rhizobium meliloti*.  
*Mol. Gen. Genet.* 173 : 289-298.
- JUND R. and G. LOISON, 1982. - Activation of transcription of a yeast gene in *E. coli* by an IS5 element.  
*Nature* 296 : 680-682.
- KALUZA K. and H. HENNECKE, 1983. - DNA sequence analysis of nif genes from *Rhizobium japonicum*.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.

- KILBANE J.J. and M.H. MALAMY, 1980. - F factor mobilization of non-conjugative chimeric plasmids in *Escherichia coli* : general mechanism and a role for site-specific *recA* independent recombination at *oriV1*.  
*J. Mol. Biol.* 143 : 73-93.
- KISS G.B., K. DOBO, I. DUSHA, A. BREZNOVITS, L. OROSZ, E. VINCZE and A. KONDOROSI, 1980. - Isolation and characterization of an R-prime plasmid in *Rhizobium meliloti*.  
*J. Bacteriol.* 141 : 121-128.
- KISS G.B. and Z. KALMAN, 1982. - Transformation of *Rhizobium meliloti* 41 with plasmid DNA.  
*J. Bacteriol.* 150 (2) : 465-470.
- KNAUF V.C. and E.W. NESTER, 1982. - Wide host range cloning vectors : a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* plasmid.  
*Plasmid* 8 : 45-54.
- KONDOROSI A., G.B. KISS, T. FORRAI, E. VINCZE and Z. BANFALVI, 1977. - Circular linkage map of the *Rhizobium meliloti* chromosome.  
*Nature* 268 : 525-527.
- KONDOROSI A., E. KONDOROSI, C.E. PANKHURST, W.J. BROUGHTON and Z. BANFALVI, 1982. - Mobilization of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and *Agrobacterium*.  
*Mol. Gen. Genet.* 188 : 433-439.
- KOWALCZUK E., A. SKORUPSKA and Z. LORKIEWICZ, 1981. - Transfer of nodulation ability in *Rhizobium* using R68-45 derived plasmids.  
*Mol. Gen. Genet.* 183 : 388-391.
- KROL A.J.M., J.G.J. HONTELEZ and A. VAN KAMMEN, 1982. - Only one of the large plasmids in *Rhizobium leguminosarum* strain PRE is strongly expressed in the endosymbiotic state.  
*J. Gen. Microbiol.* 128 : 1839-1847.

- LAMB J.W., G. HOMBRECHER and A.W.B. JOHNSTON, 1982. - Plasmid-determined nodulation and nitrogen-fixation abilities in *Rhizobium phaseoli*.  
*Mol. Gen. Genet.* 186 : 449-452.
- LAMB J.W., J.A. DOWNIE and A.W.B. JOHNSTON, 1983. - Analysis of symbiotic genes in *Rhizobium phaseoli*.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- LEGOCKI R.P. and D.P.S. VERMA, 1979. - A nodule-specific plant protein (Nodulin 35) from soybean.  
*Science* 205 : 190-193.
- LIE T.A. and P.C.J.M. TIMMERMANS, 1983. - Host-controlled nitrogen fixation in the *Pisum/Rhizobium* association.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- LIM S.T., K. ANDERSEN, R. TAIT and R.C. VALENTINE, 1980. - Genetic engineering in agriculture : hydrogen uptake (hup) genes.  
*TIBS* 5 : 167-170.
- LONG S.R., W.J. BUIKEMA and F.M. AUSUBEL, 1982. - Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod<sup>-</sup> mutants.  
*Nature* 298 : 485-488.
- LONG S.R., T.W. JACOBS, J. MULLIGAN, T. EGELHOFF and D. BEEBE, 1983. - Symbiotic nodulation genes of *Rhizobium meliloti*.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- LORKIEWICZ Z., M. DERYLO, M. GLOWACKA, D. GOSZNCZYNSKI and A. SKORUPSKA, 1983. - Cloning of *Rhizobium trifolii* nodulation genes.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- MANDEL M. and A. HIGA, 1970. - Calcium dependent bacteriophage DNA infection.  
*J. Mol. Biol.* 53 : 154.
- MANIATIS T., E.F. FRITSCH and J. SAMBROOK, 1982. - Molecular cloning : a laboratory manual.  
Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 545 p.

