

50376
1984
151

50376
4984
451

N° d'ordre : 636

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

THÈSE

présentée à l'Université de Lille 1

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Hussian KHANAKA

**ETUDE DE LA PROTEINE CHROMOSOMALE DE TYPE
HU CHEZ DIFFERENTES ESPECES DE RHIZOBIACEAE**
CARACTERISATION, ETUDES STRUCTURALES,
INTERACTION AVEC LE DNA



Présentée le 30 Octobre 1984 devant la Commission d'Examen

Président	Professeur	J.	GUILLAUME
Rapporteurs	Professeur	J.	DE LEY
	Professeur	J.C.	DERIEUX
	Docteur	P.	SAUTIERE
Examineurs	Professeur	J.	KREMBEL
	Docteur	B.	LAINÉ

A mon frère Sandar,
A toute ma famille,

Je tiens à exprimer ici toute ma gratitude à mes juges,

Monsieur le Professeur Jean GUILLAUME, dès mon entrée dans votre laboratoire, j'ai toujours trouvé auprès de vous compréhension, gentillesse et disponibilité constante. C'est vous qui avez guidé mes premiers pas dans la recherche avec compétence et bienveillance. Je vous prie d'accepter l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur J. DE LEY, connaissant votre notoriété dans le domaine de la taxonomie bactérienne, je suis très honoré que vous ayez accepté de juger ce travail. Je vous en remercie vivement et vous prie de croire en ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur J.-C. DERIEUX, vous m'avez fait le grand honneur d'accepter de juger ce travail et d'être le rapporteur de cette thèse. Je vous exprime toute ma gratitude et mon profond respect.

Monsieur le Docteur Pierre SAUTIERE, vous m'avez fait le grand honneur de m'avoir accepté dans votre laboratoire. Vos conseils éclairés et vos encouragements permanents m'ont permis de mener à bien ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur J. KREMBEL, je vous remercie très vivement d'avoir accepté de faire partie de mon jury et vous prie de trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Monsieur le Docteur Bernard LAINE, vous m'avez fait partager vos connaissances depuis les premiers jours de mon arrivée au laboratoire. Vous avez dirigé ce travail et jour après jour vous en avez suivi la progression. Pendant ce temps, j'ai bénéficié de vos nombreux conseils et la plupart des résultats obtenus n'auraient pu l'être sans votre aide. Je tiens à vous renouveler mes sincères remerciements.

Je remercie le Docteur Jean-Pierre AUBERT avec qui ont été réalisées les études de biophysique.

Mes sentiments les plus amicaux s'adressent à toute l'équipe des HISTONES pour l'ambiance chaleureuse dans laquelle nous avons travaillé. Je remercie aussi Marie-Paule HILDEBRAND et André DECK pour l'aide efficace qu'ils m'ont apportée ainsi que Madame M.-T. GARET qui a assuré la réalisation photographique.

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, COR-
DONNIER, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN,
GLACET, GONTIER, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG,
LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU,
ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CAYATTE Jean-Louis	Sciences économiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean-Jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences économiques
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean-Paul	Spectrométrie des solides
M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GREGORY Pierre	I.P.A.
M. GREMY Jean-Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNAL Gérard	Spectroscopie hertzienne

M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MONTEL Marc	Physique du solide
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean-Claude	E.U.D.I.L.
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
Mme ZINN Justin Nicole	Algèbre

Ce travail a été commencé dans le cadre de l'Unité 124 INSERM (Directeur : Professeur Gérard BISERTE). Il résulte d'une collaboration entre l'Unité Associée 409 CNRS¹ (Directeur : Docteur Pierre SAUTIERE, Maître de Recherches au CNRS) et le Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille² (Directeur : Professeur Jean GUILLAUME).

Il a été réalisé sous la direction scientifique du Docteur Bernard LAINE (Chargé de Recherches INSERM) en association avec le Professeur J.GUILLAUME et le Docteur P.SAUTIERE.

¹ Unité Associée au CNRS n°409, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex , France.

² Laboratoire de Microbiologie, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

Nos recherches ont bénéficié d'un contrat "Aide à la Recherche Universitaire", 1982 (Université des Sciences et Techniques de Lille) et d'un contrat de recherche de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (CRL 80.20.35).

Elles ont fait l'objet des publications suivantes :

- 1 - LAINE, B., BELAÏCHE, D., KHANAKA, H. and SAUTIERE, P. (1983)
Primary structure of the DNA-binding protein HRm from *Rhizobium meliloti*.
Eur.J.Biochem. 131, 325-331.
- 2 - KHANAKA, H., LAINE, B., SAUTIERE, P. and GUILLAUME, J. (1984)
Comparative study of the DNA-binding HU-type proteins from slow growing and fast growing strains of *Rhizobiaceae*.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 121, 471-477.
- 3 - KHANAKA, H., LAINE, B., SAUTIERE, P. and GUILLAUME, J. (1984)
Biochemical characteristics of the DNA-binding HU-type proteins from *Rhizobiaceae*.
Eur.J.Biochem. (soumise pour publication)
- 4 - CATTEAU, M., LEGRAND, M.D., KHANAKA, H. and GUILLAUME, J. (1984)
Etude taxonomique de souches appartenant aux genres *Rhizobium* et *Agrobacterium*.
Syst.Appl.Microbiol. (soumise pour publication)

Ce travail a également fait l'objet des communications suivantes par poster :

- 1 - KHANAKA, H., LAINE, B., BELAÏCHE, D., SAUTIERE, P. and GUILLAUME, J.
Characterization and structural study of HU protein from *Rhizobium meliloti*.
8th North American *Rhizobium* Conference, Manitoba, Canada, 1981.
- 2 - LAINE, B., BELAÏCHE, D., KHANAKA, H. and SAUTIERE, P.
Structural variations of the DNA-binding HU-type protein in procaryotes.
Meeting 15th FEBS, Bruxelles 1983

- 3 - LAINE, B., BELAÏCHE, D., KHANAKA, H. et SAUTIERE, P.
Comparaison des structures primaires des protéines de type HU se liant au DNA chez les procaryotes. Signification fonctionnelle des séquences invariables.
Colloque CNRS, Structure et expression des génomes procaryotes et eucaryotes. Marseille-luminy, 14-16 septembre 1983.
- 4 - KHANAKA, H., LAINE, B., CATTEAU, M., SAUTIERE, P. and GUILLAUME, J.
Comparative study of the DNA-binding HU-type proteins isolated from different groupes of *Rhizobiaceae*.
5th International Symposium on Nitrogen Fixation, Noordwijkerhout, The Netherlands, 28 août-3 septembre 1983
- 5 - CATTEAU, M., KHANAKA, H., LEGRAND, M.D. and GUILLAUME, J.
Contribution to the study of *Rhizobium* and *Agrobacterium* genus.
5th International Symposium on Nitrogen Fixation, Noordwijkerhout, The Netherlands, 28 août-3 septembre 1983.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
<u>AVANT-PROPOS</u>	1
1 <u>IMPORTANCE ECONOMIQUE DE LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE MOLECULAIRE</u>	2
2 <u>AMELIORATION DU RENDEMENT AGRONOMIQUE</u>	3
CHAPITRE I : <u>GÉNÉRALITÉS</u>	6
I - 1 <u>LA SYMBIOSE <i>Rhizobium</i>-LEGUMINEUSE</u>	8
I - 1-1 Mécanisme symbiotique	8
I - 1-2 Etude taxonomique générale de la famille de <i>Rhizobiaceae</i> .	12
I - 1-2-1 Etudes taxonomiques du genre <i>Rhizobium</i>	12
I - 1-2-2 Etudes taxonomiques du genre <i>Agrobacterium</i>	18
I - 1-2-3 Etudes taxonomiques au laboratoire	21
I - 1-2-4 Méthodes d'étude de la phylogénie	24
I - 2 <u>CONDENSATION DU DNA</u>	26
I - 2-1 Condensation du DNA chez les Eucaryotes	26
I - 2-2 Condensation du DNA dans la cellule pro-caryotique	27
I - 2-2-1 Préparation du nucléoïde	28
I - 2-2-2 Composition du nucléoïde	31
I - 2-2-3 Organisation du DNA dans le nucléoïde isolé en milieu NaCl 1M	33
I - 2-2-4 Organisation du DNA en milieu de force ionique faible	37
I - 2-2-4-1 Etudes effectuées sur le nucléoïde isolé	37
I - 2-2-4-2 Observation directe sur la cellule	38
I - 2-2-4-3 Recherche de protéines susceptibles de condenser le DNA dans la bactérie	39
I - 2-2-5 Interaction de la protéine HU avec les acides nucléiques	43
I - 2-2-5-1 Interaction avec le DNA monocaténaire	43
I - 2-2-5-2 Interaction avec le DNA bicaténaire	44
I - 2-2-5-3 Effet de la protéine HU sur la stabilité thermique du DNA	48
I - 2-2-5-4 Effet de la protéine HU sur la synthèse et la transcription du DNA	49

I - 3	<u>OBJECTIF DE NOS RECHERCHES ET CHOIX DES SOUCHES</u>	50
I - 3-1	Objectif de nos recherches	50
I - 3-2	Choix des souches	52
CHAPITRE II :	<u>ETUDE COMPARATIVE DES PROTÉINES DE TYPE HU ISO-</u>	55
	<u>LÉES DE DIFFÉRENTES ESPÈCES DE RHIZOBIACEAE</u>	
II - 1	<u>NOMENCLATURE DES PROTEINES</u>	57
II - 2	<u>ISOLEMENT DES PROTEINES DE TYPE HU</u>	58
II - 2-1	Préparation des protéines de type HU	58
II - 2-1-1	Principe de la méthode	58
II - 2-1-2	Résultats	59
II - 2-1-2-1	Préparation de la protéine HRm de <i>R. meliloti</i>	59
II - 2-1-2-2	Préparation de la protéine HAT d' <i>A. tumefaciens</i>	59
II - 2-1-2-3	Préparation de la protéine HR118 de <i>R. leguminosarum</i> L18	62
II - 2-1-2-4	Préparation de la protéine HR153 de <i>R. leguminosarum</i> L53	64
II - 2-1-2-5	Préparation de la protéine HRj de <i>R. japonicum</i>	66
II - 2-2	Purification des protéines de type HU	66
II - 2-3	Séparation des protéines HRj-1 et HRj-2 de <i>R. japonicum</i>	69
II - 3	<u>PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTEINES DE TYPE HU</u>	71
II - 3-1	Comportement électrophorétique sur gel de polyacrylamide	71
II - 3-2	Propriétés immunologiques	76
II - 3-3	Composition en acides aminés	78
II - 3-4	Discussion	82
	<u>PUBLICATION N°1</u>	84

CHAPITRE III :	<u>ETUDES STRUCTURALES DES PROTÉINES DE TYPE HU</u>	91
III - 1	<u>ETUDE DE LA PROTEINE HR_m</u>	94
III - 2	<u>ETUDE COMPAREE DES PROTEINES DE TYPE HU DE</u> <u>RHIZOBIACEAE</u>	95
III - 3	<u>DISCUSSION</u>	97
III - 3-1	Relation entre la taxonomie numérique et la phylogénie	97
III - 3-2	Relation entre la structure primaire et la fonction biologique des protéines de type HU	101
	PUBLICATION N°2	107
	PUBLICATION N°3	114
CHAPITRE IV :	<u>ETUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES PROTÉINES</u> <u>HR_m ET HU</u>	143
IV - 1	<u>MATERIEL ET METHODES</u>	145
IV - 2	<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	147
IV - 2-1	Etude en fonction de la température	147
IV - 2-2	Etude en fonction de la force ionique	150
IV - 2-3	Conclusion	153
CHAPITRE V :	<u>INTERACTION DU DNA AVEC LES PROTÉINES HR_m ET HU</u>	154
V - 1	<u>ETUDE DE LA SPECIFICITE DES PROTEINES HR_m ET HU VIS-</u> <u>A-VIS DU DNA DE DIFFERENTES ORIGINES</u>	156
V - 1-1	Méthode	157
V - 1-2	Résultats et discussion	157
V - 2	<u>INTERACTION DES PROTEINES HR_m ET HU AVEC LE PLASMIDE</u> <u>pBR322</u>	162
V - 2-1	Objectif	162
V - 2-2	Matériel et méthode	163

V - 2-3	Résultats	164
V - 2-3-1	Etudes préliminaires	164
V - 2-3-1-1	Etude de la cinétique de complexation	166
V - 2-3-1-2	Etude du rapport protéine-DNA	166
V - 2-3-2	Interaction DNA circulaire superhélicoï- dal-protéine	169
V - 2-3-2-1	Etudes en présence de NaCl	169
V - 2-3-2-2	Etudes en présence de MgCl ₂	174
V - 2-3-3	Interaction DNA linéaire-protéine	174
 <u>CONCLUSION</u>		178
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>		179
 <u>PARTIE TECHNIQUE - MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>		191
I -	<u>SOUCHES BACTERIENNES</u>	193
II -	<u>MILIEUX DE CULTURE</u>	193
II - 1	Tampon exempt d'azote RN ⁻	193
II - 2	Milieu complet RC	195
II - 3	Milieu TY (Tryptone-yeast)	195
II - 4	Milieu NT de NICOL et THORNTON	196
II - 5	Milieu riche de LURIA	196
II - 6	Milieu 63B1	197
III -	<u>CULTURE EN MASSE DES BACTERIES</u>	197
III - 1	Biomasse de <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i>	198
III - 2	Biomasse de <i>Escherichia coli</i> souche W3350	198
IV -	<u>TESTS DE NODULATION IN VITRO (INFECTIVITE)</u>	199
IV - 1	Stérilisation des graines (luzerne, petit pois, soja)	199
IV - 2	Germination des graines	199
IV - 3	Inoculation et culture des plantules	200

V -	<u>EFFICIENCE</u>	201
V - 1	Principe de la méthode	201
V - 2	Conditions expérimentales	202
V - 3	Technique de dosage	203
V - 4	Calcul de la quantité d'éthylène produite (ΔQ)	203
V - 5	Détermination du poids sec de la plantule	204
VI -	<u>EXTRACTION ET PURIFICATION DU DNA BACTERIEN</u>	205
VII -	<u>PREPARATION DU PLASMIDE</u>	207
VIII -	<u>ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE</u>	209
IX -	<u>PREPARATION DES PROTEINES DE TYPE HU</u>	210
IX - 1	Préparation de l'extrait bactérien	210
IX - 2	Chromatographie sur colonne de DNA-cellulose	211
IX - 2-1	Préparation de la DNA-cellulose	211
IX - 2-1-1	Préparation de la cellulose	211
IX - 2-1-2	Couplage du DNA à la cellulose	212
IX - 2-1-3	Conditions utilisées pour la chromatographie sur colonne de DNA-cellulose	213
X -	<u>TECHNIQUE D'IMMUNODIFFUSION D'OUCHTERLONY</u>	214
X - 1	Préparation de l'immunsérum	214
X - 2	Préparation des immunoglobulines	214
X - 3	Préparation du gel d'agar et immunodiffusion	215
	<u>BIBLIOGRAPHIE DE LA PARTIE TECHNIQUE</u>	216

ABRÉVIATIONS UTILISÉES

A	:	absorbance
CsCl	:	chlorure de césium
DNA	:	acide desoxyribonucléique
DNP	:	desoxyribonucléoprotéine
EDTA	:	acide éthylènediaminetétraacétique
HMG	:	groupe de protéines non histones de mobilité électrophorétique élevée (high mobility group)
HPLC	:	chromatographie en phase liquide à haute pression
p.s.i.	:	1000 pounds per square inch \approx 70 kg/cm ²
RNA	:	acide ribonucléique
RNase	:	ribonucléase
SDS	:	dodécylsulfate de sodium
Tris	:	hydroxyméthyl-aminométhane

AVANT-PROPOS

1 - IMPORTANCE ECONOMIQUE DE LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE MOLECULAIRE

La fixation de l'azote atmosphérique, grâce à la symbiose *Rhizobium* - légumineuse, présente un grand intérêt agronomique puisqu'elle conduit à la synthèse des acides aminés à partir de substances inorganiques provenant de l'atmosphère ; de plus, elle maintient la fertilité du sol grâce aux exsudats racinaires.

Le cycle de l'azote est un des cycles les plus complexes et les plus parfaits à la fois. Malgré le grand nombre et la diversité des organismes qui interviennent, il assure une circulation rapide de l'azote dans les divers écosystèmes. La seule réserve d'azote disponible dans le monde est l'azote contenu dans l'atmosphère. Cette réserve est estimée à 4×10^{15} tonnes. Le prélèvement annuel en azote représente 120 millions de tonnes comprenant principalement sa fixation par les plantes de la famille des légumineuses et son utilisation par l'homme pour fabriquer des engrais azotés (DE ROSNAY, 1978).

L'importance de la symbiose *Rhizobium* - légumineuse est primordiale pour l'avenir de l'agriculture mondiale : elle est considérée comme responsable de la moitié de l'azote fixé par voie biologique, soit à peu près 8×10^7 tonnes par an, ceci compte tenu de sa répartition géographique. Le reste est effectué par les autres symbioses ainsi que par les microorganismes fixateurs libres pour lesquels la quantité de l'azote fixé est infime par rapport aux associations symbiotiques.

LIPMAN et CONYBEARE (1936) ont calculé pour la surface totale cultivée des U.S.A. que 60 p.100 de l'azote fixé par les plantes provenait des microorganismes : en effet, sur les 16,45 millions de tonnes d'azote atmosphérique transformées en matière biologique, 9,83 millions de tonnes sont dues à l'action des microorganismes dont 5,46 millions de tonnes attribuées aux espèces du genre *Rhizobium*.

L'apport biologique azoté dépasse l'apport dont sont responsables les engrais chimiques et fumures organiques qui n'interviennent respectivement que pour 6,48 et 2,57 millions de tonnes. Cependant, l'accord est encore loin d'être fait sur de tels chiffres et un bon nombre d'auteurs modernes tendent au contraire à minimiser le rôle de la fixation biologique, tout au moins par les bactéries non symbiotiques.

2 - AMELIORATION DU RENDEMENT AGRONOMIQUE

Les chercheurs depuis longtemps se sont consacrés à améliorer ou élargir l'arsenal des techniques agricoles utilisant la potentialité du *Rhizobium* à fixer l'azote atmosphérique.

Une première méthode consiste à améliorer les symbioses en sélectionnant des souches de *Rhizobium* hautement efficaces. Pour augmenter l'efficacité des souches, il faut en accroître l'infectivité ou élargir leur spécificité d'hôte.

L'inoculation des souches sélectionnées de *Rhizobium* est rarement nécessaire en Europe sauf en cas d'essai de l'implantation de légumineuse non indigène, comme par exemple le soja en France, mais dans les pays tropicaux où le lessivage des sols est fréquent et où les pertes d'azote par nitrification sont importantes par suite de l'alternance de périodes de sécheresse et de pluie, elle est utilisée efficacement pour la culture de légumineuses comme l'arachide, le haricot, le "cowpea" et le soja dont le rendement est étroitement dépendant de l'état de nodulation.

Une voie nouvelle qui s'ouvre à l'agronomie consiste à améliorer les souches de *Rhizobium* en intervenant directement sur leur génome. Cette méthode fait appel aux techniques récentes mais prometteuses du génie génétique. La fixation de l'azote est commandée par une série de gènes nif (Nitrogen fixation). On peut concevoir par exemple le transfert de ces gènes nif à des bactéries qui peuvent normalement infecter des non-légumineuses. Autre méthode étudiée : le transfert direct des gènes nif des bactéries fixatrices dans les cellules de plantes non-légumineuses qui seraient ainsi rendues aptes à fixer l'azote.

L'intérêt de la recherche dans ce domaine s'est manifesté sous diverses formes dans le milieu scientifique. Les conséquences pratiques des recherches sur *Rhizobium* sont déjà multiples, et un certain nombre de problèmes dans ce domaine sont en passe d'être résolus.

Un des problèmes majeurs auquel se heurtent les chercheurs travaillant sur les *Rhizobiaceae*, est l'identification des espèces et leur rapport phylogénique. En effet, la classification de la famille de *Rhizobiaceae* est aujourd'hui encore essentiellement basée sur la spécificité d'hôte. Cette classification présente de très nombreux défauts : en particulier, il semble maintenant démontré que la spécificité peut être portée par un plasmide, et il peut arriver que certains clones perdent leur spécificité et de ce fait deviennent non identifiables. Cette méthode de classification n'est donc pas convenable. Elle doit être accompagnée de l'étude des caractères phénotypiques, génétiques ou paragénétiques des souches. Les méthodes classiques utilisées permettent de caractériser quelques groupes de *Rhizobium*. Cependant d'autres groupes ne peuvent être différenciés par ces techniques et nécessitent donc la mise en oeuvre de méthodes nouvelles. L'étude de la structure des protéines de type HU, liées aux chromosomes bactériens, nous semble susceptible d'apporter des renseignements d'ordre phylogéniques intéressants pour ce genre mal connu. D'autre part, la connaissance de la structure de ces protéines doit nous permettre d'aborder l'étude de leur relation avec le DNA bactérien. C'est pourquoi dans l'étude bibliographique qui suit nous avons envisagé successivement la famille des *Rhizobiaceae* et en particulier sa taxonomie, puis les protéines liées au DNA et l'interaction des protéines de type HU avec le DNA.

CHAPITRE I

GENERALITES

PLAN DU CHAPITRE I - GENERALITES

I - 1 LA SYMBIOSE *Rhizobium*-LEGUMINEUSE

I - 1-1 Mécanisme symbiotique

I - 1-2 Etude taxonomique générale de la famille de
Rhizobiaceae.

I - 2 CONDENSATION DU DNA

I - 2-1 Condensation du DNA chez les Eucaryotes

I - 2-2 Condensation du DNA dans la cellule procaryo-
tique.

I - 3 OBJECTIF DE NOS RECHERCHES ET CHOIX DES SOUCHES

I - 3-1 Objectif de nos recherches

I - 3-2 Choix des souches

I - 1 LA SYMBIOSE *Rhizobium*-LEGUMINEUSE

L'association entre les *Rhizobium* et les légumineuses conduit à la formation de nodules sur le système racinaire des plantes à l'intérieur desquels l'azote atmosphérique est transformé en azote organique.

A l'état libre, les bactéries du genre *Rhizobium* ne sont pas des fixateurs d'azote moléculaire, contrairement à celles des genres *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii* ou *Clostridium pasteurianum*. L'association *Rhizobium*-légumineuse nécessite un phénomène d'une extrême complexité dans les mécanismes biochimiques et génétiques entrant en jeu. Les principales propriétés caractéristiques du *Rhizobium* concernent son infectivité qui lui permet d'induire la formation des nodosités, son efficacité qui caractérise l'aptitude à fixer l'azote et sa spécificité d'hôte qui ne permet qu'à certaines souches d'entrer en symbiose avec une légumineuse donnée.