- MASTERSON R.V., P.R. RUSSELL and A.G. ATHERLY, 1982. - Nitrogen fixation genes and large plasmids of *Rhizobium japonicum*.  
*J. Bacteriol.* 152 (2) : 928-931.
- McCOMBIE W.R., J.B. HANSEN, G.J. ZYLSTRA, B. MAURER and R.H. OLSEN, 1983. - *Pseudomonas* streptomycin resistance transposon associated with R-plasmid mobilization.  
*J. Bacteriol.* 155 (1) : 40-48.
- MEADE H.M., S.R. LONG, G.B. RUVKUN, S.E. BROWN and F.M. AUSUBEL, 1982. - Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis.  
*J. Bacteriol.* 149 (1) : 114-122.
- MEAGHER R.B., R.C. TAIT, M. BETLACH and H.W. BOYER, 1977. - Protein expression in *Escherichia coli* mini-cells by recombinant plasmids.  
*Cell* 10 : 521.
- MEYERS J.A., D. SANCHEZ, L.P. ELWELL and S. FALKOW, 1976. - Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid DNA.  
*J. Bacteriol.* 127 : 1529-1537.
- MORRISON N.A., C.Y. HAU, M.J. TRINICK, J. SHINE and B.G. ROLFE, 1983a. - Heat curing of a Sym plasmid in a fast-growing *Rhizobium* sp. that is able to nodulate legumes and the non-legume *Parasponia* sp.  
*J. Bacteriol.* 153 : 527-531.
- MORRISON N., H.C. CHEN, B. BASSAM, J. PLAZINSKI, R. RIDGE, J. SHINE and B. ROLFE, 1983b. - Tn5 mutagenesis and symbiotic mutants of a fast-growing cowpea *Rhizobium*.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- MORROW J.F., 1979. - Recombinant DNA techniques.  
*In* : Recombinant DNA, Meth. Enzym., Ed. R. Wu, Academic Press, 68 : 3-24.

- MÜLLER P., R. SIMON and A. PÜHLER, 1983. - Tn5-induced symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* 2011.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- NORDHEIM A., T. HASHIMOTO-GOTOH and K.N. TIMMIS, 1980. - Location of two relaxation nick sites in R6K and single sites in pSC101 and RSF1010 close to origins of vegetative replication : implication for conjugal transfer of plasmid deoxyribonucleic acid.  
*J. Bacteriol.* 144 : 923-932.
- NUTI M.P., A.A. LEPIDI, R.K. PRAKASH, R.A. SCHILPEROORT and F.C. CANNON, 1979. - Evidence for nitrogen fixation genes on indigenous *Rhizobium* plasmids.  
*Nature* 282 : 533-535.
- OBUKOWICZ M. and P.D. SHAW, 1983. - Tn3 labeling of a cryptic plasmid found in the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas tabaci* and mobilization of RSF1010 by donation.  
*J. Bacteriol.* 155 : 438-442.
- OLSEN R.H. and J. HANSEN, 1976. - Evolution and utility of a *Pseudomonas aeruginosa* drug resistance factor.  
*J. Bacteriol.* 125 : 837-844.
- OLSEN R.H., 1978. - Evolution of *Pseudomonas* R-plasmids : consequences of Tn1 insertion and resultant partial diploidy to chromosome and Tra<sup>-</sup> R-plasmid mobilization.  
*J. Bacteriol.* 133 : 210-216.
- PANKHURST C.E., W.J. BROUGHTON, C. BACHEM, E. KONDOROSI and A. KONDOROSI, 1983. - Cosmid cloning and physical characterization of the Sym plasmid from a broad host-range *Rhizobium* sp.  
*In* : Molecular genetics of plant-bacteria interaction. Ed. A. Pühler, Springer Verlag, sous presse.
- PETERSON B.C., H. HASHIMOTO and R. ROWND, 1982. - Cointegrate formation between homologous plasmids in *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol.* 151 : 1086-1094.

- PINET X., 1980. - Mise en évidence de plasmides chez *Rhizobium meliloti* par électrophorèse en gel d'agarose.  
Diplôme d'Etudes approfondies, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- POOTJES C.F., 1977. - Evidence for plasmid coding and the ability to utilize hydrogen gas by *Pseudomonas facilis*.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76 : 1002-1006.
- PRAKASH R.K., P.J.J. HOOYKAAS, A.M. LEDEBOER, R.A. SCHILPEROORT, M.P. NUTI, A.A. LEPIDI, F. CASSE, C. BOUCHER, J.S. JULLIOT and J. DENARIE, 1980. - Detection, isolation and characterization of large plasmids in *Rhizobium*.  
In : Nitrogen Fixation. Ed. W.E. Newton and W.H. Orme-Johnson, University Park Press, 2 : 139-163.
- PRAKASH R.K., R.A. SCHILPEROORT and M.P. NUTI, 1981. - The large plasmids of fast growing rhizobia : homology studies and location of structural nitrogen fixation genes.  
*J. Bacteriol.* 145 : 1129-1136.
- PRAKASH R.K. and R.A. SCHILPEROORT, 1982. - Relationship between nif plasmids of fast-growing *Rhizobium* species and Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*.  
*J. Bacteriol.* 149 (3) : 1129-1134.
- PRAKASH R.K., A.A.N. VAN BRUSSEL, A. QUINT, A.M. MENNES and R.A. SCHILPEROORT, 1982. - The map position of Sym-plasmid regions expressed in the bacterial and endosymbiotic form of *Rhizobium leguminosarum*.  
*Plasmid* 7 : 281-286.
- PRAKASH P.K., R.V. MASTERSON and A.G. ATHERLY, 1983. - Mapping and site specific mutagenesis of *Rhizobium japonicum* plasmid.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- PÜHLER A., W. ARNOLD, D. HORN, B. JÄCKEL, U. PRIEFER, R. SIMON and G. WEBER, 1982. - Genetic analysis of *Rhizobium meliloti* plasmids and *R. meliloti* nif genes.  
*Proc. of the 8th North American Rhizobium conference*, University of Manitoba Press, Winnipeg, p.90-114.

- QUINTO C., H. DE LA VEGA, M. FLORES, L. FERNANDEZ, T. BALLADO, G. SOBERON and R. PALACIOS, 1982. - Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*.  
*Nature* 299 : 724-726.
- QUINTO C., H. DE LA VEGA, M. FLORES, M.A. CEVALLOS, E. MARTINEZ, E. CALVA, M.L. GIRARD, J. LEEMANS and R. PALACIOS, 1983. - Organization of nitrogen fixation gene sequence in *Rhizobium phaseoli*.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- QUISPEL A., 1974. - The biology of nitrogen fixation.  
North Holland, Amsterdam.
- RAO R.N. and S.G. ROGERS, 1979. - Plasmid pKC7 : a vector containing ten restriction endonuclease sites suitable for cloning DNA segments.  
*Gene* 7 : 79-82.
- ROBERTS G.P. and W.J. BRILL, 1981. - Genetics and regulation of nitrogen fixation.  
*Ann. Rev. Microbiol.* 35 : 207-235.
- ROLFE B.G., M. DJORDJEVIC, K.F. SCOTT, J.E. HUGHES, J. BADENOCH-JONES, P.M. GRESSHOFF, Y. CEN, W.F. DUDMAN, W. ZURKOWSKI and J. SHINE, 1981. - Analysis of the nodule forming ability of fast-growing *Rhizobium* strains.  
*In* : Current perspectives in nitrogen fixation. Ed. A.H. Gibson et W.E. Newton, Elsevier/North Holland Biomedical Press, p. 142-145.
- ROLFE B.G., M.A. DJORDJEVIC, N.A. MORRISON, J. PLAZINSKI, G.L. BENDER, P.M. GRESSHOFF, M.J. TRINICK and J. SHINE, 1983a. - Genetic analysis of the symbiotic regions in *Rhizobium trifolii* and *R. parasponia*.  
*In* : Molecular genetics of plant-bacteria interactions. Ed. A. Pühler, Springer Verlag, sous presse.