I - 1-1 Mécanisme symbiotique

La première étape est la préinfection de la racine de la légumineuse. Elle se traduit par une multiplication des *Rhizobium* spécifiques dans la rhizosphère, et une déformation des poils absorbants. Il semblerait que les bactéries pénètrent dans les

racines par invagination de la paroi du poil absorbant. Les bactéries, dans un deuxième temps, pénètrent dans le tissu racinaire. Elles subissent plusieurs divisions et cheminent par la voie du "cordon infectieux" vers les cellules végétales tétraploïdes constituant le tissu nodulaire. Ces dernières se multiplient: c'est l'infection et la gènèse du nodule (FAHRAEUS, 1957) (NUTMAN, 1965). Les bactéries sont libérées en dehors du cordon d'infection et elles se différencient en bactéroïdes (JORDAN, 1962). Il est à noter que ces bactéries ne sont pas libres dans le cytoplasme mais sont enveloppées d'une membrane de séquestration d'origine végétale (GOODCHILD et coll., 1966) (KIJNE, 1975). C'est au cours de cette phase que la leghémoglobine se forme et que l'azote moléculaire peut alors être fixé. Un tel mécanisme nécessite une spécificité du *Rhizobium* vis-à-vis de la plante-hôte.

La réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac s'effectuant dans les nodules en anaérobiose est catalysée par le complexe enzymatique nitrogénase. Les gènes responsables de la synthèse de la nitrogénase ne s'expriment que lorsque la bactérie a pénétré dans la plante-hôte. La nitrogénase fonctionne grâce à l'énergie fournie par la plante qui profite en retour des produits de la fixation. Le complexe nitrogénase existe aussi chez de nombreux microorganismes comme les cyanobactéries ou algues bleues abondantes dans les rizières, *Rhodospseudomonas capsulata*, *Azospirillum brasilense* ou *Klebsiella pneumoniae*. Sa synthèse est gouvernée par des gènes appelés gènes nif (Nitrogen fixation). La carte physique de ces gènes nif est aujourd'hui

parfaitement connue chez *Klebsiella pneumoniae* : ils sont au nombre de 17 organisés en 7 unités de transcription. Leur identification commence seulement chez les *Rhizobium*, où leur rôle était plus difficile à analyser directement du fait qu'ils ne s'expriment qu'à l'intérieur des nodules.

D'autre part, des auteurs (MASTERSON et coll., 1982 ; ROSENBERG et coll., 1981) ont montré que les gènes nif chez *Rhizobium* sont localisés sur des plasmides de poids moléculaire de 180 à plus de 300×10^6 daltons.

En effet, la présence de plasmides de poids moléculaires variables chez différentes espèces de *Rhizobium* et *Agrobacterium* ont été mis en évidence (BECHET et coll., 1978 ; NUTI et coll., 1977 ; ZURKOWSKI et coll., 1976 ; CURRIER et coll., 1976). Leur poids moléculaire s'échelonne de 50×10^6 à plus de 300×10^6 .

En outre, des études récentes ont détecté des plasmides géants chez plusieurs espèces de *Rhizobium* (LEDEBOER, 1978 ; ROSENBERG et coll., 1981) ; leur poids moléculaire est supérieur à 300×10^6 . Ils pourraient porter près de 300 gènes compte tenu de leur taille mais jusqu'à présent les plasmides sont considérés comme cryptiques à l'exception du caractère nif et nod localisés sur le mégaplasme (ROSENBERG et coll., 1981) chez certains *Rhizobium*. Les recherches sont facilitées du fait que les gènes nif semblent avoir peu évolué chez les différentes espèces fixatrices d'azote, on peut donc les mettre en évidence par hybridation à partir des gènes nif de *Klebsiella*. (RUVKUN et coll., 1980). En effet, ces auteurs ont démontré que certains gènes codant pour la synthèse de la nitrogénase et des gènes contrôlant

la formation de nodules sont localisés sur les plasmides géants de *R. meliloti* L5-30 et 41 (ROSENBERG et coll., 1981). La perte du pouvoir infectieux de ces souches pourrait être due à une délétion spontanée sur le plasmide géant de la souche L5-30, et à une délétion sur le plasmide de la souche 41 à la suite d'un traitement par la chaleur.

L'hybridation entre chacun de ces deux plasmides et le plasmide pSA 30 portant les gènes nif D et nif H de *Klebsiella pneumoniae* prouve que des gènes nif sont localisés sur les plasmides géants. Cependant par électrophorèse en gel d'agarose on ne trouve pas de différence de taille entre le plasmide géant et celui de la souche sauvage L5-30. Par contre, une différence est constatée dans le cas de la souche 41, à la suite d'une grande délétion. L'hybridation de segments de DNA clonés de *R. japonicum* avec un plasmide portant des gènes nif de *K. pneumoniae* montre une homologie entre les gènes codant pour les deux nitrogénases. Cette homologie concerne les gènes nif H et nif D (HENNECKE, 1981). Une homologie a été prouvée également entre les gènes nif de *K. pneumoniae* portés sur le grand plasmide de *R. leguminosarum* (KROL et coll., 1980 ; NUTI et coll., 1979) et *R. trifolii*.

Enfin le plasmide Ti d'*A. tumefaciens* a été transmis par conjugaison à une souche de *R. trifolii* (HOOYKAAS et coll., 1977 ; PRAKASH et coll., 1980). Cette dernière est capable d'induire des tumeurs sur des plantes supérieures, mais elle est restée efficace sur sa légumineuse-hôte. Ceci suggère que les

plasmides indigènes de la souche réceptrice et de la souche donatrice n'appartiennent pas au même groupe d'incompatibilité.

Alors qu'on a pu penser que les gènes nif étaient partagés entre les deux partenaires de la symbiose, les expériences rapportées ci-dessus montrent qu'il n'en est rien.

I - 1-2 Etude taxonomique générale de la famille de *Rhizobiaceae*

I - 1-2-1 Etudes taxonomiques du genre de *Rhizobium*

Le genre *Rhizobium* appartient à l'ordre des Eubactéries et fait partie de la famille des *Rhizobiaceae*. Dans l'arbre phylogénétique (Figure 1) construit à partir de la structure des RNA ribosomiaux 16 S, FOX et coll. (1980) rattachent le *Rhizobium* à l'un des groupes des bactéries pourpres et en particulier à la lignée des *Rhodopseudomonae*.

Rhizobium est constitué de bactéries aérobies non sporulées, capables d'infecter les racines des légumineuses et de former des nodules au sein desquels s'effectue la fixation symbiotique de l'azote. Cette formation de nodules est la propriété la plus remarquable, permettant de caractériser les bactéries du genre *Rhizobium*.

Il est normal que l'identification de ces bactéries ait été basée sur cette propriété. Cependant il peut arriver que certains clones perdent cette faculté de noduler d'autant plus

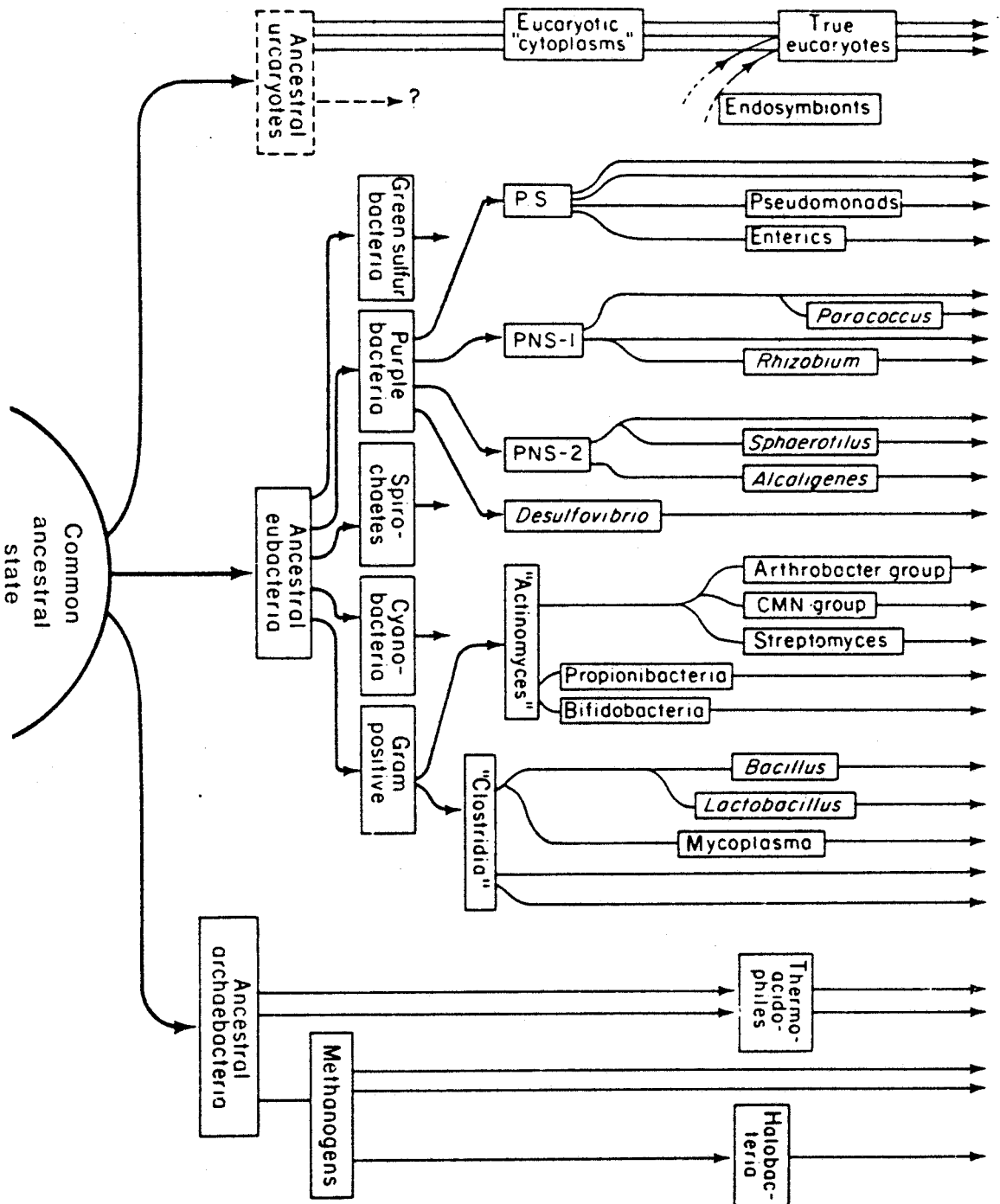


FIGURE 1 ARBRE PHYLOGENETIQUE DES BACTERIES SELON FOX et COLL. (1980)

PS : Pseudomonae ; PNS : Rhodopsseudomonae

que nous avons vu que les gènes impliqués étaient vraisemblablement localisés sur des plasmides ; ces clones de ce fait ne sont plus identifiables. Ce critère d'identification n'est donc pas convenable : il doit être accompagné de l'étude de caractères morphologiques, culturels et biochimiques, chromosomiques autant que faire se peut. (On trouve le même problème pour des bactéries pathogènes pour les animaux dont la virulence n'est pas chromosomique).

La dernière édition du "Bergey's manual" (BUCHANAN et GIBBONS, 1974) décrit six espèces de *Rhizobium*. Chaque espèce est caractérisée par sa capacité d'infecter une plante ou un groupe de plantes-hôtes : il s'agit d'une classification par groupe d'inoculation (Tableau I). En plus de ces six espèces, il existe de nombreuses souches de *Rhizobium* encore mal définies, capables de noduler de nombreuses légumineuses en particulier des espèces tropicales appartenant aux *Mimosaceae*, *Cesalpiniaceae* ou *Papilionaceae*. Ces souches sont parfois regroupées sous le nom de *Rhizobium* du "Cowpea group".

Cette classification du genre *Rhizobium* basée uniquement sur la spécificité d'hôte présente de très nombreux défauts (VINCENT, 1974 ; GRAHAM, 1976) :

- plusieurs plantes-hôtes ne figurent pas dans les groupes d'inoculation définis
- les groupes d'inoculation ne s'excluent pas mutuellement, or l'isolement des souches qui nodulent des plantes appartenant à des groupes différents n'est pas rare (DIXON, 1969).

TABLEAU I

LES DIFFERENTS GROUPEs D'INOCULATION RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE D'APRES VINCENT (1974)

Souches	Légumineuses
<p><i>Rhizobium</i> à croissance rapide</p> <hr/> <p><i>R. leguminosarum</i> <i>R. phaseoli</i> <i>R. trifolii</i> <i>R. meliloti</i></p>	<p><i>Pisum</i> (Pois), <i>Vicia</i> (Vesce), <i>Lens</i> (Lentille) <i>Phaseolus</i> (Haricot) <i>Trifolium</i> (Trèfle) <i>Melilotus</i> (Mélilot), <i>Medicago</i> (Luzerne)</p>
<p><i>Rhizobium</i> à croissance lente</p> <hr/> <p><i>R. japonicum</i> <i>R. lupini</i> <i>Rhizobium</i> du "Cowpea group"</p>	<p><i>Glycine</i> (Soja) <i>Lupinus</i> (Lupin) <i>Arachis</i>, <i>Lotus</i>, <i>Vigna</i></p>

Ce mode de classification n'est donc pas satisfaisant et de nombreux travaux ont été entrepris dans le but de remplacer ces groupes d'inoculation par une classification plus proche de celle utilisée pour les autres groupes bactériens, essentiellement basée sur l'étude de caractères phénotypiques ou génétiques.

Les bactéries de genre *Rhizobium* sont des bâtonnets Gram(-), aérobies strictes, en général mobiles, possédant soit un flagelle polaire ou subpolaire, soit deux à six flagelles péritriches (BUCHANAN et coll., 1974).

Ces bactéries sont traditionnellement divisées en deux groupes distincts : les souches à croissance rapide dont le temps de génération est de 2-4 heures et qui donnent les colonies visibles sur milieu favorable en 2 à 3 jours d'inoculation à 25-30°C, et les souches à croissance lente dont le temps de génération est de l'ordre de 6 à 8 heures et dont les colonies ne sont visibles qu'après 5 jours de culture. Parmi les souches à croissance rapide, *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, présentent des relations étroites.

Les études réalisées en taxonomie numérique (GRAHAM, 1964 ; 'T MANNETJE, 1967; MOFFETT et COLWELL, 1968), hybridation (DE LEY et RASSEL, 1965; DE LEY, 1968; HEBERLEIN et coll., 1967; GIBBINS et GREGORY, 1972; JARVIS et coll., 1977; JARVIS et coll., 1980; CROWN et coll., 1981) et par l'étude électrophorétique des protéines solubles (ROBERTS et coll., 1980) montrent que :

- *R. trifolii* et *R. leguminosarum* ne peuvent être distingués, un seul nom d'espèce doit être retenu: *R. leguminosarum*.

- *R. phaseoli* est proche de *R. leguminosarum* mais son hétérogénéité montre que des études complémentaires doivent lui être consacrées avant de l'inclure dans le groupe *R. leguminosarum*.

- *R. meliloti* est voisin de *R. leguminosarum* mais constitue un groupe distinct, proche des *Agrobacterium*. Il est en effet très difficile de différencier un *R. meliloti* ayant perdu sa faculté de noduler et un *Agrobacterium*. Certains auteurs ont d'ailleurs proposé de rassembler les *Agrobacterium* et les *Rhizobium* à croissance rapide au sein d'un seul genre (GRAHAM, 1964).

Différentes études de la sensibilité aux différentes drogues des *Rhizobium* et des *Agrobacterium* ont été réalisées dans un but taxonomique (KHANAKA, 1980). Une étude récente réalisée sur la sensibilité aux antibiotiques d'un grand nombre de souches de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* a permis de distinguer nettement les souches à croissance rapide, particulièrement *R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. trifolii* et les *Agrobacterium*, de celles à croissance lente *R. lupini* et *R. japonicum* (KHANAKA & coll., 1981). Les souches à croissance rapide capables de noduler certaines espèces de *Lotus* et de *Lencaena* occuperaient une position intermédiaire entre *R. meliloti* et *R. leguminosarum* (JARVIS et coll., 1977).

Enfin les souches à croissance lente de *R. lupini* et *R. japonicum* sont nettement différentes des souches à croissance rapide. Dès 1964, GRAHAM avait proposé de leur créer un nom de genre différent : le genre *phytomyxa*. Récemment, JORDAN (1982) a proposé d'appeler ce genre nouveau *Bradyrhizobium*, ce qui a

l'avantage de conserver pour ces bactéries d'intérêt agronomique considérable une terminologie proche de celle largement utilisée dans la littérature jusqu'alors.

I - 1-2-2 Etudes taxonomiques du genre *Agrobacterium*

Les *Agrobacterium* sont des bâtonnets Gram(-) aérobies mobiles, possédant de un à quatre flagelles péritriches usuellement attachés latéralement (DE LEY et coll., 1966; BUCHANAN et coll., 1974).

La huitième édition du Bergey's manual (BUCHANAN et coll., 1974) distingue au sein du genre *Agrobacterium* quatre espèces : *A. tumefaciens*, *A. rubi* capables d'induire des proliférations de nature tumorale nommées "Crown gall" chez les plantes supérieures, *A. rhizogenes* et *A. radiobacter* sont non pathogènes (Tableau II). Les travaux de DE LEY et coll. (1966) portant sur la composition en bases du DNA, le type de ciliation, la production de 3-cetoglycosides et le caractère de phytopathogénéicité sur la tomate et sur *Datura* permettent de distinguer trois espèces : *Agrobacterium radiobacter*, *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*. *A. rubi* doit être confondu avec *A. tumefaciens*.

L'étude de KEANE (1970) portant sur une série de caractères biochimiques, comportement électrophorétique des protéines solubles, le test sérologique et le caractère de phytopathogénéicité de 50 souches d'*Agrobacterium* met en évidence deux biotypes, le biotype 1 réunit des espèces phytopathogènes et des

TABLEAU II

LES DIFFERENTES ESPECES DE GENRE *AGROBACTERIUM* D'APRES LA HUITIEME EDITION DE BERGEY'S MANUAL

BUCHANAN et GIBBONS (1974)

Espèce	Acide aminé	Utilisation de sel d'ammonium comme source d'azote	Nitrate	3-cetolactase	Formation des tumeurs
<i>A. tumefaciens</i>	+	+	+	+	+
<i>A. radiobacter</i>	+	+	+	+	-
<i>A. rhizogenes</i>	-	-	-	-	-
<i>A. rubi</i>	-	-	-	-	+

espèces non phytopathogènes. Les résultats des caractères biochimiques montrent que la division de genre *Agrobacterium* en espèces tenant compte de leur phytopathogénéicité est donc remise en cause. Cette même observation est réalisée par WHITE (1972) puis par KERESTER et coll. (1973). Ce dernier étudiant les *Agrobacterium* par les techniques de la taxonomie numérique met en évidence deux groupes correspondant sensiblement aux deux biotypes annoncés par KEANE et sans relation avec le caractère de phytopathogénéicité. Cette observation trouvera une explication lors de la découverte du plasmide Ti responsable de l'induction des tumeurs par ZAENEN et coll. (1974). Le plasmide Ti peut être facilement transféré d'une souche à l'autre et l'on comprend dès lors pourquoi ce caractère de phytopathogénéicité n'a que très peu d'intérêt taxonomique.

La classification de la famille des *Rhizobiaceae* est donc en plein remaniement. Il est vrai que la plupart des travaux réalisés jusqu'à présent portent sur le *Rhizobium* entrant en symbiose avec les légumineuses des pays tempérés qui ne représentent qu'une partie de la famille des légumineuses. Cette famille comprendrait environ 14.000 espèces, la plupart d'origine tropicale ou subtropicale. Seule la symbiose de 1.200 espèces environ a été étudiée jusqu'à présent : il est évident dans ces conditions, que la classification des *Rhizobiaceae* ne peut être que temporaire et qu'elle subira encore dans les années à venir, de profondes modifications.

I - 1-2-3 Etudes taxonomiques réalisées au laboratoire

L'étude de la sensibilité à 16 antibiotiques de 81 souches de *Rhizobium* et de 11 souches d'*Agrobacterium* nous a permis de distinguer assez nettement les souches à croissance rapide (en particulier *R.meliloti*, *R.phaseoli*, *R.trifolii* et les *Agrobacterium*) de celles à croissance lente (*R.lupini* et *R.japonicum*). Certains groupes (*R.lupini* et *R.leguminosarum* en particulier) présentent des résistances très diverses en fonction des souches et laissent supposer l'existence d'une grande hétérogénéité au niveau de ces groupes (KHANAKA, 1981). Ces mêmes souches de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* ont été étudiées (CATTEAU et coll., 1984) selon les techniques de taxonomie numérique en utilisant 322 caractères (caractères biochimiques et morphologiques traditionnels, utilisation des substrats carbonés et caractères enzymatiques).

Le traitement informatique a été réalisé sur ordinateur IRIS 80. Un coefficient de corrélation est calculé entre toutes les souches prises deux à deux. On obtient une matrice de coefficients de corrélation. Les souches sont alors regroupées suivant la méthode hiérarchique d'agrégation "Unweighted Pair-Group Mathematical Average Clustering" (UPGMA) (SOKAL et coll., 1958). L'arbre de classification (ou dendrogramme) obtenu (CATTEAU et coll., 1984) est représenté dans la figure 2. Il est constitué par la liste des souches qui se sont agrégées pour des niveaux hiérarchiques de plus en plus hauts : entre 100 (similitude complète) et 0 p.100 (niveau d'agrégation des groupes les plus dissemblables).