- ROLFE B.G., R.W. RIDGE, N.A. MORRISON, P.B. SCHOFIELD, B.J. BASSAM, J.M. WATSON, J. SHINE and M.A. DJORDJEVIC, 1983b. - Conservation of root hair curling functions in fast-growing Rhizobia. *Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- ROSENBERG C., P. BOISTARD, J. DENARIE and F. CASSE-DELBART, 1981. - Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 184 : 326-333.
- ROSENBERG C., F. CASSE-DELBART, I. DUSHA, M. DAVID and C. BOUCHER, 1982. - Megaplasms in the plant-associated bacteria *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.* 150 (1) : 402-406.
- RUVKUN G.B. and F.M. AUSUBEL, 1980. - Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 191-195.
- RUVKUN G.B., S.R. LONG, H.M. MEADE and F.M. AUSUBEL, 1980. - Molecular genetics of symbiotic nitrogen fixation. *Cold Spring Harbor Symp.* 45 (2) : 492-499.
- RUVKUN G.B. and F.M. AUSUBEL, 1981. - A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature* 289 : 85-88.
- SÁNCHEZ F., A. AYALA, R. BASURTO, R. PALACIOS, H. DE LA VEGA and C. QUINTO, 1983. - Expression of symbiotic specific genes in the *Rhizobium phaseoli* - *Phaseolus vulgaris* association. *Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- SANCHEZ A., L. FERNANDEZ and K.D. NOEL, 1983. - Symbiosis-specific genetic loci of *Rhizobium phaseoli*. *Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- SCHETGENS T.M.P., G. BAKKEREN, C. VAN DUN, J.G.J. HONTELEZ, A. VAN KAMMEN, and R.C. VAN DEN BOS, 1983. - Identification and analysis of the expression of *Rhizobium leguminosarum* PRE symbiotic genes. *Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.

- SCHILPEROORT R.A., P.J.J. HOOYKAAS, P.M. KLAPWIJK, B.P. KOEKMAN, M.P. NUTI, G. OOMS and R.K. PRAKASH, 1979. - Characters on large plasmids in Rhizobiaceae involved in the interaction with plant cells.  
*In* : Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Ed. K.N. Timmis and A. Pühler, Elsevier North Holland biochemical Press, p. 339-352.
- SCHOFIELD P.R., R.W. RIDGE, M.A. DJORDJEVIC, B.G. ROLFE, J. SHINE and J.M. WATSON, 1983. - Cloning and characterization of the host specificity and nodulation genes of *Rhizobium trifolii*.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- SCHUPP T., C. TOUPET, M. STALHAMMAR-CARLEMALM and J. MEYER, 1983. - Expression of a neomycin phosphotransferase gene from *Streptomyces fradiae* in *Escherichia coli* after interplasmidic recombination.  
*Mol. Gen. Genet.* 189 : 27-33.
- SCHWINGHAMER E.A., 1980. - A method for improved lysis of some gram-negative bacteria.  
*FEMS Lett.* 7 : 157-162.
- SCOTT D.B. and C.W. RONSON, 1982. - Identification and mobilization by cointegrate formation of a nodulation plasmid in *Rhizobium trifolii*.  
*J. Bacteriol.* 151 (1) : 36-43.
- SCOTT D.B., C.B. COURT and C.W. RONSON, 1983. - Physical mapping of the nif and nod regions of a *Rhizobium trifolii* Sym : R68-45 cointegrate plasmid.  
*Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- SHINE J., K.F. SCOTT, F. FELLOWS, M. DJORDJEVIC, P. SCHOFIELD, J.M. WATSON and B.G. ROLFE, 1983. - Molecular anatomy of the symbiotic region in *Rhizobium trifolii* and *R. parasponia*.  
*In* : Molecular genetics of plant-bacteria interactions. Ed. A. Pühler, Springer Verlag, sous presse.