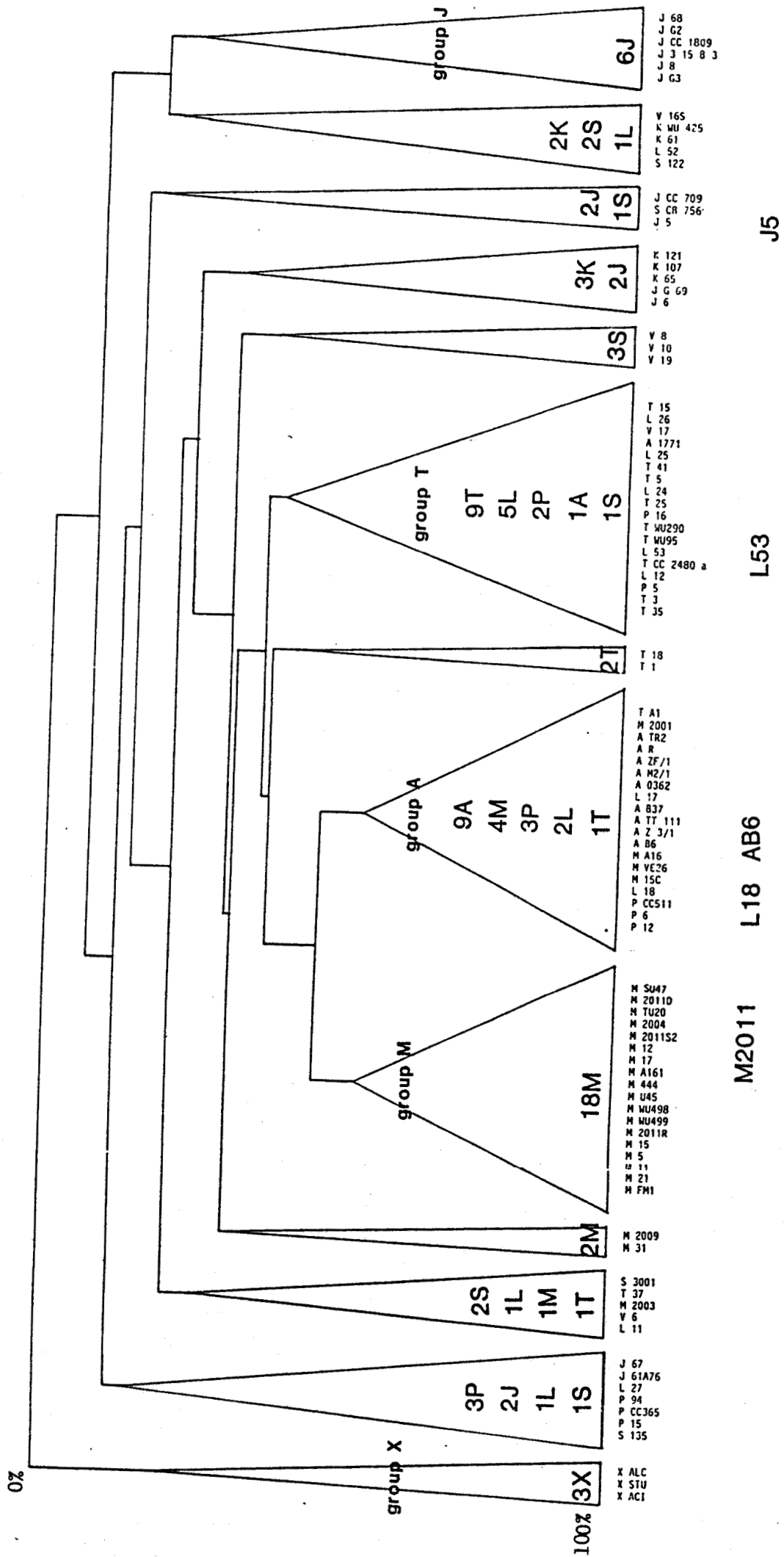


FIGURE 2 DENDROGRAMME REPRESENTANT LA CLASSIFICATION DES SOUCHES DE RHIZOBIUM ET D'AGROBACTERIUM selon CATTEAU et coll., 1984

Le pourcentage de similitude entre les souches est indiqué en ordonnée. Les souches dont on a étudié la protéine de type HU sont indiquées : M2011, *R. meliloti* 2011 Str 3 ; AB6, *A. tumefaciens* AB6 ; L18, *R. leguminosarum* L18 ; L53 , *R. leguminosarum* L53 ; J5, *R. japonicum* J5.

Un dendrogramme n'est pas une présentation figée. Il faut imaginer le dendrogramme dans un espace tridimensionnel, semblable à un "mobile" dont les axes peuvent pivoter de sorte que certains groupes puissent être rapprochés d'autres groupes écartés dans la représentation bidimensionnelle. Les points de raccordement des groupes aux axes verticaux sont d'autant plus élevés que les groupes sont taxonomiquement hétérogènes, par exemple les groupes M et A présentent une plus grande homogénéité que le groupe T.

L'observation de ce dendrogramme montre une assez grande hétérogénéité de l'ensemble de la famille de *Rhizobiaceae*. Les souches à croissance lente *R. japonicum* (souches J), *R. lupini* (souches K) et certains *Rhizobium species* R.sp (souches S) sont hétérogènes et éloignées des autres groupes. *R. meliloti* (groupe M), *Agrobacterium* (groupe A) et *R. trifolii* (groupe T) constituent les groupes les mieux définis. Le groupe M et le groupe A sont taxonomiquement proches, ce qui confirme les observations de GRAHAM (1964) et MOFFETT et coll. (1968).

Les souches de *R. leguminosarum* et *R. phaseoli* étudiées ne constituent pas de groupes homogènes. La majorité des souches de *R. leguminosarum* sont incluses dans le groupe T, d'autres souches sont incluses dans le groupe A et certaines enfin sont encore plus éloignées et disséminées dans le dendrogramme. Dans un même groupe, il est possible de rencontrer des souches appartenant à des groupes d'inoculation différents, par exemple dans le groupe T on trouve 9 souches de *R. trifolii*, 5 souches de

R. leguminosarum, 2 souches de *R. phaseoli*, 1 souche d'*Agrobacterium* et 1 souche de *Rhizobium species* (R.sp). Ceci confirme les observations faites par d'autres auteurs sur l'existence de relations étroites entre ces trois groupes d'inoculation.

I - 1-2-4 Méthodes d'étude de la phylogénie

De façon à retracer la parenté phylogénique des bactéries, un certain nombre d'auteurs (VAN BEEUMEN, 1980; FOX et coll., 1980; DICKERSON, 1980) ont étudié et comparé des macromolécules codées par le génome et qui en sont la traduction directe. Toute modification de ces macromolécules reflète donc une modification du gène correspondant. Chez deux bactéries phylogéniquement éloignées et possédant l'une et l'autre les mêmes voies métaboliques, les protéines enzymatiques, catalysant chaque étape ont des structures différentes bien que fonctionnellement identiques ou très voisines. L'étude de la structure de ces protéines est donc très importante pour retracer la phylogénie des bactéries.

Le moyen le plus précis pour comparer des protéines est d'étudier leur structure primaire. Chez les animaux et les plantes, des études de séquence ont été réalisées pour l'hémoglobine et le cytochrome C et ont permis de tracer les arbres phylogéniques. Chez les bactéries, les données commencent également à être abondantes. Les travaux les plus nombreux dans ce domaine

ont été effectués sur la structure primaire et tertiaire des cytochromes et ont permis d'établir des arbres phylogénétiques de bactéries (VAN BEEUMEN, 1980; TEMPST et coll., 1983) et sur la structure primaire de la fraction 16 S des rRNA (FOX et coll., 1980). Cependant, l'établissement de relations phylogénétiques à partir de ces études est parfois rendu délicat par le fait de l'existence de plusieurs classes de cytochromes qui diffèrent par la longueur de leur chaîne polypeptidique, et surtout leur fonction. En effet, bien que tous les cytochromes aient un rôle dans le transport d'électrons dans les phénomènes d'oxydation cellulaire, ils interviennent à des étapes différentes de ce processus et il est vraisemblable que les contraintes structurales de cytochromes ayant des fonctions différentes ne soient pas identiques (VAN BEEUMEN, 1980). Dans tous les cas une partie de la structure s'est conservée au cours de l'évolution, mais en proportion variable selon les organismes, une "distance mutationnelle" peut donc être calculée qui traduira la divergence taxonomique entre les microorganismes étudiés. Cependant le nombre de molécules étudiées dans un but taxonomique est encore faible et il faudra attendre un certain temps pour que la technologie permette de disposer de données assez nombreuses pour construire une systématique bactérienne sur la base des séquences de macromolécules telles que les protéines et les acides nucléiques.

I - 2 CONDENSATION DU DNA

I - 2-1 Condensation du DNA chez les Eucaryotes

Dans les cellules des organismes supérieurs, le DNA est contenu dans le noyau et se trouve impliqué dans une structure complexe appelée chromatine. La chromatine est constituée de DNA, de protéines et de RNA dont les pourcentages varient selon le type de cellule.

Parmi les protéines, on trouve les histones dont le rapport pondéral histones/DNA est généralement voisin de 1 et les protéines non-histones dont la quantité varie en fonction de l'espèce animale ou végétale et de la nature du tissu.

Les protéines non-histones sont très nombreuses et forment un groupe très hétérogène tandis que les histones forment un groupe homogène constitué dans la plupart des tissus par cinq protéines : les histones H1, H2A, H2B, H3 et H4.

La chromatine est formée d'unités répétitives composées à la fois de DNA et d'histone et appelées nucléosomes (KORNBERG, 1977). Le nucléosome semble constitué d'un fragment de DNA de 200 paires de bases environ et d'un ensemble de 8 molécules d'histones comprenant deux copies de chacune d'elles H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 non nécessaire pour reconstituer un nucléosome pourrait servir de lien entre nucléosomes d'une même chaîne ou de chaînes voisines.

Des protéines non-histones de type HMG (high mobility group) ont été également identifiées dans le nucléosome. Le nucléosome est constitué d'une "core particle" et d'un fragment de DNA appelé "DNA linker" auquel sont associées une molécule d'histone H1 et des protéines non-histones de type HMG. La longueur du "DNA linker" est généralement variable et comprise entre 40 et 60 paires de bases suivant l'origine de la cellule. La "core particle" est un complexe octamérique formé par les histones H2A, H2B, H3 et H4 autour duquel sont enroulées 145 paires de bases de DNA. La "core particle" est une unité constante quels que soient les tissus ou les organismes considérés. En microscopie électronique, l'ensemble des nucléosomes a l'apparence d'un collier de perles (OUDET et coll., 1975); en fait, cet aspect en collier de perles serait un artefact dû aux méthodes de préparation et les nucléosomes seraient impliqués dans une structure encore plus compacte dans laquelle interviendraient l'histone H1 et probablement des protéines non-histones du groupe HMG.

I - 2-2 Condensation du DNA dans la cellule procaryotique

La cellule procaryotique ne contient pas de noyau délimité par une enveloppe nucléaire ; cependant, par l'observation en microscopie électronique, le DNA chromosomique n'est pas dispersé dans toute la cellule et se trouve localisé dans une région restreinte appelée "corps nucléaire" (KELLENBERGER et coll., 1958).

Celui-ci est souvent associé à la membrane bactérienne soit directement, soit par l'intermédiaire d'un mésosome (RYTER, 1968). Le DNA chromosomique d'*Escherichia coli*, qui est une molécule gigantesque mesurant 1100 μm de longueur (CAIRNS, 1963) est condensé dans une structure dont le diamètre est de l'ordre de 1 μm .

Le DNA chromosomique a été isolé d'*E.coli* en une structure condensée appelée "génomme plié" par STONINGTON et PETTIJOHN (1971) ou "chromosome bactérien plié" par WORCEL et BURGI (1972). Ces expressions prêtent à confusion et nous retiendrons le terme "nucléoïde" qui a été finalement choisi par PETTIJOHN en 1976. Le nucléoïde a également été isolé de *Bacillus subtilis* (DWORSKY, 1977 ; GUILLEN et coll., 1978), *Salmonella typhimurium* (MANIS et coll., 1976) et *Azotobacter vinelandii* (SADOFF et coll., 1979).

I - 2-2-1 Préparation du nucléoïde

Le nucléoïde est difficile à isoler en raison de sa fragilité qui s'explique en partie par l'absence de membrane. Il s'agit de maintenir le DNA dans un état de condensation similaire à celui qui existe dans la cellule. Ceci peut être obtenu dans une solution de concentration saline élevée (NaCl 1M), soit en présence de polyamines. Ces conditions ont pour effet de neutraliser les charges de répulsion des groupes phosphates

des acides nucléiques dont la densité est très élevée dans la structure condensée. Les méthodes de préparation du nucléoïde consistent à lyser par une technique douce la paroi de la cellule bactérienne et le nucléoïde qui est un complexe de masse moléculaire élevée, est isolé des autres constituants cellulaires par centrifugation dans un gradient de saccharose. L'obtention d'un matériel non visqueux et sédimentant rapidement indique que dans le nucléoïde isolé le DNA est fortement replié.

Dans une solution de concentration saline élevée (NaCl 1M), deux types de nucléoïdes ont été isolés selon l'importance de la lyse de la paroi bactérienne. Si le milieu réactionnel est maintenu à une température qui n'excède pas 10°C, la lyse est incomplète et on isole un nucléoïde "associé aux membranes" (PETTIJOHN et coll., 1972 ; WORCEL et coll., 1974). Par contre, à température ambiante, la lyse est presque complète et on isole un nucléoïde "libre de membrane" (STONINGTON et coll., 1971 ; WORCEL et coll., 1972). L'élimination des membranes peut être également obtenue à 10°C, en présence d'un détergent comme le sarcosyl (WORCEL et coll., 1974). En réalité, il a été démontré ultérieurement que la lyse n'est jamais complète et que ces nucléoïdes renferment encore une très faible quantité de membrane (moins de 1 p.100 de l'enveloppe cellulaire).

Le nucléoïde "libre de membrane" a un coefficient de sédimentation de 1600 S. Le coefficient de sédimentation du nucléoïde "associé aux membranes" est compris entre 3000 et 4000 S. Cette hétérogénéité est due à la quantité variable de membrane qui reste associée au nucléoïde.

Deux méthodes ont été décrites pour préparer un nucléoïde en milieu de force ionique beaucoup plus faible. Dans la méthode de KORNBERG (1974) le nucléoïde est préparé dans une solution de NaCl 0.1M en présence de spermidine (5 mM). Dans la méthode de DWORSKY (1975), le nucléoïde est préparé dans un milieu NaCl 0.2M en présence de quantité réduite de détergents et de lysozyme. Ces méthodes plus douces aboutissent à l'isolement de nucléoïdes qui sont toujours associés aux membranes.

Il n'est pas possible de dissocier les membranes sans détruire le nucléoïde. Il semble donc que les membranes participent au maintien de la condensation du DNA dans les nucléoïdes préparés à faible force ionique. Les nucléoïdes préparés par les méthodes de KORNBERG (1974) et de DWORSKY (1975) n'ont pas le même coefficient de sédimentation, ni la même stabilité : ceci indique qu'ils doivent avoir des structures différentes. La disparité entre les structures obtenues par les méthodes décrites jusqu'à présent traduit la difficulté de l'isolement du nucléoïde. Les méthodes mises en oeuvre doivent permettre de séparer suffisamment les membranes de la paroi cellulaire mais doivent éviter les techniques trop drastiques qui déplient le DNA.

I - 2-2-2 Composition du nucléoïde

Parmi les nucléoïdes qui ont pu être préparés par différentes méthodes, tous renferment la totalité du DNA chromosomique dans un état non dégradé. Le nucléoïde contient également du RNA, des protéines et des lipides. Le nucléoïde "libre de membrane" est constitué de 60 p.100 de DNA, 30 p.100 de RNA, 5 à 10 p.100 de protéines et moins de 1 p.100 de lipides. Dans les nucléoïdes "associés aux membranes", les protéines et les lipides sont nettement plus abondants et leur taux varie avec la quantité de membrane qui reste associée au DNA. Le rapport pondéral protéines/DNA est proche de 1 dans le nucléoïde "associé aux membranes" et isolé en milieu NaCl 1M. Ce rapport est d'environ 0.8 dans le nucléoïde préparé par la méthode de DWORSKY (1976). Les lipides dont la présence est liée à celle des membranes peuvent représenter jusqu'à 20 p.100 des composants de ces nucléoïdes, selon PETTIJOHN (1976); mais ceci n'est pas admis par WORCEL (1974) : le taux de RNA est plus élevé dans le nucléoïde "associé aux membranes" que dans le nucléoïde "libre de membranes".

Dans tous les types de nucléoïdes, le RNA est en grande partie représenté par du RNA "naissant" (RNA nouvellement synthétisé) lié au DNA par la RNA polymérase.

L'identification des protéines des nucléoïdes n'a pas été menée de façon approfondie. On sait cependant que les sous-unités α , β , β' de la RNA polymérase représentent le composant protéique majeur dans les deux types de nucléoïdes

isolés en milieu NaCl 1M (STONINGTON et coll., 1971; WORCEL et coll., 1974) ainsi que dans le nucléoïde préparé par la méthode de KORNBERG comme l'ont montré PORTALIER et WORCEL (1976). La plupart des autres protéines des nucléoïdes associés aux membranes sont des protéines membranaires (PORTALIER et coll., 1976). Le nucléoïde préparé par la méthode de KORNBERG (1974) renferme, en plus des protéines déjà citées, deux protéines chromosomales qui ont été identifiées par VARSHAVSKY et coll. (1977) puis par BAKAYEV et coll. (1981). Ces auteurs ont purifié à partir du nucléoïde de *E. coli* un complexe desoxyribonucléoprotéique par centrifugation en gradient de sucrose ou par chromatographie de gel filtration sur colonne de Sepharose 2B. Après hydrolyse ménagée à la nucléase micrococcalle, ils obtiennent des fragments de DNA chromosomiques auxquels sont associées les protéines B1 et B2 dont la masse moléculaire respective est de 17.000 et 10.000. Les plus petits fragments ainsi obtenus sont constitués de polynucléotides de 100 à 120 paires de bases et d'une molécule de chacune des deux protéines B1 et B2. Le rapport protéines/DNA de ces complexes est de l'ordre de 0.2. Il semblerait que ces protéines soient réparties uniformément le long du DNA chromosomique. Les protéines B1 et B2 correspondent respectivement aux protéines H1 et HU dont nous reparlerons dans la partie I - 2-2-4-3.

La protéine HU a également été mise en évidence par ROUVIERE-YANIV (1978) dans la fraction des protéines thermostables du nucléoïde de *E. coli* préparé par la méthode de KORNBERG (1974).

I - 2-2-3 Organisation du DNA dans le nucléoïde isolé en milieu NaCl 1M

Les auteurs qui ont isolé les nucléoïdes en milieu de force ionique élevée ont cherché à déterminer la conformation du DNA et la nature des interactions qui le maintiennent dans cette structure. Les méthodes employées à ces fins consistent à traiter le nucléoïde par des agents chimiques ou enzymatiques qui en affectent les composants, et à suivre, par des mesures de viscosité et de sédimentation, le dépliement du DNA.

Le traitement du nucléoïde par la ribonucléase, la trypsine ou le dodécylsulfate de sodium (SDS) provoque le dépliement du DNA. Ces observations suggèrent que le RNA et les protéines participent au maintien de la condensation du DNA (DRLICA et WORCEL, 1975). Mais d'autres résultats obtenus par des études de sédimentation sur le nucléoïde déprotéinisé semblent indiquer que la structure condensée du DNA est stabilisée essentiellement par des interactions RNA-DNA (HECHT et coll., 1977).

Le DNA circulaire de *E. coli* présente une structure torsadée. Le degré de superhélicité du DNA, mesuré en suivant la modification du comportement du nucléoïde en présence de bromure d'éthidium, est de un tour de superhélicité négative pour 200 paires de bases. La structure superhéllicoïdale du DNA n'est que partiellement relâchée lorsque le nucléoïde est soumis à

une hydrolyse limitée par la DNase. Il faut beaucoup de coupures pour relâcher complètement cette structure dans le nucléoïde. Ces observations indiquent que le DNA est divisé en "domaines". Un "domaine" de DNA superhéliçoïdal correspond à une région de DNA liée en deux points à du RNA. Ces deux points de fixation maintiennent la torsion de la double hélice.

A partir de ces résultats, WORCEL et BURGI (1972) et ultérieurement PETTIJOHN (1976) ont proposé un modèle de l'organisation du DNA dans le nucléoïde "libre de membranes". Nous avons reproduit le modèle de PETTIJOHN dans la figure 3. Dans ce modèle, le DNA est maintenu (plié) par des molécules de RNA. Le DNA est ainsi divisé en "domaines" à l'intérieur desquels il a une configuration superhéliçoïdale. Les "domaines" sont indépendants c'est-à-dire que le relâchement de la superhélicité provoqué par une coupure sur un brin de DNA à l'intérieur d'un "domaine" ne se propage pas dans les "domaines" adjacents.

L'observation au microscope électronique des nucléoïdes isolés confirme la plupart de leurs caractéristiques déterminées par les méthodes physico-chimiques. Les nucléoïdes apparaissent comme un "core" dense qui renferme la majeure partie du RNA autour duquel s'étendent, tels des rayons, des boucles de DNA en superhélice (KAVENOFF et RYDER, 1976).

On peut se demander si la structure du nucléoïde isolé en milieu NaCl 1M correspond à celle qui existe *in vivo*. Des artéfacts peuvent, en effet, résulter de l'utilisation de

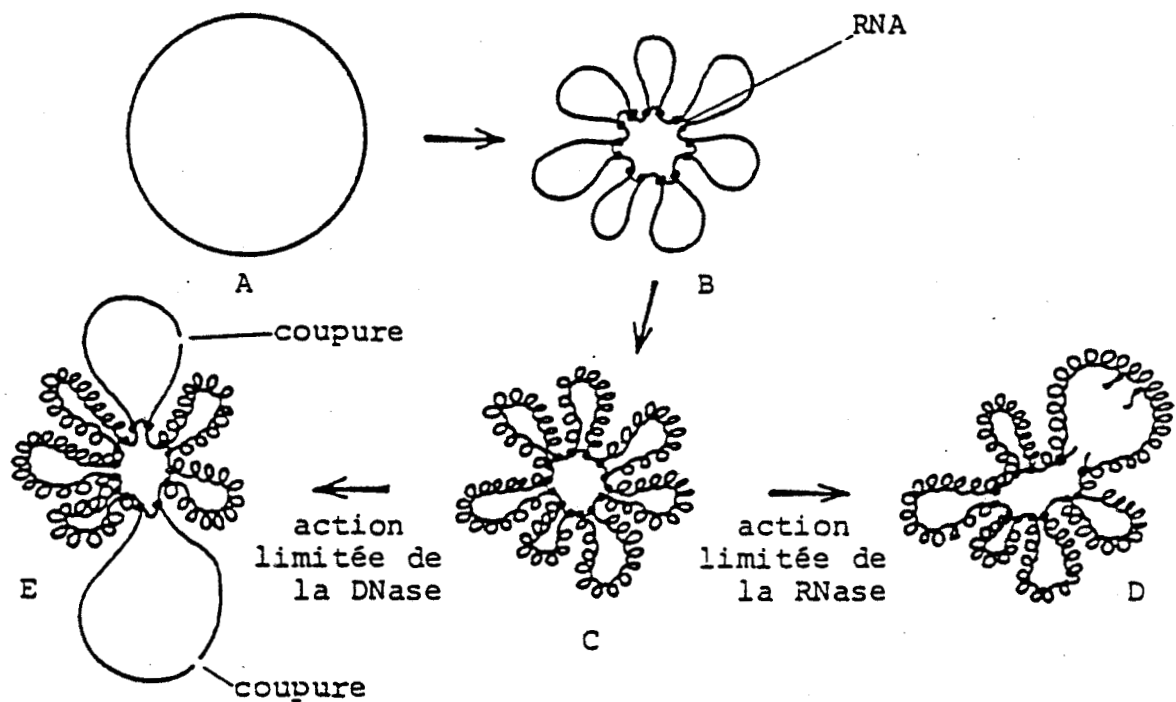


FIGURE 3 MODELE DE L'ORGANISATION DU DNA DANS LE NUCLEOIDE
"LIBRE DE MEMBRANES" D'APRES PETTIJOHN (1976)

A : Le DNA circulaire complètement déplié et relâché (Le DNA est bicaténaire mais nous n'avons représenté qu'un seul brin pour simplifier la figure).

B : Le DNA plié par l'intermédiaire d'interactions DNA-RNA. Seuls sept "domaines" sont représentés, mais le nucléoïde en contiendrait une centaine.

C : Le DNA plié et en superhélice dans le nucléoïde.

D : DNA partiellement déplié : par action limitée de la RNase un site d'interactions RNA-DNA est détruit et un "domaine" plus grand est formé. A l'intérieur de ce "domaine" le DNA est maintenu en superhélice.