- SIMON R., M. LABES and U. PRIEFER, 1983. - Vector plasmids for *in vivo* and *in vitro* manipulations of gram-negative bacteria.  
*In* : Molecular genetics of plant-bacteria interactions. Ed. A. Pühler, Springer Verlag, sous presse.
- SINSHEIMER R.L., 1977. - Recombinant DNA.  
*Ann. Rev. Biochem.* 46 : 415-438.
- STEWART W.D.P., 1976. - Nitrogen fixation.  
*Phil. Trans. R. Soc.* 274 : 341-376.
- STÜBER D. and H. BUJARD, 1981. - Organization of transcriptional signals in plasmids pBR322 and pACYC184.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 161-171.
- SUTCLIFFE J.G., 1979. - Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322.  
*Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.* 43 : 77-90.
- SZETO W., J.L. ZIMMERMAN and F.M. AUSUBEL, 1983. - Characterization of ineffective nodules induced in alfafa by *Rhizobium meliloti* deficient in symbiotic nitrogen fixation.  
*In* : Molecular genetics of plant-bacteria interaction. Ed. A. Pühler, Springer Verlag, sous presse.
- TAIT R.C. and H.W. BOYER, 1978. - On the nature of tetracycline resistance controlled by the plasmid pSC101.  
*Cell* 13 : 73.
- TAIT R.C., T.J. CLOSE, R.C. LUNQUIST, M. HAGIYA, R.L. RODRIGUEZ and C.I. KADO, 1983. - Construction and characterization of a versatile broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria.  
*Biotechnology* 1 (3) : 269-275.
- TOMILIN N.V. and J. HOFEMEISTER, 1982. - Site-specific *recA* - independent recombination (fusion) of pMB8 - related replicons in *Escherichia coli* in the region of the replication origins.  
*Gene* 17 : 65-73.

- TRUCHET G., C. ROSENBERG, J. VASSE, J.S. JULLIOT, S. CAMUT and J. DENARIE, 1983. - The Sym plasmid of *Rhizobium meliloti*. Expression of pSym functions in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- VAN BRUSSEL A.A.N., T. TAK, A. WETSELAAR, E. PEES and C.A. WIJFFELMAN, 1982. - Small leguminosae as test plants for nodulation of *Rhizobium leguminosarum* and other Rhizobia and Agrobacteria harbouring a *R. leguminosarum* Sym plasmid. *Plant Sci. Lett.* 27 (3) : 317-325.
- VAN HAUTE E., H. JOOS, M. MAES, G. WARREN, M. VAN MONTAGU and J. SCHELL, 1983. - Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322 : a novel strategy for the reversed genetics of the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 2 (3) : 411-417.
- VAN LAREBEKE N., C. GENETELLO, J. SCHELL, R.A. SCHILPEROORT, A.K. HERMANS, J.P. HERNALSTEENS and M. VAN MONTAGU, 1975. - Acquisition of tumor inducing ability by non-oncogenic *Agrobacteria* as a result of plasmid transfer. *Nature* 255 : 742-743.
- VAN VLIETF., B. SILVA, M. VAN MONTAGU and J. SCHELL, 1978. - Transfer of RP4::Mu plasmids to *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 1 : 446-455.
- VILLA-KOMAROFF L., A. EFSTRATIADIS, S. BROOME, P. LOMEDICO, R. TIZARD, S.P. NAKER, W.L. CHICK and W. GILBERT, 1978. - A bacterial clone synthesizing proinsulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 : 3727-3731.
- VINCZE E., C. KONCZ and A. KONDOROSI, 1982. - Construction *in vitro* of R-prime plasmids and their use for transfer of chromosomal genes and plasmids of *Rhizobium meliloti*. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 32 : 195-204.
- VINCZE E., A. LAMBERTI, A. RICCIO and M. IACCARINO, 1983. - A gene bank of *Rhizobium leguminosarum* : preliminary analysis of genes useful for the study of symbiosis. *Proc. of the 5th Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.

- WAIN-HOBSON S., C. BISHOP et A. DEJEAN, 1983. - Constitution de banques d'ADN génomique à l'aide de phages ou de cosmides. Cours pratique de Génie génétique (Institut Pasteur/INSERM), Ed. INSERM, sous presse.
- WALZ A., B. RATZKIN and J. CARBON, 1978. - Control of expression of a cloned yeast gene by a bacterial insertion element (IS2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (12) : 6172-6176.
- WARREN G.J., A. TWIGG and D.J. SHERRATT, 1978. - ColE1 plasmid mobility and relaxation complex. *Nature* 274 : 259-261.
- WARREN G.J. and A.J. CLARK, 1980. - Sequence-specific recombination of plasmid ColE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 6724-6728.
- WATSON B., T.C. CURRIER, M.P. GORDON, M.D. CHILTON and E.W. NESTER, 1975. - Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 123 : 255-264.
- WEINMAN J., F. FELLOWS, P. GRESSHOFF, J. SHINE and K. SCOTT, 1983. - Organization and primary structure of nitrogenase genes in the *Parasponia-Rhizobium* strain ANU289. *Proc. of the 5th. Intern. Symp. on Nitrogen Fixation*, sous presse.
- WHITE F.F., G. CHIDOSI, M.P. GORDON and E.W. NESTER, 1982. - Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 3193-3197.
- WILLETTS N. and C. CROWTHER, 1981. - Mobilization of the non-conjugative IncQ plasmid RSF1010. *Genet. Res.* 37 : 311-316.
- WILLETTS N.S., C. CROWTHER and B.W. HOLLOWAY, 1981. - The insertion sequence IS21 of R68-45 and the molecular basis for mobilization of the bacterial chromosome. *Plasmid* 6 : 30-52.

Mots-clés : *Rhizobium meliloti*, génie génétique, vecteur de clonage, mobilisation, Rhizobiacées.

*Rhizobium*, bactérie du sol fixatrice d'azote atmosphérique, établit des relations symbiotiques avec des plantes supérieures d'intérêt agronomique, les légumineuses.

Afin de concilier et de répondre au mieux aux exigences que nous imposent les particularités de *Rhizobium* et nos objectifs de recherche fondamentaux et appliqués, nous avons développé au cours de notre travail, un système de clonage à partir d'un petit plasmide de *Rhizobium meliloti*. Grâce aux techniques du génie génétique, ce plasmide a été transformé en vecteur de clonage :

- porteur de marqueurs génétiques utilisables chez *Escherichia coli*, *Rhizobium* et *Agrobacterium*,
- possédant des sites uniques de restriction.
- capable de se répliquer, amplifiable chez *E. coli*,
- mobilisable d'*E. coli* aux *Rhizobium* à croissance rapide (*R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*) et vers *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*),
- stable sans pression sélective chez ces Rhizobiacées.

Ce système et ce vecteur de clonage (préparation de l'ADN vecteur amplifié à partir d'*E. coli*, insertion de gènes *in vitro*, transformation bactérienne chez *E. coli*, mobilisation vers *Rhizobium* ou *Agrobacterium*, passage sur plante) enrichissent la panoplie du biologiste moléculaire mais devraient également participer à l'amélioration des symbioses existantes en introduisant et surtout en assurant le maintien de gènes "améliorants" chez les différentes espèces de *Rhizobium*.