E : DNA partiellement relâché : le relâchement de la superhélice n'intervient que dans les "domaines" où un brin de DNA a été coupé.

détergents et de sels à concentration élevée comme l'a fait remarquer PETTIJOHN (1976). Par ailleurs RYTER et CHANG (1975) ont montré par des études en autoradiographie que, dans la bactérie, la synthèse du RNA est localisée dans la zone cytoplasmique avoisinant le nucléoïde. Or, le RNA "naissant" représente la majeure partie du RNA du nucléotide. *In vivo* la localisation du RNA est inversée par rapport à celle visualisée en microscopie électronique et représentée dans le modèle de PETTIJOHN (Figure 3). Il semble donc qu'au cours de l'isolement du nucléoïde en milieu de force ionique élevée des réarrangements structuraux de ces composants se soient produits (PETTIJOHN, 1976 ; KLEPPE et coll., 1979).

Des réserves importantes doivent donc être faites sur la conformité de la structure du DNA dans les nucléotides isolés à force ionique élevée avec celle qui existe *in vivo*, bien que ces nucléoïdes observés en microscopie de fluorescence aient le même taux de DNA et les mêmes dimensions que les nucléoïdes *in vivo* (HECHT et coll., 1975). Les méthodes d'isolement du nucléoïde à force ionique élevée ont cependant permis de montrer que le DNA chromosomique de la bactérie est condensé et est associé à du RNA et à des protéines.

I - 2-2-4 Organisation du DNA en milieu de force ionique faible

Des informations sur l'organisation du DNA en milieu de force ionique faible ont été apportées d'une part par deux études effectuées sur le nucléoïde isolé, d'autre part par une observation directe de la cellule.

I - 2-2-4-1 Etudes effectuées sur le nucléoïde isolé

DWORSKY (1976) a montré que le degré de superhélicité du DNA dans le nucléoïde préparé par sa méthode (en milieu NaCl 0.2M) est semblable à celui du DNA dans le nucléoïde préparé en milieu NaCl 1M. Par contre, le RNA n'est plus ici un facteur prépondérant dans la condensation du DNA et les membranes semblent nécessaires à la stabilité du nucléoïde.

L'organisation du DNA dans le nucléoïde isolé par la méthode de KORNBERG a été étudiée par VARSHAVSKY et coll. (1977). Une hydrolyse douce par la nucléase staphylococcique du nucléoïde ou de la DNP isolée à partir de ce nucléoïde libère des "fragments" de DNA d'environ 120 paires de bases, associés aux protéines 1 et 2 que ces auteurs avaient mis en évidence dans ce nucléoïde, comme nous l'avons signalé précédemment. Il apparaît donc que le DNA est localement protégé. Toutefois ces "fragments" de DNA sont moins condensés que le

DNA du nucléosome de la chromatine eucaryotique. VARSHAVSKY et coll. (1977) ne trouvent pas comme dans la chromatine des Eucaryotes des "fragments" de DNA dont la longueur soit un multiple entier de celle des plus petits "fragments". Selon ces auteurs, il n'est donc pas encore possible de conclure que ces "fragments" correspondent à une structure répétitive analogue au nucléosome de la chromatine des Eucaryotes.

I - 2-2-4-2 Observation directe sur la cellule

Lorsque la cellule de *E. coli* est lysée par du lysozyme directement sur la grille d'un microscope électronique en milieu NaCl 0.15M, GRIFFITH (1976) observe des fibres de DNA de 120 Å de diamètre présentant des sous-structures répétitives en forme de perles de 130 Å de diamètre. Dans cette structure, le DNA n'est pas superhélioidal. Ces fibres de DNA ne sont observées que dans des conditions physiologiques : en milieu NaCl 1M ou 0.01M ou encore en présence de détergent ionique. GRIFFITH remarque à la place de ces fibres des boucles de DNA étendues et de section plus fine qui ressemblent à celles observées dans le nucléoïde isolé en milieu NaCl 1M. Dans ces boucles, le DNA est en superhélice.

Pour caractériser ces fibres, GRIFFITH a examiné le DNA dans une bactérie lysogène surinfectée par le phage λ . Il observe un minichromosome de phage λ condensé en fibres identiques à celles du DNA de la bactérie et a pu déterminer que

chaque unité en forme de perle doit contenir environ 250 paires de bases de DNA. Selon GRIFFITH, les fibres de DNA des Procaryotes ont des paramètres physiques semblables à ceux des fibres des Eucaryotes complexés avec les histones. Elles sont cependant beaucoup moins stables que les fibres de DNA présentes dans la cellule procaryotique.

I - 2-2-4-3 Recherche de protéines susceptibles de condenser le DNA dans la bactérie

Depuis longtemps on sait que les bactéries sont dépourvues d'histones (RAAF et BONNER, 1968; TAKEUCHI et TSUGITA, 1970). On peut donc se demander quel peut être le facteur de la condensation du DNA dans la cellule bactérienne.

Depuis une décennie, des recherches entreprises sur *Escherichia coli* ont permis d'isoler et de caractériser les protéines qui se lient au DNA. Deux revues sur ces protéines ont été publiées par COLEMAN et OAKLEY (1980) puis par GEIDRE et HOFFMANN-BERLING (1981).

Ces études ont conduit à l'isolement chez *E. coli* de plusieurs protéines acido-solubles, de faible masse moléculaire relative, qui présentent une affinité pour le DNA et qui pourraient être impliquées dans la condensation du chromosome bactérien.

Quatre d'entre elles, les protéines HU (ROUVIERE-YANIV, et GROS ,1975), H1 (SPASSKY et coll.,1977), H (HÜBSCHER et coll.,1980) et HLP 1 (LATHE et coll.,1980) (Tableau III) ont en commun les caractéristiques suivantes : elles sont abondantes (20.000 à 100.000 copies par cellule), thermostables et se comportent comme des dimères en solution.

La protéine HU isolée pour la première fois par ROUVIERE-YANIV et GROS (1975) a également été isolée dans d'autres laboratoires où elle a reçu des appellations différentes. BERTHOLD et GEIDER (1976) l'ont appelée protéine HD , VARSHAVSKY et coll. (1977) protéine II. Après que la protéine HU ait été démontrée comme étant en fait un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques HU-1 et HU-2 ,LAINE et coll.(1978), SURYANARAYANA et SUBRAMANIAN (1978) ont aussi isolé à partir de la sous-unité native 30 S du ribosome, les protéines NS1 et NS2 qui correspondent respectivement aux protéines HU-1 et HU-2.

Les propriétés de la protéine HU qui a été la mieux caractérisée parmi les autres protéines citées précédemment, seront présentées ultérieurement.

La protéine H1 est une protéine neutre de masse moléculaire 15.500 qui a une action sur l'initiation de la transcription *in vitro* (CUKIER-KAHN,1972).

La protéine H a une masse moléculaire de 28.000. Sa composition en acides aminés présente une similitude avec celle de l'histone H2A ; de plus, elle réagit avec l'anti-sérum anti-histone H2A (HÜBSCHER et coll.,1980).

TABLEAU III
PROPRIETES DES PROTEINES SE LIANT AU DNA

Protéines associées au DNA	Masse moléculaire	Nombre de copies	Dimère	Affinité pour les acides nucléiques	Effet sur la synthèse des acides nucléiques et des protéines	Acido-soluble	Thermostabilité
Protéine HU. (ROUVIERE-YANIV et GROS, 1975)	9.500	100.000	+	DNA bicaténaire DNA monocaténaire RNA	+	+	+
Protéine H1 (SPASSKY et coll., 1977)	15.500	17.000*	+	DNA bicaténaire DNA monocaténaire	+	+	+
Protéine H (HÜBSCHER et coll., 1980)	28.000	30.000	+	DNA bicaténaire	+	+	+
Protéine HLPI (LATHE & coll. 1980)	17.000	20.000	+	DNA bicaténaire	+	+	+
Protéine isolée par KISHI & coll. 1982	22.000	10.000	monomère	DNA bicaténaire DNA monocaténaire	-	+	-

* en fin de phase stationnaire.

La protéine HLP I de masse moléculaire 17.000 interagit avec la DNA polymérase de *E.coli* (LATHE et coll.,1980), elle est codée par le gène *hir A*.

Une autre protéine de masse moléculaire 22.000 a été récemment caractérisée chez *E.coli*. Elle se lie au DNA superhélicoïdal et au DNA monocaténaire. Cette protéine présente des caractéristiques différentes de celles des protéines ci-dessus : elle se comporte comme un monomère en solution, elle est moins abondante (10.000 copies par cellule), instable à la chaleur et n'est pas impliquée dans la synthèse du DNA, du RNA et des protéines *in vitro*. Toutefois selon KISHI (1982), cette protéine serait impliquée dans le maintien de la conformation du nucléoïde.

Il faut cependant remarquer que parmi les protéines citées ci-dessus, seules les protéines HU et H1 ont été identifiées dans des complexes desoxyribonucléoprotéiques isolés dans des conditions douces (VARSHAVSKY et coll.,1977 ; WU et coll.,1982).

VARSHAVSKY et coll.(1977), puis BAKAYEV(1981) ont montré que les protéines HU et H1 qu'ils appellent respectivement B2 et B1, sont associées à des fragments de DNA chromosomiques (Voir partie I - 4-2-2).

D'autre part WU et coll. (1982) ont isolé de *E.coli* un complexe plasmide-protéine en quantité importante. Les protéines HU et H1 représentent avec la DNA polymérase les protéines les plus abondantes de ce complexe.

I - 2-2-5 Interaction de la protéine HU avec les acides nucléiques

La protéine HU présente une affinité pour le RNA monocaténaire et pour le DNA mono- et bicaténaire (ROUVIERE-YANIV et GROS, 1975; BERTHOLD et coll., 1976). La protéine HU a été isolée de *E. coli* par chromatographie d'affinité sur une colonne de DNA monocaténaire (BERTHOLD et GEIDER, 1976) ou de DNA bicaténaire (ROUVIERE-YANIV et GROS, 1975). Les interactions de la protéine HU avec le DNA monocaténaire ont été étudiées par GEIDER et coll. (1976), ZENTGRAF et coll. (1977), GEIDER (1978), tandis que les interactions protéines HU-DNA bicaténaire ont été essentiellement étudiées par ROUVIERE-YANIV et coll. (1975, 1977, 1979) et récemment par LOSSO et coll. (1982), MIANO et coll. (1982), IMBER et coll. (1982).

I - 2-2-5-1 Interactions avec le DNA monocaténaire

Les interactions de la protéine HU avec le DNA monocaténaire ont été analysées au moyen de trois méthodes : la sédimentation (BERTHOLD et coll., 1976), l'observation au microscope électronique (ZENTGRAF et coll., 1977) et l'hydrolyse du complexe DNA-protéine par la DNase I (BERTHOLD et coll., 1976; GEIDER, 1978). Ces études ont permis de comparer les propriétés de la protéine HU avec celles des protéines destabilisatrices

de l'hélice du DNA (HDP). Les études de centrifugation en gradient de saccharose ont montré que la formation du complexe DNA du phage fd avec la protéine HU est non coopérative. A l'inverse, la HDP de *E. coli* se fixe coopérativement sur le DNA du phage fd. En microscopie électronique, on observe, après addition de protéine HU au DNA monocaténaire et circulaire du phage fd, la formation d'une structure condensée en spirale. La conformation de ce complexe est très différente de celle des complexes que forme ce DNA avec les HDP : en effet, lorsqu'il est associé à la HDP de *Escherichia coli*, le DNA du phage fd conserve une configuration étendue. Lorsque le DNA est associé à la protéine HU, il est partiellement protégé contre l'action ménagée de la DNase I. Bien que le complexe protéine HU-DNA soit plus compact que le complexe HDP-DNA, le DNA est moins bien protégé par la protéine HU que par la HDP. Ces résultats indiquent que ces deux protéines interagissent différemment avec le DNA monocaténaire et appartiennent à des familles bien distinctes de protéines.

I - 2-2-5-2 Interactions avec le DNA bicaténaire

Quatre voies d'approche différentes ont été utilisées pour caractériser les interactions de la protéine HU avec le DNA bicaténaire du phage λ : la rétention sur filtre Millipore, la centrifugation, la microscopie électronique et la fusion du DNA.

La protéine HU forme avec le DNA un complexe stable qui sédimente en un pic étroit dans un gradient de glycérol (ROUVIERE-YANIV et GROS, 1975) comme dans un gradient de saccharose (BERTHOLD et GEIDER, 1976). Le DNA est saturé lorsque le rapport pondéral protéine HU/DNA est égal à deux.

Le DNA "filtrable" sur membrane de nitrocellulose est retenu sur le filtre lorsqu'il est associé à la protéine HU. La rétention sur le filtre est quantitative pour un rapport pondéral protéine/DNA de 0.5.

Lorsque la protéine HU est associée à des fragments de DNA obtenus par hydrolyse du DNA du phage λ par l'endonucléase Eco R I, ROUVIERE-YANIV et GROS (1975) observent au microscope électronique des filaments plus épais que ceux du DNA nu. Ces filaments présentent des conformations en "épingles à cheveux". De plus, la protéine HU se fixe indifféremment sur tous les fragments de DNA. Il semble donc qu'il n'y ait pas reconnaissance sélective de séquences nucléotidiques par la protéine HU. Cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus par VARSHAVSKY et coll. sur la DNP d'*E. coli* (1977) et qui montrent que la protéine HU est distribuée uniformément le long du DNA.

Par ailleurs, une condensation importante du DNA bicaténaire du phage T-7 en présence de la protéine HU a été mise en évidence par ZENTGRAF et coll. (1977), dans ce cas, le DNA forme des boucles "ressemblant à des guirlandes".

Des études sur le DNA circulaire du virus eucaryotique SV40 ont permis d'approfondir la connaissance des interactions

entre la protéine HU et le DNA bicaténaire (ROUVIERE-YANIV et coll., 1979). En présence de "nicking closing enzyme", la protéine HU introduit 18 supertours négatifs dans un DNA relâché. Dans le complexe protéine HU-DNA, le DNA est condensé par un facteur de 2.0 à 2.4 par rapport au DNA nu et présente des structures en forme de perles dont le diamètre est de 180 Å. Ces structures sont instables et ne peuvent être observées qu'après fixation par la glutaraldéhyde. L'instabilité est la principale différence que l'on puisse observer entre ce complexe et celui formé par l'association des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4 avec le DNA de SV40. D'autres différences peuvent être relevées : dans le complexe reconstitué *in vitro* avec les histones, 21 supertours d'hélice sont introduits, les "perles" sont mieux définies, elles sont plus nombreuses et de diamètre plus petit. Cependant, dans ce complexe, le facteur de condensation du DNA est du même ordre que celui observé dans le complexe protéine HU-DNA de SV40.

Cependant cette hypothèse a été controversée par IMBER et coll. (1982). Ces auteurs ont étudié l'interaction de la protéine de type HU isolée de *Bacillus globigii* appelée protéine HB avec le DNA du phage λ . La stabilité du complexe protéine-DNA bicaténaire marqué au ^{32}P à différentes forces ioniques est étudiée en mesurant la quantité de DNA marqué retenu sur un filtre de nitrocellulose. Le complexe est stable jusqu'à une molarité en NaCl de 200 mM ou en MgCl_2 de 100 mM. Les expériences sont ensuite répétées en présence d'héparine qui fixe irréversiblement la protéine HB et sert

ainsi de compétiteur. Dans ce cas le complexe se dissocie dès que la molarité atteint 100 mM en NaCl ou 10 mM en $MgCl_2$. Etant donné que la force ionique intracellulaire de la bactérie *E. coli* est de l'ordre de 600 mM en NaCl et 100 mM en $MgCl_2$ (MONCANY, 1982) IMBER et collaborateurs en déduisent que les protéines de type HU ne peuvent être associées au DNA *in vivo*. Or, pour leurs expériences, IMBER et coll. (1982) utilisent une concentration en protéine HB égale à 0.2 $\mu g/ml$ et un rapport protéine/DNA égal à 0.06. De plus la quantité de protéine disponible diminue rapidement lorsqu'elle est irréversiblement liée à l'héparine. Les conditions expérimentales ne sont probablement pas bien choisies pour étudier une protéine qui interagirait avec le DNA d'une manière similaire à celle des histones. En effet, pour reconstituer le nucléosome avec les histones, la concentration des histones doit atteindre une valeur suffisante pour former le "core" nucléosomal autour duquel s'enroule le DNA.

Pour étudier la stabilité des complexes protéines de type HU-DNA, il aurait donc fallu choisir d'une part une concentration en protéine suffisante pour que la protéine puisse former des tétramères ou des octamères ; d'autre part, un rapport protéine/DNA au moins égal à celui observé par VARSHAVSKY (1976) dans la DNP de *E. coli* (rapport égal à 0.2).

Nous discuterons d'une façon plus approfondie de cette question lorsque nous étudierons l'interaction des protéines HU et HRm avec le DNA dans la partie "Interactions DNA-protéines HRm et HU".

I - 2-2-5-3 Effet de la protéine HU sur la stabilité thermique du DNA

ROUVIERE-YANIV (1977) a déjà montré que la protéine HU a un rôle important dans la stabilisation du DNA contre la dénaturation thermique.

La protéine HTa isolée de *Thermoplasma acidophilum* présente cette même propriété (STEIN et coll., 1978).

Récemment, MIANO et coll. (1982) ont étudié l'effet des protéines NS1 et NS2 et de leur dimère NS de *E. coli* sur la dénaturation et la renaturation du DNA de *E. coli* ou de thymus de Veau.

L'addition de ces protéines au DNA, dans un rapport protéine/DNA de 1 à 2, cause une augmentation significative de la température de transition. La rapidité et l'importance de la renaturation du DNA sont également accrues. Par rapport à NS1, NS2 présente cependant une plus grande efficacité dans la renaturation du DNA.

Les auteurs ont montré que les effets observés sont plus importants qualitativement et quantitativement lorsque les protéines NS1 et NS2 sont associées à leur DNA homologue.

I - 2-2-5-4 Effet de la protéine HU sur la synthèse et la transcription du DNA

La protéine HU stimule *in vitro* la transcription du DNA du phage λ par la RNA polymérase d'*E.coli* (ROUVIERE-YANIV et GROS, 1975). Elle inhibe la synthèse du DNA par les DNA polymérases I, II et III d'*E.coli* (BERTHOLD et GEIDER, 1976).

L'effet de la protéine HU sur la transcription du DNA a été étudié par de nombreux auteurs, mais les résultats obtenus sont divergents. En effet, certains auteurs disent qu'elle stimule fortement la transcription du DNA du phage λ (ROUVIERE-YANIV et coll., 1975), d'autres disent qu'elle stimule la transcription du DNA du phage T-7 (BERTHOLD et coll., 1976) et le rapport le plus récent montre que la transcription du DNA du phage λ est inhibée par la protéine NS (HU) isolée de *Pseudomonas* et de *E.coli* (HAWKINS et coll., 1981).

LOSSO et coll. (1982) ont montré que le mélange des protéines NS1 et NS2 dans un rapport 1/1 inhibe la transcription de différentes matrices de DNA à divers degrés, l'effet le plus important étant observé avec le DNA du phage λ et le DNA de *E.coli*, et le plus faible avec du poly d (A+T). Ils ont également remarqué qu'au cours de cette étude, il n'y avait pas de dégradation du DNA (ou d'autres produits) lors de l'incubation avec la protéine. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la transcription du DNA n'est due ni à NS1 ni à NS2 seule, mais que les deux protéines considérées isolément ont essentiellement le même effet que leur mélange.

I - 3 OBJECTIF DE NOS RECHERCHES ET CHOIX DES SOUCHES

I - 3-1 Objectif de nos recherches

Ayant mis en évidence une grande hétérogénéité de la famille des *Rhizobiaceae*, il nous a semblé intéressant d'aborder la phylogénie de ces bactéries. Celles-ci ont été préalablement classées en différents groupes d'inoculation. Cependant la localisation des gènes responsables de la nodulation (gènes nod) et de la fixation de l'azote (gènes nif et fix) chez *Rhizobium* constitue un problème tout à fait fondamental. En effet, ces gènes sont portés principalement par des plasmides de haut poids moléculaire (voir précédemment). Si le support de ces déterminants génétiques est stable, il ne devrait pas y avoir de contradiction entre les résultats donnés par les analyses phylogéniques classiques et les affinités entre les différents *Rhizobium* découlant de leur spécificité d'hôte.

Par contre si ces éléments extrachromosomiques sont acquis de façon transitoire, les relations entre la phylogénie et la spécificité d'hôte ne pourront pas se vérifier. Si cette deuxième hypothèse s'avérait exacte, l'origine de l'élément extrachromosomique impliqué serait mise en question.

Pour essayer de résoudre ce problème, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une protéine particulière, la protéine HU.

Cette protéine a été initialement isolée de *E. coli* (ROUVIERE-YANIV et GROS, 1975). La protéine HU est une protéine légèrement basique, de masse moléculaire relative 9.500 (90 résidus d'acides aminés) qui se lie au DNA et intervient probablement dans sa condensation. De ce fait, elle joue peut-être un rôle analogue à celui des histones identifiées chez les Eucaryotes.

Dans la chromatine des Eucaryotes, le DNA est compacté dans une structure formée de sous-unités répétitives appelées nucléosomes. Chaque nucléosome contient un octamère d'histones autour duquel s'enroule un segment de 165 paires de bases de DNA. Les histones ont été remarquablement conservées au cours de l'évolution. On peut par conséquent supposer que la protéine HU des Procaryotes à l'image des histones a subi au cours de l'évolution une certaine stabilité de sa structure primaire. C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'isoler et d'étudier la protéine de type HU de plusieurs "espèces" de *Rhizobiaceae* et d'en dégager les caractères structuraux constants ou variables.

D'autre part, des protéines de type HU ont été isolées d'espèces bactériennes diverses telles que des bactéries gram(-) *Escherichia coli* (ROUVIERE-YANIV et coll., 1975), *Pseudomonas aeruginosa* (HAWKINS et coll., 1981), *Salmonella typhimurium* (ROUVIERE-YANIV, 1978), *Rhizobium meliloti* (LAINE et coll., 1982), *Haemophilus influenzae* (SUTRINA et coll., 1983); de deux espèces de cyanobactéries : *Anabaena* et *Aphanocapsa* (HASELKORN et coll., 1976), des bactéries gram(+) : *Bacillus*

subtilis (NAKAYAMA, 1980), *Bacillus globigii* (IMBER et coll., 1982) et *Bacillus stearothermophilus* (DIJK et coll., 1983) ainsi que dans une Archaeobactérie, *Thermoplasma acidophilum* (SEARCY, 1975).

Puisque la protéine de type HU semble répandue dans toutes les espèces bactériennes, la comparaison de sa structure primaire devrait permettre de relier entre eux un grand nombre de microorganismes.

I - 3-2 Choix des souches

Nous avons dans un premier temps commencé l'étude d'une souche du genre *R.meliloti* (groupe M), *R.meliloti* 2011 Str3. Cette souche a fait l'objet de nombreuses recherches dans le laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille. Ces recherches ont permis de déterminer certains aspects de son métabolisme hydrocarboné, son contenu plasmidique ainsi que la sensibilité à différents bactériophages et antibiotiques.

L'isolement et la caractérisation de la protéine de type HU de cette souche ont été entrepris dès 1980. Elle a abouti à la détermination de sa séquence complète (LAINE et coll., 1983).

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressé à la protéine de type HU d'une bactérie du genre *Agrobacterium* (groupe A) qui est taxonomiquement proche du groupe M. Nous avons donc choisi la souche AB6 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

L'hétérogénéité des souches de *R. leguminosarum* nous a incité à comparer les protéines de type HU de deux souches appartenant à deux groupes différents : la souche de *R. leguminosarum* L18 incluse dans le groupe A (dans lequel se situe *Agrobacterium*) et la souche de *R. leguminosarum* L53 incluse dans le groupe T représenté essentiellement par *R. trifolii*. Nous avons vérifié la spécificité d'infectivité des clones de *Rhizobium leguminosarum* que nous avons utilisés pour extraire la protéine HU. Les résultats sont donnés dans le tableau IV; ils prouvent que les clones appartiennent bien au même groupe d'inoculation.

Enfin notre attention s'est porté sur la protéine de type HU isolée d'une souche de *R. japonicum* J5 qui est très éloignée des souches précédentes.

TABLEAU IV

ESSAIS D'INFECTION DE PLANTULES DE *Medicago* ET DE *Pisum* PAR *R. meliloti* 2011 Str3, *R. leguminosarum* L18 ET *R. leguminosarum* L53

Souches	Nombre de nodules par plantule de <i>Medicago</i>	Nombre de nodules par plantule de <i>Pisum</i>	Temps de nodulation
2011 Str3	18	0	10 à 20 jours
L18	0	65	15 à 21 jours
L53	0	37	15 à 21 jours

Les nombres de nodules indiqués correspondent aux moyennes observées sur les racines de 10 plantules pour *R. meliloti* et de 5 plantules pour *R. leguminosarum*.

CHAPITRE II

ETUDE COMPARATIVE DES PROTEINES DE TYPE HU ISOLEES DE
DIFFERENTES ESPECES DE RHIZOBIACEAE

PLAN DU CHAPITRE II

ETUDE COMPARATIVE DES PROTEINES DE TYPE HU ISOLEES DE
DIFFERENTES ESPECES DE *Rhizobiaceae*II - 1 NOMENCLATURE DES PROTEINESII - 2 ISOLEMENT DES PROTEINES DE TYPE HU

II - 2-1 Préparation des protéines de type HU

II - 2-2 Purification des protéines de type HU

II - 2-3 Séparation des protéines HRj-1 et HRj-2
de *R.japonicum*II - 3 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTEINES DE TYPE HUII - 3-1 Comportement électrophorétique sur gel de
polyacrylamide

II - 3-2 Propriétés immunologiques

II - 3-3 Composition en acides aminés

II - 3-4 Discussion

II - 1 NOMENCLATURE DES PROTEINES

Les protéines de type HU ont été nommées par des lettres qui rappellent le nom des souches que nous avons choisies pour notre étude. La position de ces souches bactériennes dans le dendrogramme des *Rhizobiaceae* est montrée dans la figure 2 (page 22) et l'origine des souches est indiquée dans le tableau VIII (Partie technique, page 194).

La nomenclature des protéines de type HU est présentée dans le tableau V.

TABLEAU V

NOMENCLATURE DES PROTEINES DE TYPE HU ETUDIEES

Nom des souches	Nom des protéines
<i>Rhizobium meliloti</i> 2011 Str3	HRm
<i>Rhizobium leguminosarum</i> L18	HR1-18
<i>Rhizobium leguminosarum</i> L53	HR1-53
<i>Rhizobium japonicum</i> J5	HRj
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AB6	HAt

II - 2 ISOLEMENT DES PROTEINES DE TYPE HU

II - 2-1 Préparation des protéines de type HU

II - 2-1-1 Principe de la méthode

La préparation des protéines de type HU s'inspire d'un procédé général décrit par ALBERTS et HERRICK (1971) pour isoler des protéines ayant une affinité pour le DNA. Ce procédé utilise la chromatographie d'affinité sur colonne de DNA-cellulose. Cette méthode nécessite l'élimination préalable du DNA contenu dans la cellule bactérienne par précipitation avec le polyéthylène glycol après dissociation du complexe nucléoprotéique à force ionique élevée (NaCl 1.5M). Ensuite, les protéines qui ont une affinité pour le DNA sont fixées sur une colonne de DNA-cellulose d'où elles sont désorbées par un gradient de force ionique croissante.

La molarité en NaCl (exprimée en mmol) des tampons utilisés lors de la chromatographie est indiquée dans notre exposé par un chiffre qui suit la lettre T. Les conditions expérimentales utilisées pour préparer les protéines de type HU sont présentées dans la partie technique (page 213).

II - 2-1-2 Résultats

II - 2-1-2-1 Préparation de la protéine HRm de *R.meliloti*

Le diagramme d'élution obtenu lors de la séparation des protéines se liant au DNA de *R.meliloti* par chromatographie d'affinité sur colonne de DNA-cellulose est présenté dans la figure 4-A. La figure 4-B présente le diagramme électrophorétique des fractions éluées de cette chromatographie.

La fraction 1 (non analysée en électrophorèse) correspond aux constituants qui n'ont pas d'affinité pour le DNA et qui par conséquent, n'ont pas été retenus sur la colonne.

La fraction 2 élue à une molarité de 100 mM en NaCl est très hétérogène.

La protéine HRm est élue dans les fractions 3 et 4 par une molarité en NaCl comprise entre 120 mM et 180 mM ; elle représente le constituant majeur de ces deux fractions.

La fraction 5 élue à une molarité en NaCl de 2M ne renferme que des traces de protéines et n'a pas été étudiée.

II - 2-1-2-2 Préparation de la protéine HAt d'*A.tumefaciens*

Le diagramme d'élution obtenu lors de la séparation des protéines se liant au DNA d'*Agrobacterium tumefaciens* par chromatographie d'affinité sur colonne de DNA-cellulose est présentée dans la figure 5-A.

FIGURE 4-A FRACTIONNEMENT DES PROTEINES SE LIANT AU DNA DE *Rhizobium meliloti* PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE DNA-CELLULOSE

La colonne (2.5x20cm) de DNA de *R. meliloti* couplé à la cellulose est équilibrée avec le tampon T-50.

La fraction 1 correspond au matériel non retenu sur la colonne.

La fraction 2 est éluée par le tampon T-100.

Les fractions 3 et 4 sont éluées par un gradient linéaire de molarité en NaCl (100 mM - 200 mM) obtenu avec les tampons T-100 et T-200 (2 x 125 ml).

La fraction 5 est éluée par le tampon T-2000.

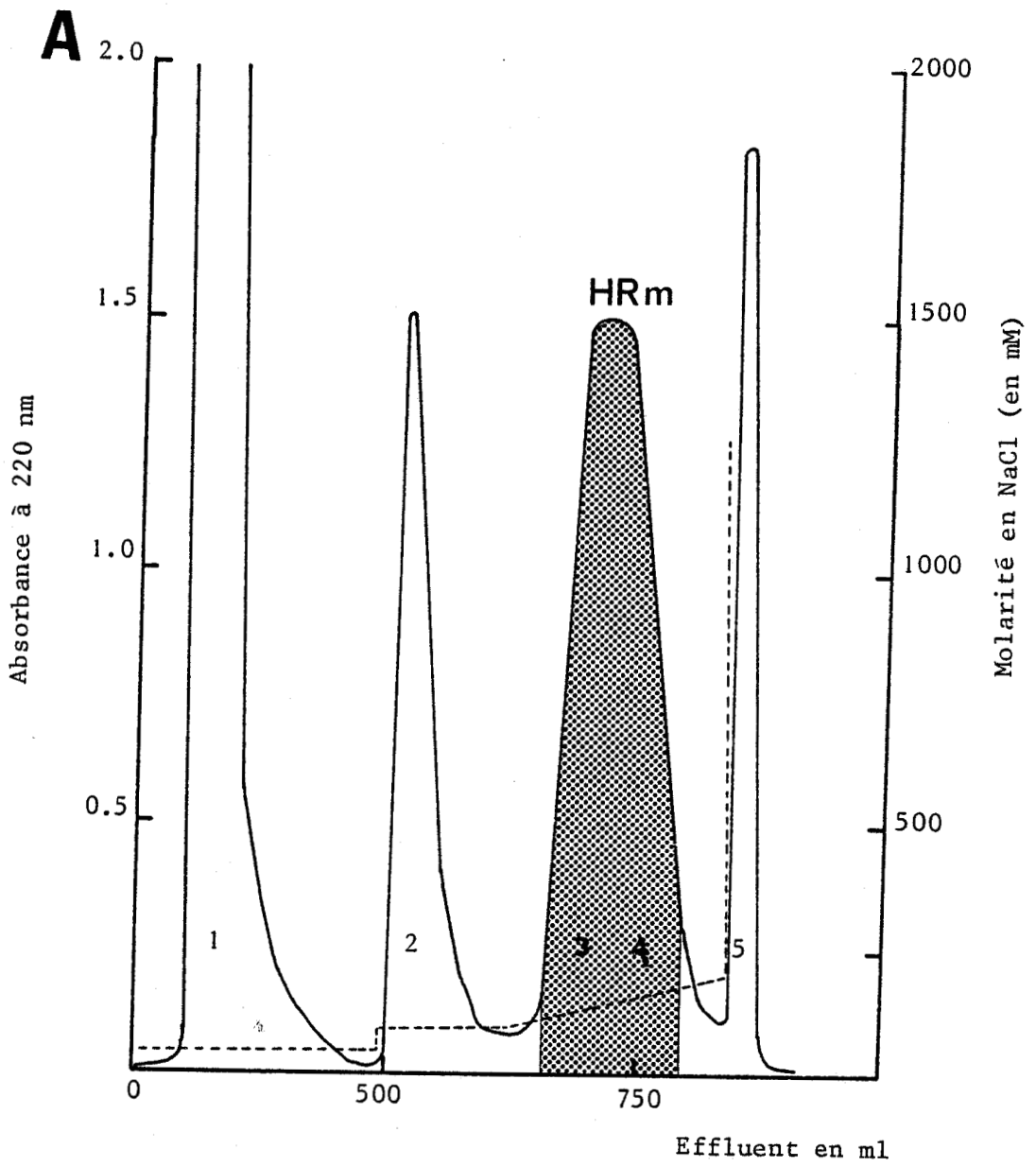
Des fractions de 5.8 ml ont été collectées à un débit de 44 ml/heure.

FIGURE 4-B ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES FRACTIONS DE LA FIGURE 4-A (PROTEINES DE *R. meliloti*) SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU DODECYLSULFATE DE SODIUM.

M = témoins de masse molaire connue : phosphorylase b (94.000), albumine sérique de Boeuf (67.000), ovalbumine (43.000), anhydrase carbonique (30.000), inhibiteur trypsique de soja (20.000) et α -lactalbumine (14.400).

Les couloirs 2,3 et 4 correspondent respectivement aux fractions 2,3 et 4 de la figure 4-A.

Les échantillons (7 μ g) sont traités avec 5 p.100 de SDS, 2 p.100 de 2-mercaptoéthanol pendant 2 minutes à 100°C. L'électrophorèse est effectuée sous une intensité de 40 mA pendant 150 minutes sur une plaque de gel de polyacrylamide (120x70x1 mm). La concentration d'acrylamide dans le gel varie linéairement de 5 à 30 p.100. Le tampon d'électrode (Tris 16 mM/glycine 128 mM ajusté à pH 8.3 avec HCl) et le tampon de gel (Tris 0.75 M/HCl, pH 8.9) contiennent 0.1 p.100 de SDS. Le gel est coloré pendant 15 heures par une solution à 0.5 p.100 de bleu de Coomassie R250 dans le mélange acide acétique-éthanol-eau (1:2:7, v/v/v) et décoloré par simple diffusion dans le mélange acide acétique-éthanol-eau (4:5:31, v/v/v).



B

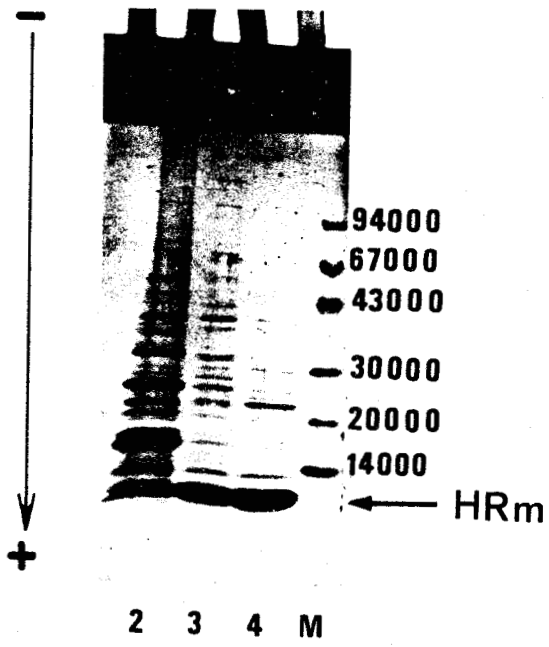


FIGURE 5-A FRACTIONNEMENT DES PROTEINES SE LIANT AU DNA D'*Agrobacterium tumefaciens* PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE DNA-CELLULOSE

La colonne (2.5x20cm) de DNA de *R. meliloti* couplé à la cellulose est équilibrée avec le tampon T-50.

La fraction 1 correspond au matériel non retenu sur la colonne.

La fraction 2 est éluée par le tampon T-100.

Les fractions 3 et 4 sont éluées par un gradient linéaire de molarité en NaCl (100 mM - 300 mM) obtenu avec les tampons T-100 et T-300 (2x150 ml).

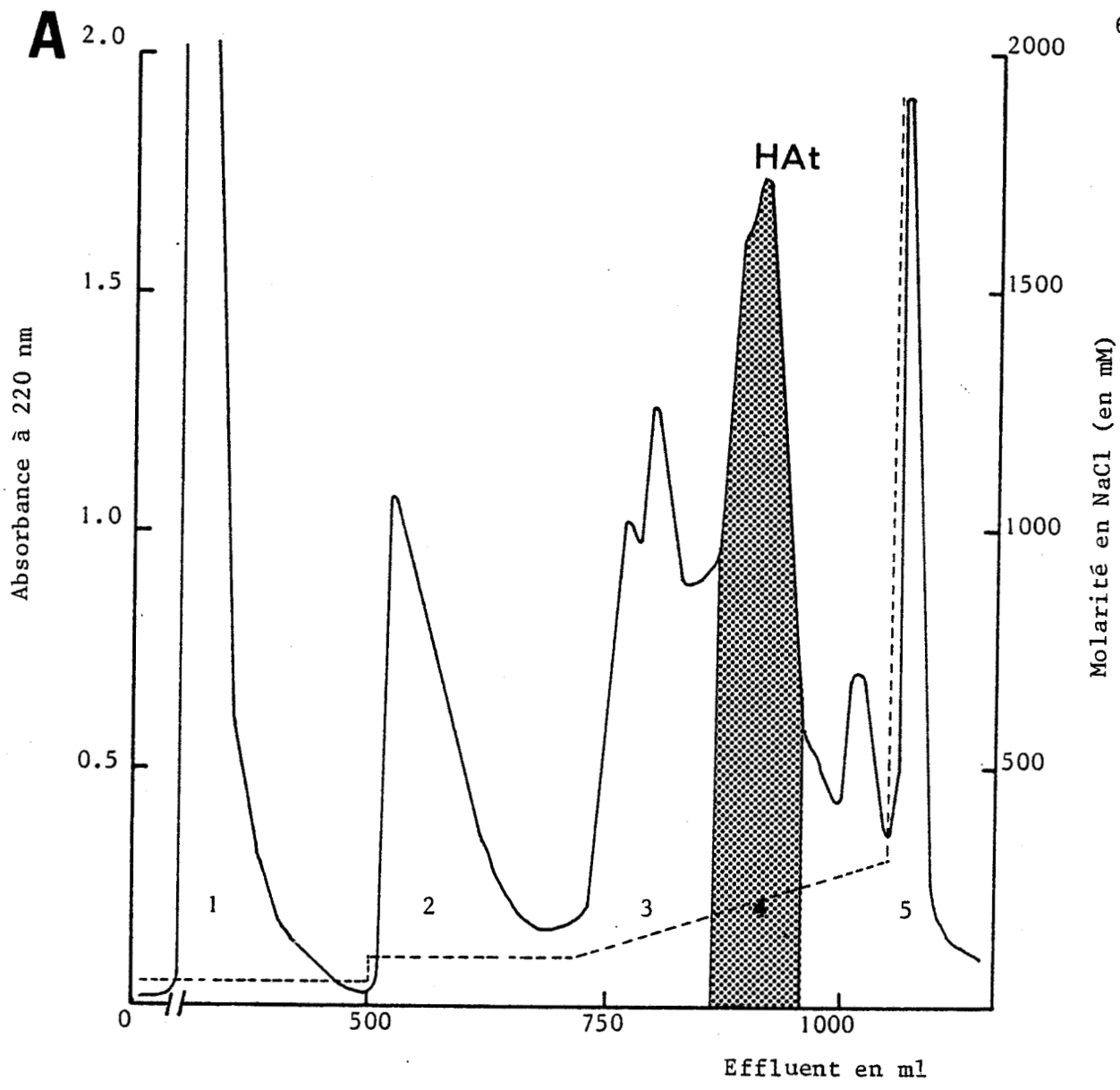
La fraction 5 est éluée par le tampon T-2000.

Le débit de la colonne est de 40 ml/heure et des fractions de 5.3 ml sont collectées.

FIGURE 5-B ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES FRACTIONS DE LA FIGURE 5-A (PROTEINES D'*Agrobacterium tumefaciens*) SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU DODECYLSULFATE DE SODIUM

L'électrophorèse a été effectuée sur plaque de gel de polyacrylamide en milieu dodécylsulfate de sodium dans les conditions décrites dans la légende de la figure 4-B.

Les couloirs 2,3,4 et 5 correspondent respectivement aux fractions 2,3,4 et 5 de la figure 5-A.



B



L'analyse électrophorétique des fractions éluées au cours de cette chromatographie est présentée dans la figure 5-B. La protéine HAT est éluée dans la fraction 4 avec une molarité en NaCl de l'ordre de 200 mM. Les principaux contaminants de la protéine HAT ont une masse moléculaire comprise entre 24.000 et 28.000. La fraction 5 éluée à une molarité en NaCl de 2M est très hétérogène. Notons la présence dans cette fraction d'une protéine de masse moléculaire 16.000 dont nous reparlerons plus loin.

II - 2-1-2-3 Préparation de la protéine HR1-18 de
R. leguminosarum L18

Le diagramme d'élution obtenu lors de la préparation des protéines de *Rhizobium leguminosarum* L18 par chromatographie d'affinité sur colonne de DNA-cellulose est présenté dans la figure 6-A.

L'analyse électrophorétique des fractions éluées lors de cette chromatographie est présentée dans la figure 6-B. La protéine HR1-18 est éluée dans les fractions 4 et 5 avec une molarité en NaCl comprise entre 150 et 200 mM. Dans la fraction 4 la protéine HR1-18 représente le constituant majeur, tandis que dans la fraction 5 elle est éluée avec une protéine de masse moléculaire d'environ 24.000. Dans la fraction 6 éluée par NaCl 2M, nous retrouvons essentiellement trois protéines de masse moléculaire 16.000, 40.000 et 42.000.

FIGURE 6-A FRACTIONNEMENT DES PROTEINES SE LIANT AU DNA DE *R. leguminosarum* L18 PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE DNA-CELLULOSE

La colonne (2.5x20cm) de DNA de *R. meliloti* couplé à la cellulose est équilibrée avec le tampon T-50.

La fraction 1 correspond au matériel non retenu sur la colonne.

Les fractions 2 et 3 sont éluées par le tampon T-100.

Les fractions 4 et 5 sont éluées par un gradient linéaire de molarité en NaCl (100-300 mM) obtenu avec les tampons T-100 et T-300 (2 x 125 ml).

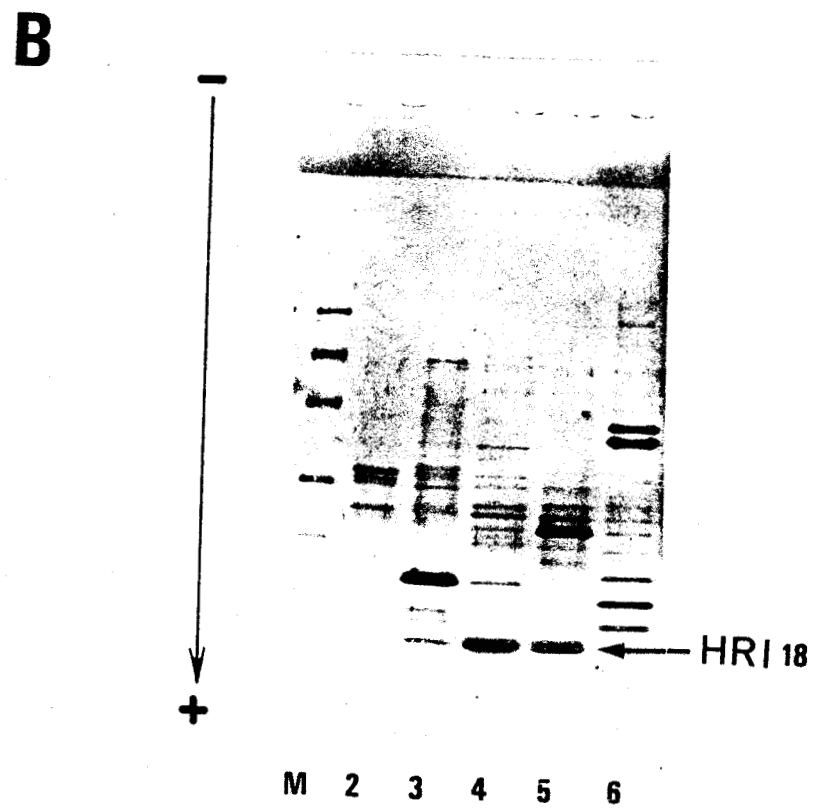
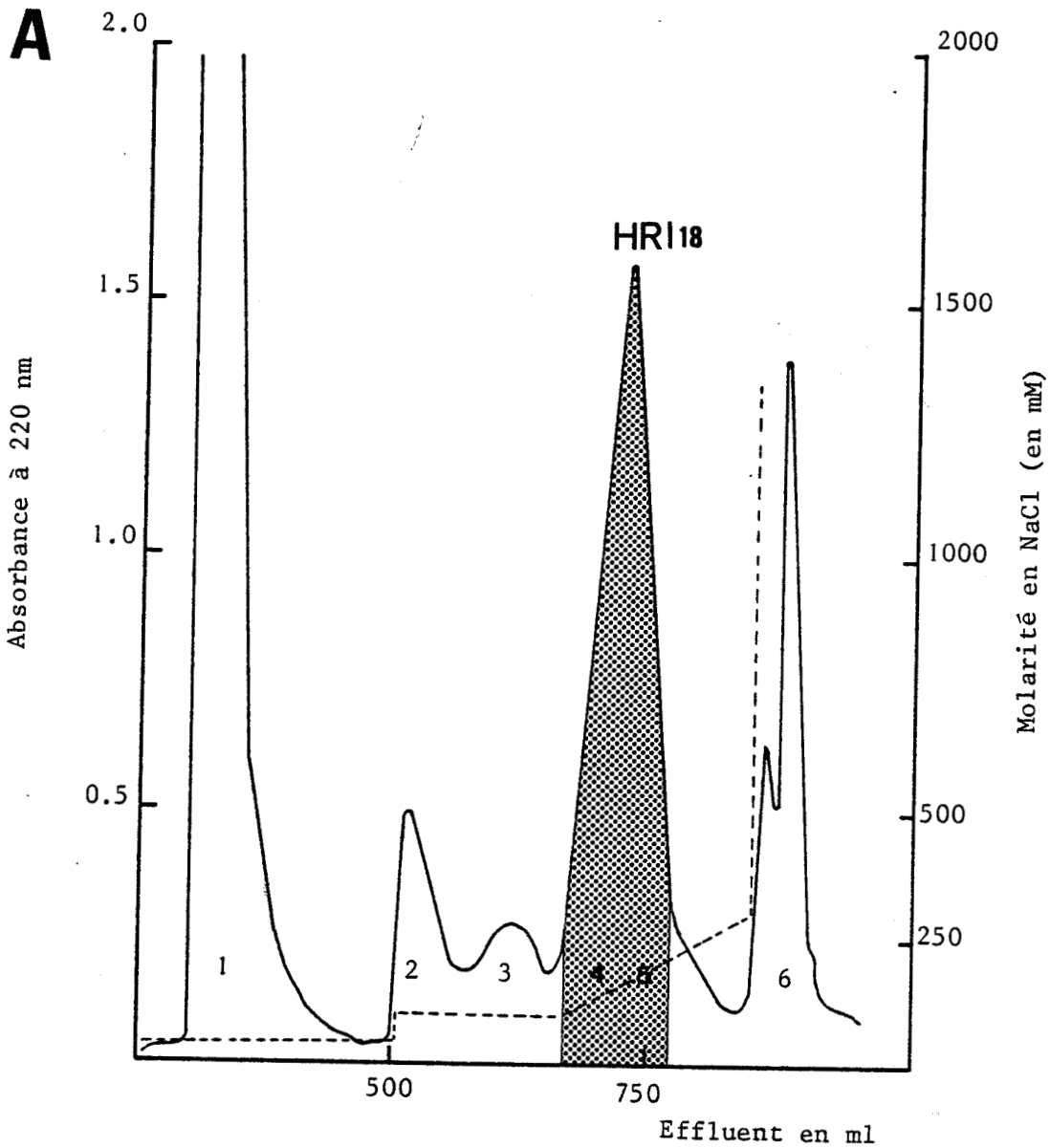
La fraction 6 est éluée par le tampon T-2000.

Le débit de la colonne est de 44 ml/heure et des fractions de 5.8 ml sont collectées.

FIGURE 6-B ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES FRACTIONS DE LA FIGURE 6-A (PROTEINES DE *R. leguminosarum* L18)

L'électrophorèse est effectuée sur plaque de gel de polyacrylamide en milieu dodécylsulfate de sodium dans les conditions décrites dans la légende de la figure 4-B.

Les couloirs 2,3,4,5 et 6 correspondent respectivement aux fractions 2,3,4,5 et 6 de la figure 6-A



II - 2-1-2-4 Préparation de la protéine HR1-53 de
R. leguminosarum L53

Le diagramme d'élution obtenu lors de la préparation des protéines de *Rhizobium leguminosarum* L53 par chromatographie d'affinité sur colonne de DNA-cellulose est présenté dans la figure 7-A. Le contrôle électrophorétique des fractions éluées au cours de cette chromatographie est présenté dans la figure 7-B.

La protéine HR1-53 est éluée dans les fractions 3 et 4 par une molarité en NaCl de l'ordre de 170 mM. Dans ces fractions la protéine HR1-53 est contaminée par des protéines de masse moléculaire de l'ordre de 25.000. Les fractions 2 et 6 sont très hétérogènes. Une protéine de masse moléculaire 16.000 est éluée dans la fraction 5 par NaCl 0.5 M. Nous avons obtenu une quantité insuffisante de matériel pour purifier et analyser cette protéine. Il aurait été intéressant de voir si cette protéine correspond à la protéine chromosomale H1 de *E. coli* (voir tableau III, page 41) dont la masse moléculaire est égale à 16.000 et qui est éluée de la colonne de DNA-cellulose par NaCl 0.5 M.

Lors de la chromatographie des protéines de *A. tumefaciens* et de *R. leguminosarum* L18 l'étape d'élution à 0.5 M NaCl a été omise et nous retrouvons dans la fraction éluée par NaCl 2M une protéine de taille moléculaire égale à 16.000. La caractérisation de la protéine de masse moléculaire 16.000 isolée d'*Agrobacterium tumefaciens* est actuellement en cours.

FIGURE 7-A FRACTIONNEMENT DES PROTEINES SE LIANT AU DNA DE *Rhizobium leguminosarum* L53 PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE DNA-CELLULOSE

La colonne (2.5x20cm) de DNA de *R. meliloti* couplé à la cellulose est équilibrée avec le tampon T-50.

La fraction 1 correspond au matériel non retenu sur la colonne.

La fraction 2 est éluée par le tampon T-100.

Les fractions 3 et 4 sont éluées par un gradient linéaire de molarité en NaCl (100 mM - 300 mM) obtenu avec les tampons T-100 et T-300 (2 x 150 ml).

La fraction 5 est éluée par le tampon T-500.

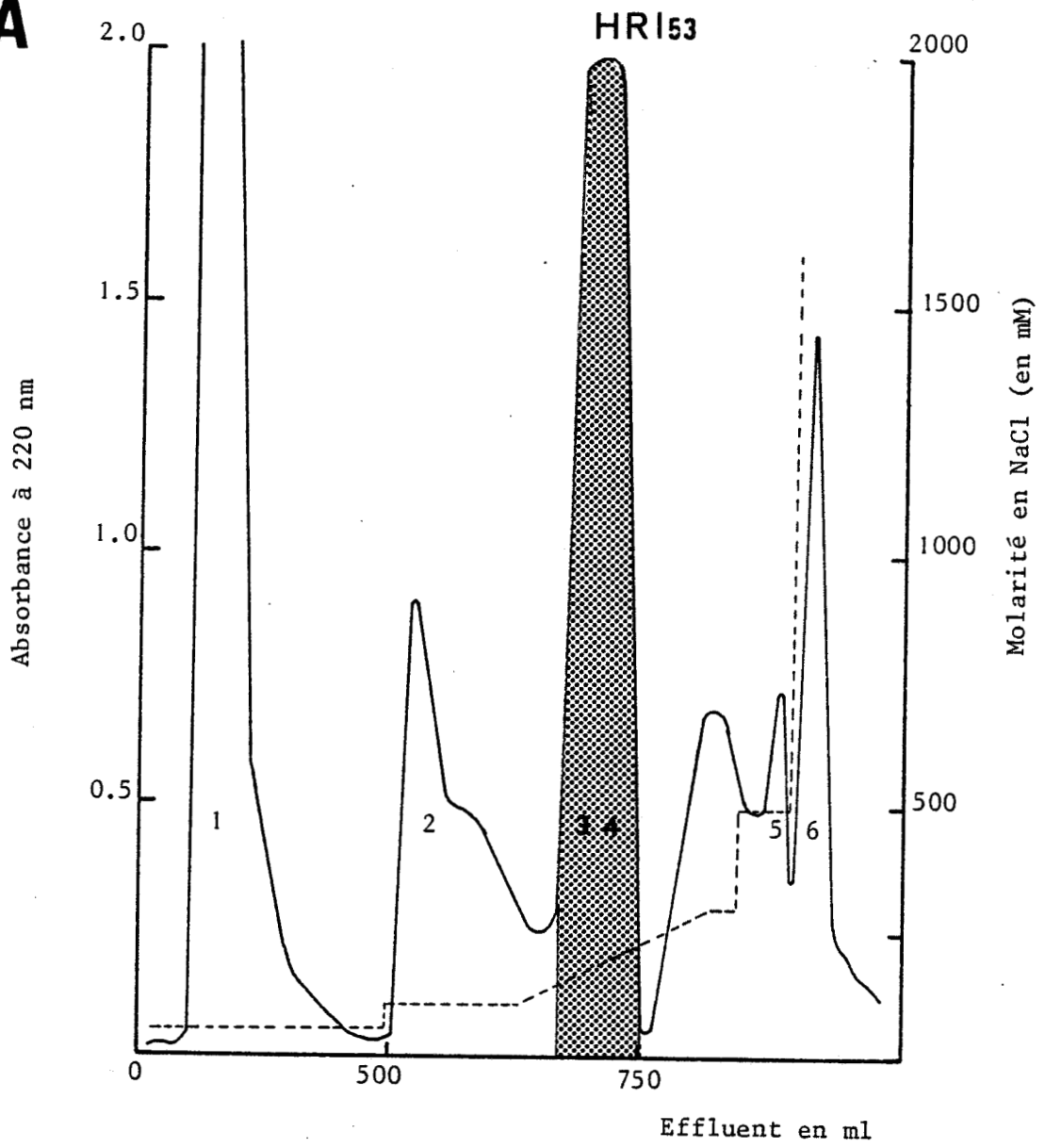
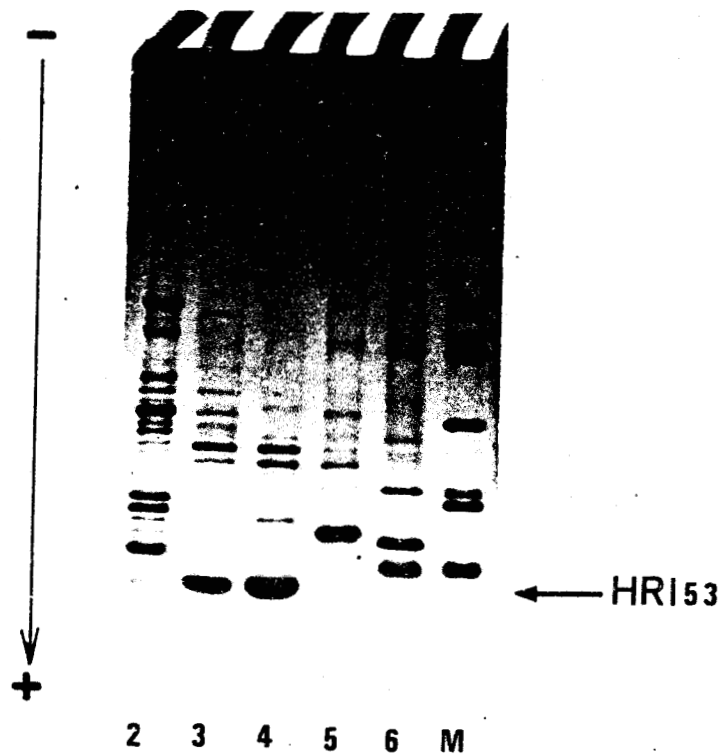
La fraction 6 est éluée par le tampon T-2000.

Le débit de la colonne est de 44 ml/heure et des fractions de 5.8 ml sont collectées.

FIGURE 7-B ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES FRACTIONS DE LA FIGURE 7-A (PROTEINES SE LIANT AU DNA DE *R. leguminosarum* L53)

L'électrophorèse est effectuée sur plaque de gel de polyacrylamide en milieu dodécylsulfate de sodium dans les conditions décrites dans la légende de la figure 4-B.

Les couloirs 2,3,4,5 et 6 correspondent respectivement aux fractions 2,3,4,5 et 6 de la figure 7-A.

A**B**

II - 2-1-2-5 Préparation de la protéine HRj de *R. japonicum*

Le diagramme d'élution obtenu lors de la séparation des protéines se liant au DNA de *Rhizobium japonicum* J5 par chromatographie d'affinité sur colonne de DNA-cellulose est présenté dans la figure 8-A.

L'analyse électrophorétique des fractions éluées au cours de cette chromatographie est présentée dans la figure 8-B. La majeure partie de la protéine HRj est éluee dans la fraction 5 par une molarité en NaCl de 250 mM.

Dans les fractions 4 et 6, la protéine HRj est contaminée par des protéines de masse moléculaire supérieure ou égale à 18.000.

II - 2-2 Purification des protéines de type HU

Les protéines HRm, HAt, HR1-18, HR1-53 et HRj éluées de la colonne de DNA-cellulose sont contaminées par des composants de taille moléculaire élevée. Nous avons éliminé ces composants par chromatographie de gel filtration sur une colonne de Sephadex G-100 éluee par HCl 0.01 M.

Le diagramme d'élution obtenu lors de la purification de la protéine HRm est présenté dans la figure 9-A.

FIGURE 8-A FRACTIONNEMENT DES PROTEINES SE LIANT AU DNA DE *R.japonicum* PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE DNA-CELLULOSE

La colonne (2.5x20cm) de DNA de *R.meliloti* couplé à la cellulose est équilibrée avec le tampon T-50.

La fraction 1 correspond au matériel non retenu sur la colonne.

La fraction 2 est éluée par le tampon T-100.

Les fractions 3,4,5 et 6 sont éluées par un gradient linéaire de molarité en NaCl (100 mM - 400 mM) obtenu avec les tampons T-100 et T-400 (2 x 250 ml).

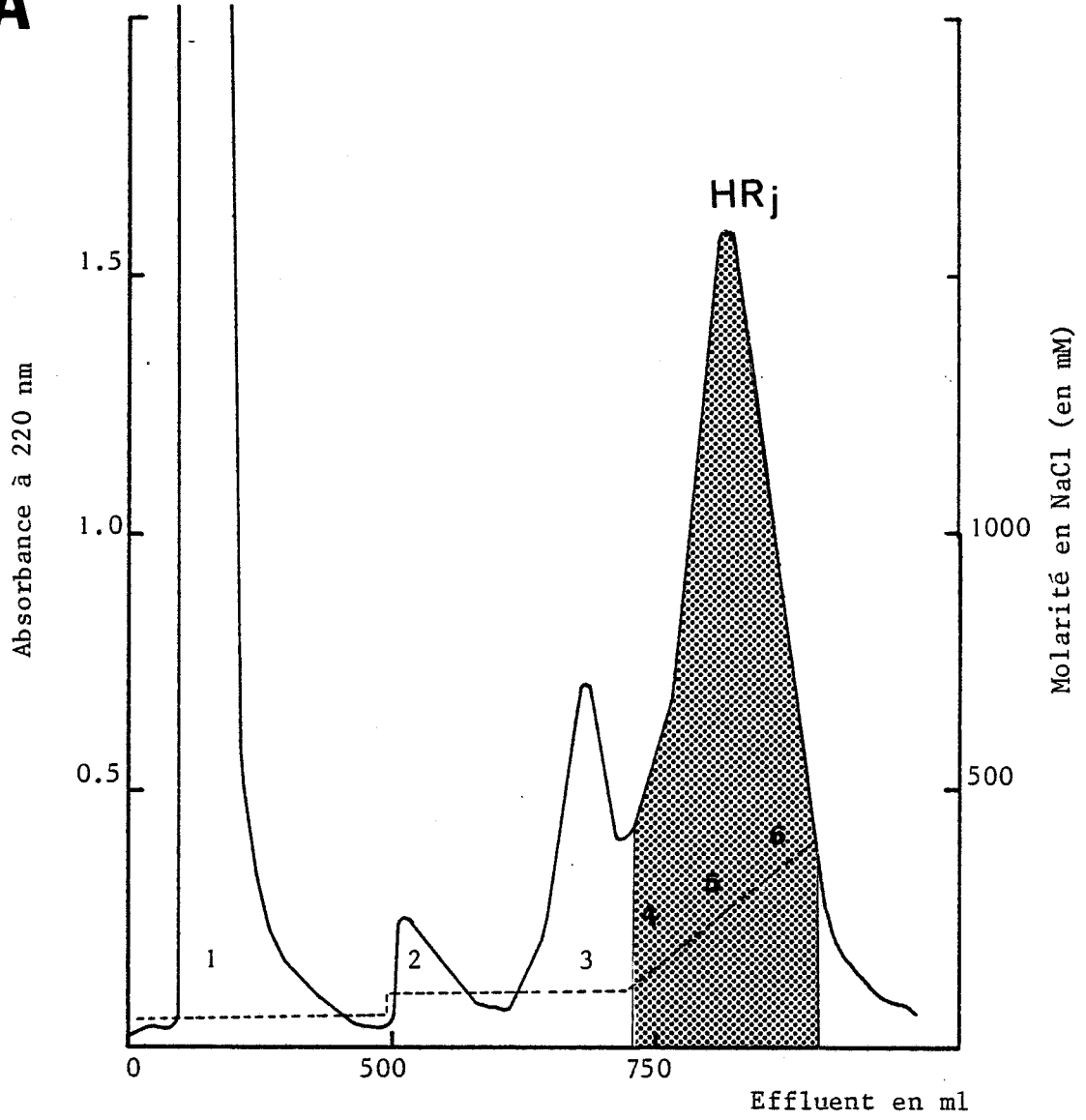
Le débit de la colonne est de 41 ml/heure et des fractions de 5.5 ml sont collectées.

FIGURE 8-B ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES FRACTIONS DE LA FIGURE 8-A (PROTEINES SE LIANT AU DNA DE *R.japonicum*)

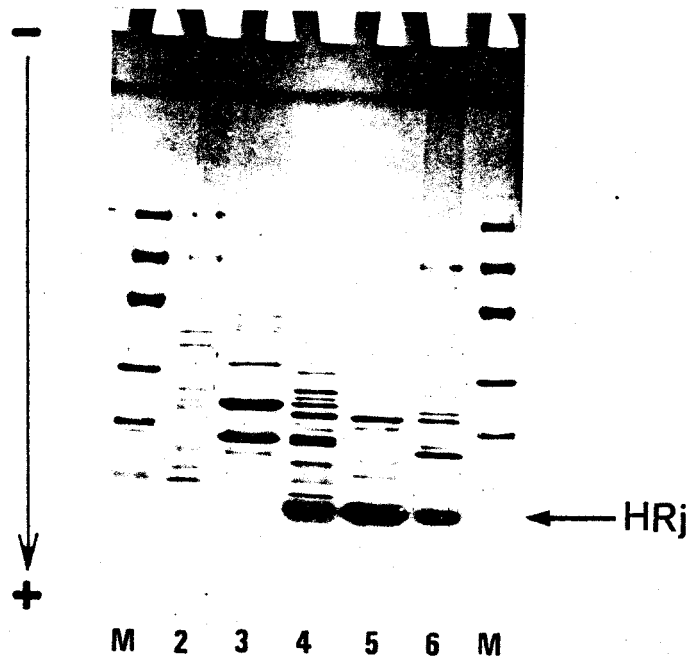
L'électrophorèse est effectuée sur gel de polyacrylamide en milieu dodécylsulfate de sodium dans les conditions décrites dans la légende de la figure 4-B.

Les couloirs 2,3,4,5 et 6 correspondent respectivement aux fractions 2,3,4,5 et 6 de la figure 8-A.

A



B



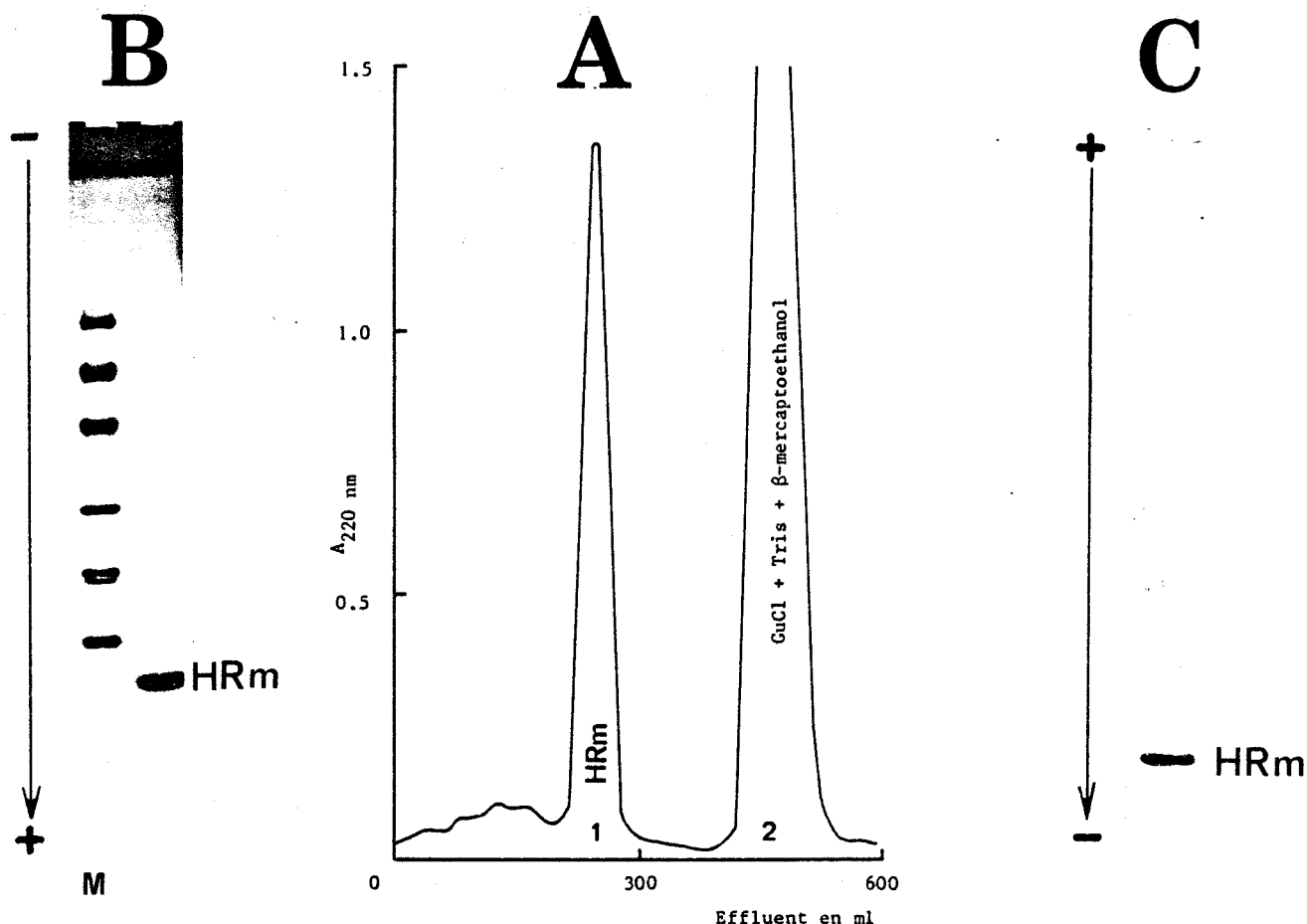


FIGURE 9 PURIFICATION DE LA PROTEINE HRm PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION

A - Chromatographie : la protéine HRm dissoute dans un tampon Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0, GuCl 6M, 2-mercaptoéthanol 5 p.100 (7 mg/0.7 ml) est laissée 48 heures à température ambiante. Après addition de 0.3 ml d'HCl 0.01 M et centrifugation à 4000 g pendant 10 minutes, la solution de protéine est déposée sur une colonne (90x1.6cm) de Sephadex G-100. La colonne est équilibrée et éluée avec HCl 0.01 N saturé de chloroforme. Le débit est de 4 ml/heure et des fractions de 3 ml sont collectées.

B - Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en milieu dodécylsulfate de sodium de la fraction 1 (Figure 9-A). Les conditions d'électrophorèse sont indiquées dans la figure 4-B.

C - Analyse électrophorétique de la fraction 1 (figure 9-A) sur gel de polyacrylamide en milieu acide acétique 0.9 M et en présence d'urée 2.5 M. Les conditions sont indiquées dans la figure 12 page 73.

La protéine HRm, éluée dans la fraction 1 apparaît pure en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dodécylsulfate de sodium (Figure 9-B) et en milieu acide acétique 0.9 M en présence d'urée 2.5 M (Figure 9-C).

Des résultats identiques ont été obtenus lors de la purification des protéines HAt, HRl-18, HRl-53 et HRj et nous n'avons pas jugé utile de présenter les diagrammes d'élution de ces protéines.

II - 2-3 Séparation des protéines HRj-1 et HRj-2 de *Rhizobium japonicum*

La protéine HRj purifiée par chromatographie de gel filtration apparaît homogène après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dodécylsulfate de sodium. Par contre sur gel de polyacrylamide en milieu urée 2.5 M, acide acétique 0.9 M on observe pour cette protéine deux bandes distinctes (Figure 10-B, couloir 1) qui correspondent à deux variants HRj-1 et HRj-2. Les protéines HRj-1 et HRj-2 ont été séparées par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de carboxyméthyl-cellulose en utilisant un gradient linéaire croissant de molarité en NaCl dans un tampon acétate de sodium 0.01 M de pH 5.6 et en présence d'urée 6M.

Les protéines HRj-1 et HRj-2 sont respectivement éluées dans les fractions 1 et 2 (Figure 10-A). Elles apparaissent homogènes après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu urée 2.5 M, acide acétique 0.9 M (Figure 10-B).

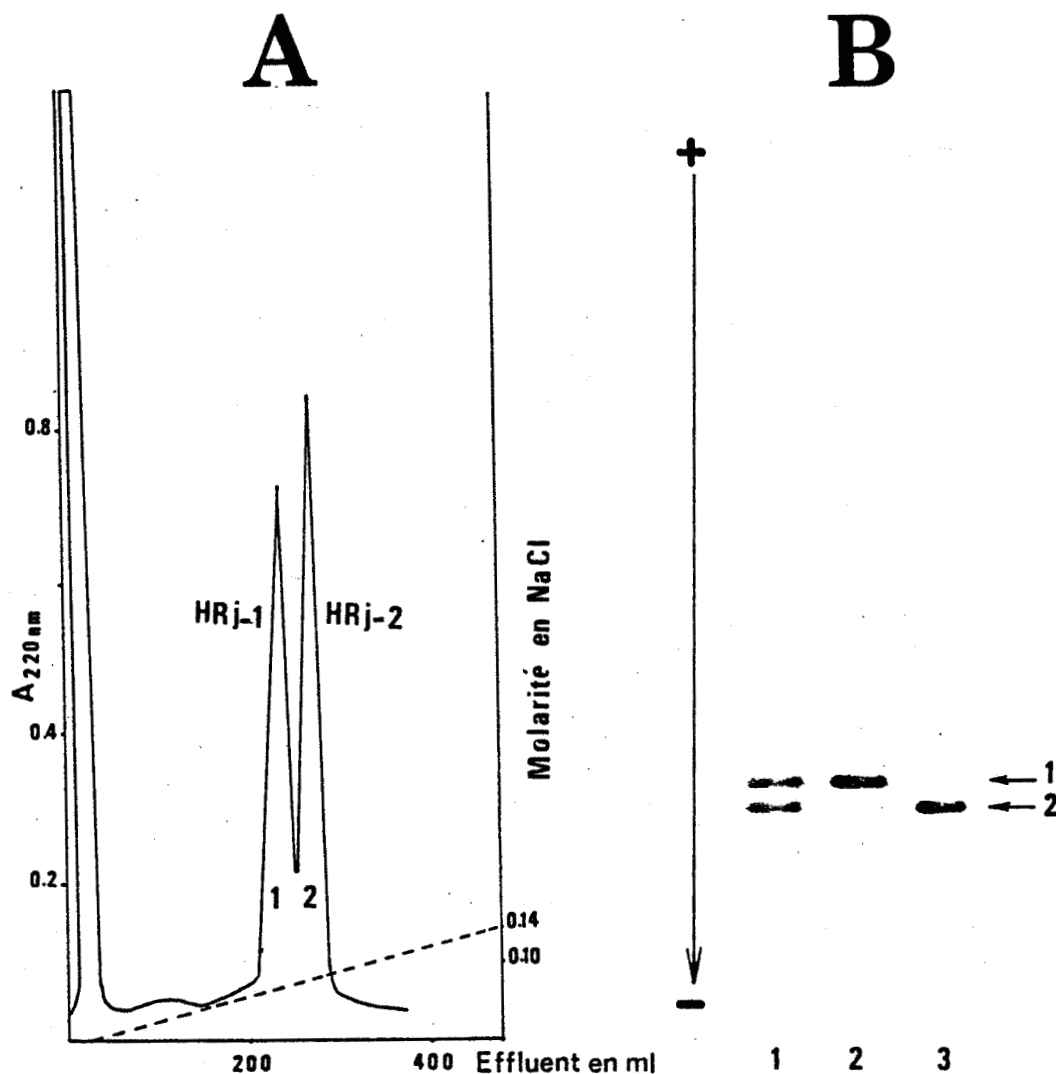


FIGURE 10-A SEPARATION DES PROTEINES HRj-1 ET HRj-2 PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE CARBOXYMETHYL-CELLULOSE

La protéine HRj (8 mg) est dissoute dans 1 ml d'acétate de sodium 0.1 M, pH 5.6 contenant de l'urée 8M et 5 p.100 de 2-mercaptoéthanol. Après 48 heures, elle est déposée sur une colonne de carboxyméthyl-cellulose (22x1.2cm) équilibrée en milieu acétate de sodium 0.01 M, pH 5.6, contenant de l'urée 6M. Les protéines sont éluées par un gradient linéaire de NaCl (0 - 140 mM) (2 x 300 ml) dans le tampon d'équilibration. Le débit de la colonne est de 13 ml/heure. Des fractions de 4,3 ml sont collectées.

FIGURE 10-B CONTROLE ELECTROPHORETIQUE DES FRACTIONS OBTENUES LORS DE LA SEPARATION DES PROTEINES HRj-1 et HRj-2

1, protéine HRj ; 2, protéine HRj-1 ; 3, protéine HRj-2. Les conditions d'électrophorèse effectuée sur gel de polyacrylamide en milieu acide acétique 0.9 M - urée 2.5 M sont indiquées dans la légende de la figure 12.

II - 3 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTEINES DE TYPE HU

L'étude des propriétés physico-chimiques des protéines de type HU isolées de différentes souches de *Rhizobiaceae* est présentée dans les publications 1 et 2 pages 84 et 107.

Nous en rappellerons les principaux résultats.

II - 3-1 Comportement électrophorétique sur gel de polyacrylamide

Le comportement électrophorétique sur gel de polyacrylamide des protéines de type HU isolées des *Rhizobiaceae* a été étudiée dans trois systèmes différents :

A - en présence de dodécylsulfate de sodium

B - en milieu acide acétique 0.9 M et en présence d'urée
2.5 M

C - en milieu acide acétique 0.9 M et en présence d'urée
6M et de triton X-100.

Les diagrammes électrophorétiques dans les systèmes A, B et C sont présentés respectivement dans les figures 11, 12 et 13.

Dans le système A toutes les protéines donnent une seule bande et ont une migration identique à l'exception de la protéine HRj qui migre légèrement moins vite que les autres. A

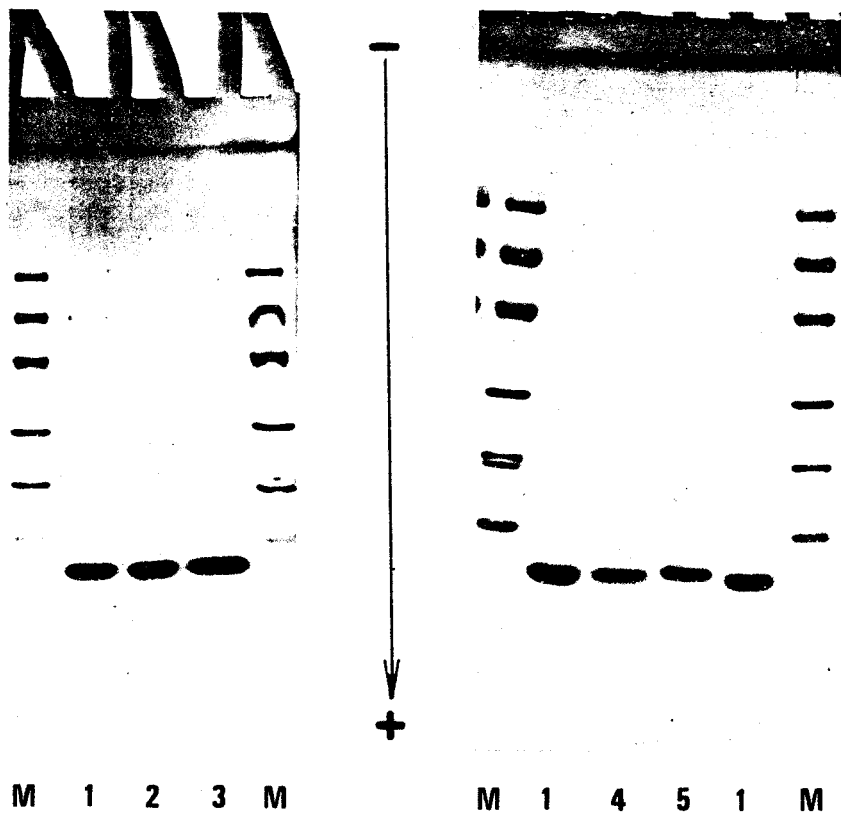


FIGURE 11 COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES DE TYPE HU SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE DODECYLSULFATE DE SODIUM

M : témoins de masse moléculaire (voir figure 5)

1 : protéine HRm

2 : protéine HR1-18

3 : protéine HR1-53

4 : protéine HAt

5 : protéine HRj

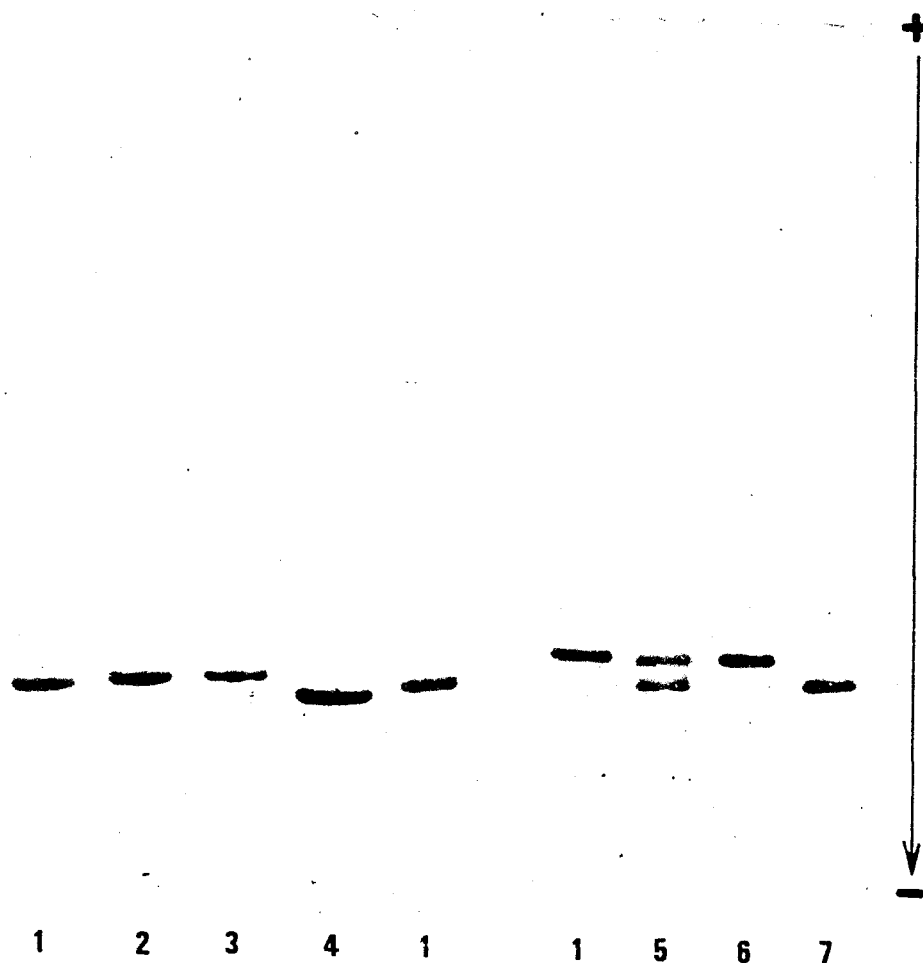


FIGURE 12 COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES DE TYPE HU SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU ACIDE ACETIQUE 0.9 M ET EN PRESENCE D'UREE 2.5 M

1 , protéine HRm ; 2, protéine HAt ; 3, protéine HRl-18 ; 4, protéine HRl-53 ; 5, protéine HRj ; 6, protéine HRj-1 ; 7, protéine HRj-2.

L'électrophorèse est effectuée sur une plaque de gel (150x140x75 mm) contenant 17 p.100 d'acrylamide. Les échantillons sont dissous dans HCl 0.01M, contenant de l'urée 8M et du 2-mercaptoéthanol 0.5M. L'électrophorèse est effectuée sous une intensité de 22 mA pendant 3 heures. Les gels sont colorés et décolorés suivant le protocole décrit dans la légende de la figure 4-B pour les gels contenant du SDS.

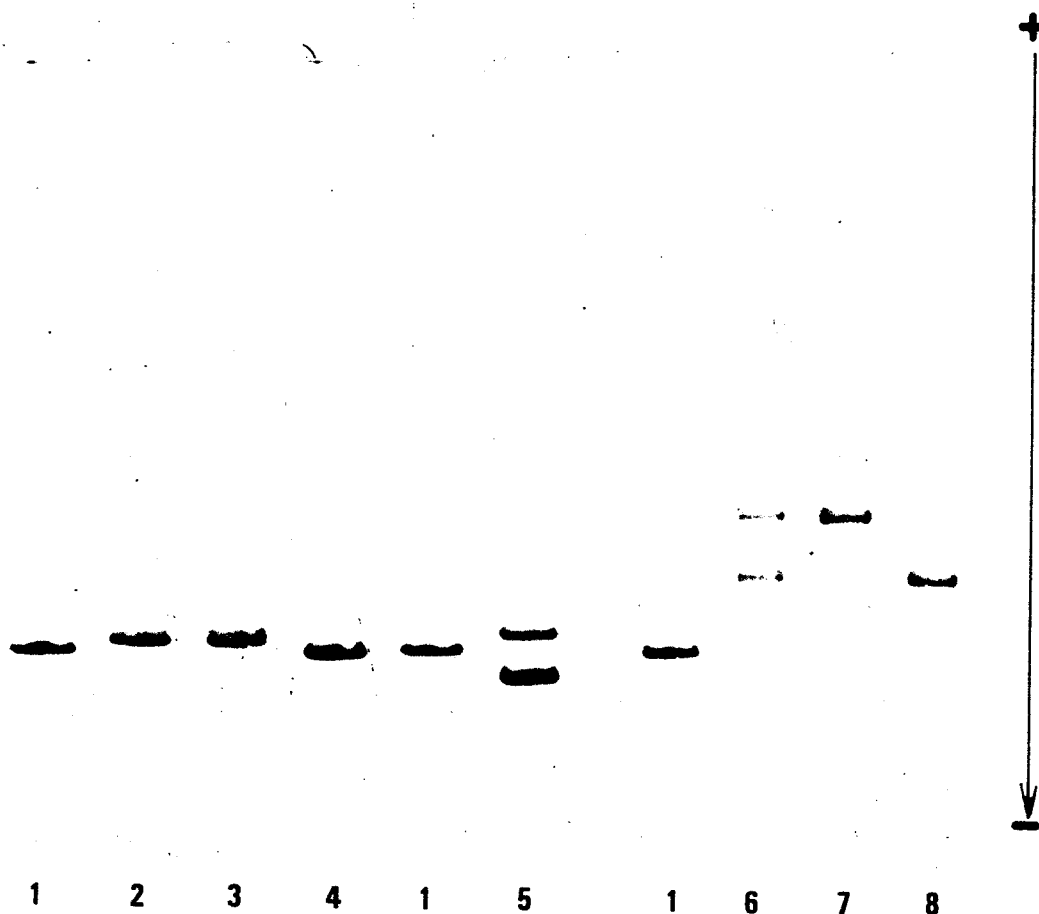


FIGURE 13 COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES DE TYPE HU SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU ACIDE ACETIQUE 0.9 M ET EN PRESENCE D'UREE 6M ET DE TRITON X-100

1, protéine HRm ; 2, protéine HAt ; 3, protéine HR1-18 ; 4, protéine HR1-53 ; 5, protéine HU ; 6, protéine HRj ; 7, protéine HRj-1 ; 8, protéine HRj-2.

Les conditions d'électrophorèse ne diffèrent de celles présentées dans la figure 12 que par la présence d'une quantité supérieure d'urée et la présence de triton X-100 dans le gel. Les conditions de coloration et de décoloration sont identiques à celles indiquées dans la figure 5.

partir de leur migration sur ce gel la masse molaire relative (M_r) de ces protéines est estimée à 10.000. Ce résultat est en accord avec la masse molaire relative calculée soit à partir de la composition en acides aminés (voir paragraphe II - 3-3), soit à partir des données structurales obtenues sur ces protéines (voir chapitre III).

En milieu acide (systèmes B et C) la protéine HR1-18 a une migration électrophorétique identique à celle de la protéine HAt tandis que la protéine HR1-53 a une migration nettement plus cathodique. Les protéines HRm, HAt, HR1-18 et HR1-53 ne donnent qu'une seule bande en présence d'urée 6M et de triton X-100. Ce résultat indique que chacune de ces quatre protéines est constituée d'une seule chaîne polypeptidique. Ceci a été confirmé par les études structurales présentées dans le chapitre III (publications 2 et 3).

La protéine HRj donne dans les deux systèmes électrophorétiques en milieu acide deux bandes qui correspondent aux protéines HRj-1 et HRj-2. En présence d'urée 2.5 M, la protéine HRj-2 a une migration supérieure à celle de la protéine HRj-1 qui elle-même migre comme la protéine HRm. Les protéines HRj-1 et HRj-2 se différencient nettement des protéines homologues isolées des autres bactéries par leur comportement en présence d'urée 6M et de triton X-100. Leur migration électrophorétique dans ce système est en effet très inférieure à celles des autres protéines de type HU.

II - 3-2 Propriétés immunologiques

Nous avons recherché si les protéines de type HU isolées des différentes souches de *Rhizobiaceae* présentent avec la protéine HRm une communauté antigénique. Cette recherche a été effectuée en utilisant le test d'immunodiffusion en gel d'agar selon la méthode de OUCHTERLONY. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 14. Les protéines HAt et HR1-18 réagissent très bien contre les immunoglobulines anti-protéine HRm tandis que la protéine HR1-53 donne un arc de précipitation beaucoup plus faible contre ces mêmes anticorps. Ces résultats indiquent que les protéines HAt et HR1-18 ont des sites antigéniques très peu différents sinon identiques à ceux de la protéine HRm. Ils suggèrent en outre que les protéines HRm, HAt et HR1-18 présentent de grandes homologues. Par contre la faible réaction d'immunoprécipitation entre la protéine HR1-53 et les immunoglobulines anti-protéine HRm suggère des différences structurales importantes, au moins au niveau des sites antigéniques, entre la protéine HR1-53 et la protéine HRm. L'étude structurale de la protéine HR1-53 a permis de confirmer cette hypothèse (chapitre III).

La protéine HRj réagit très faiblement contre les immunoglobulines anti-protéine HRm. Aucun arc de précipitation n'a été observé avec la protéine HRj lorsque celle-ci est déposée à 8 mm du puits central contenant les immunoglobulines anti-protéine HRm comme cela a été effectué pour les autres protéines de type HU. Pour obtenir avec la protéine HRj l'arc de

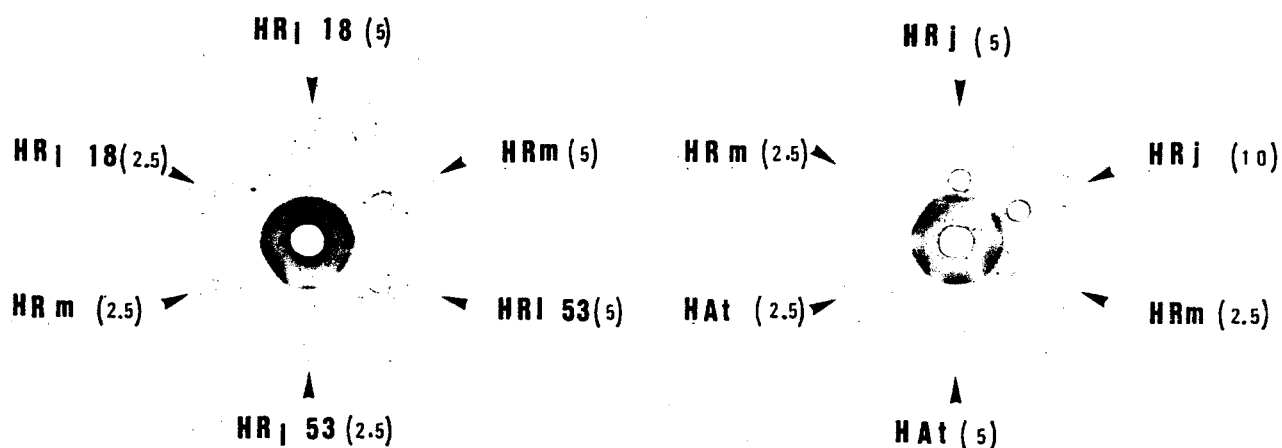


FIGURE 14 PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DES PROTEINES HRm, HAt, HR1-18, HR1-53 ET HRj

Le test de OUCHTERLONY est effectué sur gel d'agar à 0.9 p.100 en tampon phosphate, pH 7.4.

Les puits centraux contiennent 450 μ g d'immunoglobulines anti-protéine HRm.

Les puits périphériques distants de 8 mm du puits central contiennent 5 μ l des solutions protéiques.

Les chiffres placés entre parenthèses indiquent les quantités en μ g des protéines déposées.

Les puits périphériques contenant la protéine HRj sont distants de 7 mm du puits central.

Après 15 heures de diffusion à température du laboratoire et en atmosphère saturée d'eau, le gel est coloré par le bleu de Coomassie R250 à 5 p.100 (p:v) dans le mélange éthanol-acide acétique-eau (9:2:9, v/v/v) puis décoloré par le mélange de solvant utilisé pour la coloration.

précipitation présenté dans la figure 14 nous avons réduit à 7 mm la distance entre les puits périphériques et le puits central et nous avons doublé la quantité de protéine HRj.

Ces résultats indiquent que les sites antigéniques de la protéine HRj sont très différents de ceux de la protéine HRm. La protéine HRj apparaît être encore plus différente des protéines HRm, HAt et HR1-18 que ne l'est la protéine HR1-53.

II - 3-3 Composition en acides aminés

Les compositions en acides aminés des protéines HRm, HAt, HR1-18, HR1-53, HRj-1 et HRj-2 sont présentées dans le tableau VI.

La protéine HRm a 90 résidus tandis que les protéines HAt, HR1-18 et HR1-53 ont chacune 91 résidus. Les protéines HRj-1 et HRj-2 possèdent 92 résidus. Les masses moléculaires relatives de ces protéines déterminées à partir de leurs compositions en acides aminés sont très voisines et sont comprises entre 9.311 et 9.818. Ces résultats confirment les données de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

La comparaison des compositions de ces protéines fait ressortir les caractéristiques générales suivantes :

TABLEAU VI

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PROTEINES DE TYPE HU DES
DIFFERENTES SOUCHES DE *Rhizobiaceae*

	HRm	HAt	HRI-18	HRI-53	HRj-1	HRj-2
Acide aspartique	13	11	11	12	11	11
Thréonine	3	3	3	5	4	4
Sérine	7	10	10	6	3	3
Acide glutamique	6	7	7	5	10	10
Proline	3	3	3	4	3	3
Glycine	10	9	9	9	7	7
Alanine	13	14	14	14	15	15
Cystéine/2	0	0	0	0	0	0
Valine	9	9	9	10	7	7
Méthionine	1	1	1	1	1	1
Isoleucine	3	2	2	2	5	5
Leucine	5	5	5	5	6	6
Tyrosine	0	0	0	0	0	0
Phénylalanine	4	4	4	4	4	4
Histidine	0	0	0	1	0	0
Lysine	8	8	8	9	12	12
Arginine	5	5	5	4	4	4
Tryptophane	0	0	0	0	0	0
Total	90	91	91	91	92	92
Mr calculée	9311	9372	9372	9388	9818	9818

Les résultats sont exprimés en nombre de résidus par mole de protéine. Le nombre de résidus a été calculé sur la base de quatre résidus de phénylalanine et les valeurs obtenues ont été arrondies à l'entier le plus proche.

- Elles sont dépourvues de cystéine, tyrosine, histidine et tryptophane à l'exception de la protéine HR1-53 qui possède un résidu d'histidine.

- Elles sont riches en résidus hydrophobes dont le nombre varie de 35 pour la protéine HRm à 38 pour la protéine HRj. L'alanine est le résidu le plus abondant dans toutes les protéines.

- Le nombre de certains résidus est invariable ou varie très peu tandis que celui d'autres résidus varie beaucoup d'une protéine à l'autre. Ainsi le nombre de résidus de méthionine et de phénylalanine est identique dans toutes les protéines et celui des résidus de proline, alanine, leucine et arginine est peu variable. Par contre le nombre de résidus de sérine, d'acide glutamique et d'isoleucine est très différent d'une protéine à l'autre.

La comparaison de la composition en acides aminés de ces protéines permet également de faire les remarques suivantes :

- Les protéines HAt et HR1-18 ont une composition en acides aminés identique. La composition de ces deux protéines présente une forte similitude avec celle de la protéine HRm notamment au niveau des résidus basiques et hydrophobes. Les différences les plus marquées entre la protéine HRm et les deux autres protéines sont observées au niveau de la sérine et de l'acide aspartique.

- A l'inverse la composition en acides aminés de la protéine HR1-53 diffère davantage de celle des protéines HRm, HAt et HR1-18. Nous remarquons surtout entre les protéines HR1-18 et

HR1-53 des variations significatives du nombre de résidus d'acides aminés hydroxylés (thréonine et sérine) ainsi que des résidus d'acide glutamique. De plus la présence d'un résidu d'histidine et de quatre résidus de proline distingue nettement la protéine HR1-53, de ses homologues. En effet, des changements au niveau de ces deux acides aminés sont très significatifs dans la mesure où le taux de proline des protéines de type HU est très peu variable et la présence d'un résidu d'histidine n'est que rarement rencontrée dans cette famille de protéines comme nous le verrons ultérieurement (chapitre III).

- Les compositions en acides aminés des protéines HRj-1 et HRj-2 sont identiques. Elles se différencient nettement de celles des protéines HRm, HAt, HR1-18 et HR1-53 par des variations importantes du nombre de résidus de sérine, acide glutamique, valine, isoleucine et lysine. En effet, par rapport aux autres protéines les protéines HRj-1 et HRj-2 sont plus riches en acide glutamique, isoleucine et lysine, et le nombre de résidus de sérine et de valine est plus faible.

II - 3-4 Discussion

L'étude de la mobilité électrophorétique sur gel de polyacrylamide en milieu acide, de la réactivité immunologique vis-à-vis des immunoglobulines anti-protéine HRm et de la composition en acides aminés des protéines HRm, HAt, HRl-18, HRl-53, HRj-1 et HRj-2 a permis de faire ressortir les caractéristiques suivantes :

- Les protéines HRl-18 et HAt présentent entre elles une très étroite similitude. En effet sur la base des critères étudiés aucune différence n'a été observée entre ces deux protéines. Celles-ci présentent une ressemblance marquée avec la protéine HRm : elles réagissent très bien avec les immunoglobulines anti-protéine HRm et leur composition en acides aminés ne montrent que des différences mineures avec celle de la protéine HRm.

- Par contre la protéine HRl-53 diffère significativement des protéines citées ci-dessus en particulier par ses propriétés immunologiques et sa composition en acides aminés.

- Les protéines HRj-1 et HRj-2 se différencient encore plus nettement des protéines isolées des souches à croissance rapide. Par rapport à ces dernières leur migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide en présence de triton X-100 est beaucoup plus faible, elles présentent de nombreuses différences dans leur composition en acides aminés. Enfin, la protéine HRj réagit beaucoup plus faiblement que ses homologues contre les immunoglobulines anti-protéine HRm.

Les propriétés physico-chimiques des protéines de type HU isolées des bactéries qui ont fait l'objet de notre étude reflètent parfaitement la position de ces microorganismes dans le dendrogramme établi à partir des études de taxonomie numérique réalisées au laboratoire et présenté dans la figure 2.

Nos résultats confirment notamment que :

- *Agrobacterium tumefaciens* est étroitement apparenté aux *Rhizobiaceae* et en particulier au groupe auquel appartient *Rhizobium leguminosarum* L18.

- Le taxon *Rhizobium leguminosarum* est hétérogène et les espèces *Rhizobium leguminosarum* L18 et *Rhizobium leguminosarum* L53 appartiennent à deux groupes distincts.

- Les *Rhizobium* à croissance lente sont très éloignés des *Rhizobium* à croissance rapide.

Les conclusions que nous avons tirées de la comparaison des propriétés physico-chimiques des protéines de type HU de *Rhizobiaceae* seront confirmées par les propriétés structurales de ces molécules. Nous développerons dans le chapitre III la discussion abordée ici en l'étendant à des considérations d'ordre phylogénétique que nous pourrons établir à partir des caractéristiques structurales de ces protéines.

Vol. 121, No. 2, 1984
June 15, 1984

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS
Pages 471-477

COMPARATIVE STUDY OF THE DNA-BINDING HU-TYPE PROTEINS
FROM SLOW GROWING AND FAST GROWING STRAINS OF RHIZOBIACEAE

Hussain KHANAKA¹, Bernard LAINE¹, Pierre SAUTIERE¹
and Jean GUILLAUME²

¹Unité Associée au CNRS n° 409, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France

²Laboratoire de Microbiologie, Université des Sciences et Techniques de Lille I,
59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

Received April 12, 1984

SUMMARY.- The DNA-binding HU-type proteins have been isolated from two very different strains of Rhizobiaceae : *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium japonicum*. These proteins have been called HAT and HRj respectively. Their electrophoretic mobility on polyacrylamide gel, amino acid composition and crossed immunoreactivity have been compared to that of the homologous protein isolated from *Rhizobium meliloti* : the protein HRm. The proteins HAT and HRm show close similarities whereas the protein HRj differs markedly from the two others. The physico-chemical characteristics of the HU-type proteins from these Rhizobiaceae are in good agreement with the respective position of these bacteria in the taxonomy.

The *E. coli* DNA-binding protein HU (1) is associated with the chromosomal and extrachromosomal DNA (2, 3) and is assumed to be involved in the condensation of the DNA (4). The protein HU consists of two closely related polypeptide chains termed HU-1 and HU-2 of 90 residues each (5-7). HU-type proteins have been isolated from different bacteria (8-14). We have previously isolated the HU-type protein from *Rhizobium meliloti* (14) and have determined its primary structure (15). The Rhizobiaceae constitute a heterologous family and are traditionally divided into two main groups : the fast growing *Rhizobia* in which the genus *Agrobacterium* is included because of their close taxonomical relationships, and the slow growing *Rhizobia* which are biochemically very different from the former group (for recent review, see ref. 16). This paper deals with the comparison of the physico-chemical characteristics of HU-type proteins isolated from two fast growing strains *Rhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens* and from a slow growing strain *Rhizobium japonicum*.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and nomenclature of proteins.- *Agrobacterium tumefaciens* strain B6 was provided from Rijksuniversiteit Gent (Belgium) ; *Rhizobium japo-*

0006-291X/84 \$1.50

nicum strain J5 was supplied from Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux (Belgium). The bacteria were grown as described in (17). HU-type proteins from *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium japonicum* and *Agrobacterium tumefaciens* are respectively named HRm, HRj and HAt.

Preparation of proteins.— The proteins were prepared by affinity chromatography on DNA-cellulose column as described in (14) with the following modification: *Rhizobium meliloti* DNA, purified as in (18), was coupled to the cellulose. The HU-type proteins were purified by gel filtration chromatography as in (14). Separation of proteins HRj-1 and HRj-2 was performed by chromatography on carboxymethyl-cellulose column as in (7).

Analytical gel electrophoreses.— Analytical gel electrophoreses were performed in three different systems: A, in SDS using the Laemmli buffer system (19) on a slab gel (120 x 80 x 1 mm) (20); B, in 0.9 M acetic acid, 2.5 M urea (21) and C, in 0.9 M acetic acid, 6 M urea and 0.38 % Triton X-100 (22). Electrophoreses at acidic pH (systems B and C) were performed on slab gels (150 x 140 x 0.75 mm) using a 17 % acrylamide concentration.

Amino acid analyses were performed as in (7).

Immunodiffusion.— Rabbit antiserum against *R. meliloti* protein HRm was prepared as in (23). The immunoglobulins were prepared according to (24) and redissolved in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4, 20 % glycerol. Ouchterlony immunodiffusion tests were performed on 0.9 % agar gel in 0.01 M sodium phosphate buffer pH 7.4.

RESULTS AND DISCUSSION

The DNA-binding proteins from *R. japonicum* and from *A. tumefaciens* were prepared by affinity chromatography on *R. meliloti* DNA coupled to cellulose; their elution patterns are presented in fig. 1 in comparison to that of *R. me-*

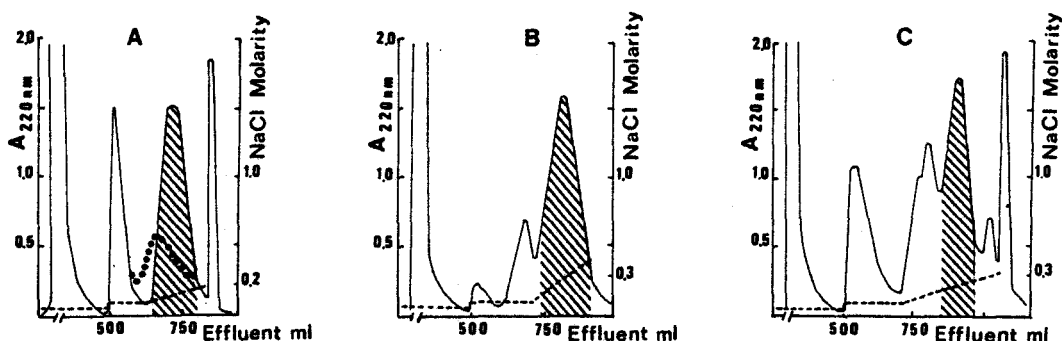


FIGURE 1.— Elution patterns of *R. meliloti*, *R. japonicum* and *A. tumefaciens* proteins (patterns A, B and C, respectively) fractionated on a column of *R. meliloti* DNA coupled to cellulose. Bacterial extracts cleared of membrane fragments and nucleic acids were applied to the column (15 x 2.5 cm) equilibrated with 50 mM NaCl in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM Na₂ EDTA, glycerol 10 % (v:v). The column was eluted at 40 ml/h with a gradient of NaCl in the same buffer as indicated by (---). The effluent was monitored at 220 nm (—) and fractions of 5 ml were collected. Proteins HRm, HRj and HAt were eluted in the hatched fractions. In Fig. 1-A the elution pattern of *R. meliloti* proteins on a chicken erythrocyte DNA (14) is given (●●●) for comparison.

liloti proteins. The protein HRj is desorbed from the DNA-cellulose column at a molarity in NaCl comprised between 0.21 and 0.27 M while the protein HAt is eluted between 0.18 and 0.24 M NaCl. Both proteins bind more tightly to the DNA than protein HRm which is eluted from the same column between 0.12 and 0.18 M NaCl. Identical chromatographic patterns were obtained when the protein HRm was prepared either on *E. coli* DNA-cellulose or on *R. meliloti* DNA-cellulose column (data not shown). From previous experiments performed with DNA-cellulose support prepared with chicken erythrocyte DNA (14) it appears that protein HRm binds more tightly to prokaryotic DNA than to eukaryotic DNA (Fig. 1A).

The protein HAt appears, in the three electrophoretic systems (Fig. 2, A, B and C, lane c), as a single band with a mobility slightly inferior to

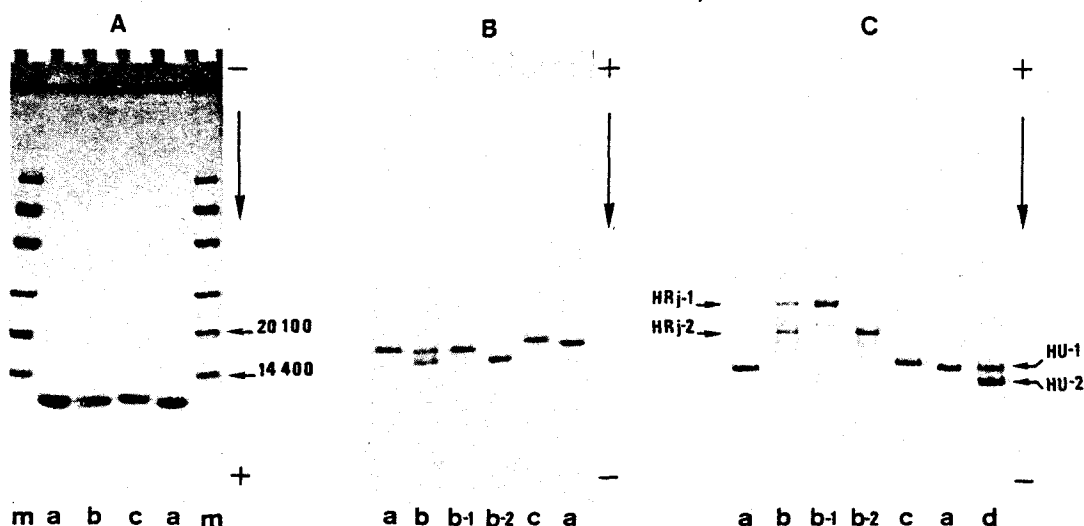


FIGURE 2.- Polyacrylamide gel electrophoresis of purified HU-type proteins : HRm (a), HRj (b), HRj-1(b-1), HRj-2 (b-2), HAt (c) and HU (d). 2-A, in the presence of SDS on a 5-30 % polyacrylamide gradient gel ; 2-B, in 0.9 M acetic acid-2.5 M urea on a gel containing 17 % acrylamide ; 2-C, in 0.9 M acetic acid-6 M urea and 0.38 % Triton X-100 on a gel containing 17 % acrylamide. In the case of Fig. 2-A, samples (7 μ g) were treated with 5 % SDS, 2 % 2-mercaptoethanol for 2 min at 100°C and run at 40 mA for 150 min. Electrode buffer (Tris-glycine, pH 8.6) and gel buffer (Tris-HCl, pH 8.9) were made 0.1 % in SDS. m, molecular mass markers : Phosphorylase b (94,000), Bovine serum albumin (67,000), Ovalbumin (43,000), Carbonic anhydrase (30,000), Soybean trypsin inhibitor (20,100), α -Lactalbumin (14,400). In the case of Fig. 2-B and 2-C, samples (3 μ g) were dissolved in 0.01 M HCl, 8 M urea, 0.5 M 2-mercaptoethanol and were run at 22 mA for 3 h. The gels were stained with 0.5 % Coomassie blue R-250 in acetic acid/ethanol/water (1:2:7, by vol.) for 15 h and were destained by diffusion in acetic acid/ethanol/water (4:5:31, by vol.).

that of protein HRm. The obtention of only one band in the presence of Triton X-100 which allows the separation of the *E. coli* proteins HU-1 and HU-2 (Fig. 2, C lane d), indicates that the protein HAt consists of a single polypeptide chain. With 91 amino acid residues as calculated from its amino acid composition (Table I), the protein HAt has an additional residue with respect to protein HRm. Despite this difference the proteins HAt and HRm appear to be closely related. Their amino acid compositions are very similar: the number of basic and hydrophobic residues (with the exception of isoleucine) are strictly identical and only slight differences are seen for the other residues. Moreover the protein HAt reacts strongly against the anti-protein HRm immunoglobu-

TABLE 1.- AMINO ACID COMPOSITIONS OF PROTEINS HAt, HRj-1 AND HRj-2

	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> HAt		<i>Rhizobium japonicum</i> HRj-1		<i>Rhizobium japonicum</i> HRj-2		<i>Rhizobium meliloti</i> HRm
	Mol %	Residues ^a	Mol %	Residues ^a	Mol %	Residues ^a	Residues ^a
Aspartic acid	11.6	10.6 (11) ^b	12.2	11.2 (11)	12.1	11.1 (11)	13
Threonine ^c	3.0	2.8 (3)	4.6	4.2 (4)	4.6	4.2 (4)	3
Serine ^c	10.8	9.9 (10)	3.5	3.2 (3)	3.5	3.2 (3)	7
Glutamic acid	7.7	7.0 (7)	11.1	10.1 (10)	11.1	10.1 (10)	6
Proline	3.3	3.0 (3)	3.3	3.0 (3)	3.3	3.0 (3)	3
Glycine	9.7	8.8 (9)	7.8	7.2 (7)	7.9	7.3 (7)	10
Alanine	15.4	14.0 (14)	16.1	14.8 (15)	16.1	14.8 (15)	13
Valine	9.9	9.0 (9)	7.5	6.9 (7)	7.4	6.7 (7)	9
Methionine	1.0	0.9 (1)	0.6	0.6 (1)	0.5	0.5 (1)	1
Isoleucine ^d	2.3	2.1 (2)	5.0	4.6 (5)	5.0	4.6 (5)	3
Leucine	5.8	5.2 (5)	6.5	6.0 (6)	6.4	5.8 (6)	5
Phenylalanine	4.4	4.0 (4)	4.3	4.0 (4)	4.4	4.0 (4)	4
Lysine	9.2	8.3 (8)	12.9	11.8 (12)	12.7	11.6 (12)	8
Arginine	5.6	5.1 (5)	4.4	4.1 (4)	4.4	4.1 (4)	5
Tryptophan ^e	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	99.8	91	99.8	92	99.4	92	90

^aThe results are expressed in number of residues per mole of protein.

^bNumbers in parentheses are the nearest integers.

^cValues for threonine and serine were obtained by linear extrapolation to zero hydrolysis time.

^d72 h hydrolysis values.

^eDetermined spectrophotometrically.

The amino acid composition of *R. meliloti* protein HRm (14) is given for comparison.

lins which demonstrates that both proteins have common antigenic sites. These data suggest a strong amino acid sequence homology between these two proteins.

The protein HRj is a heterocomplex constituted of two polypeptide chains named HRj-1 and HRj-2 which were separated by chromatography on carboxymethyl-cellulose column. The proteins HRj-1 and HRj-2 comigrate on polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS but have a different electrophoretic migration at acidic pH (Fig. 2, B and C). The minor band of higher cathodic migration observed on the gel in the presence of Triton X-100 (lanes b₁ and b₂ of figure 2-C) could be likely due to methionine oxidation during the separation of the two proteins since they appear pure on the two other electrophoretic systems. The proteins HRj-1 and HRj-2 have an identical amino acid composition (Table I). Their different behavior in gel electrophoresis at acidic pH and during ion exchange chromatography suggest that they have a distinct net charge which could be due to post-synthetic modifications such as acetylation.

The proteins HRj-1 and HRj-2 are quite distinct from the proteins HRm and HAt. On polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of Triton X-100 they migrate much slower than other HU-type proteins. As proteins HRm and HAt, the proteins HRj-1 and HRj-2 lack cysteine, tyrosine, histidine and tryptophan and have a high amount of hydrophobic residues which are the main characteristics of the amino acid composition of HU-type proteins. But by comparison with the proteins HRm and HAt, important differences can be observed in the amino acid compositions of proteins HRj-1 and HRj-2, particularly in the amount of serine, glutamic acid, isoleucine and lysine. Furthermore the protein HRj reacts very weakly against anti-protein HRm immunoglobulins.

On the basis of electrophoretic mobility on polyacrylamide gel, amino acid composition and crossed immunoreactivity the proteins HRm and HAt show close similarities whereas the protein HRj differs markedly from those mentioned above. Our results substantiate that *Agrobacterium tumefaciens* and the fast growing *Rhizobia* are taxonomically closely related and that the slow growing *Rhizobium japonicum* is very remote from the fast growing strains of *Rhizobium*.

Therefore the physico-chemical characteristics of the HU-type proteins isolated from these Rhizobiaceae are in good agreement with the respective position of these bacteria in the taxonomy.

It must be emphasized that the protein HRm exhibits a lower amount of basic residues and a weaker affinity for the DNA-cellulose column than does protein HRj. A weaker affinity has also been found for the HU-type proteins from two species of fast growing *Rhizobium leguminosarum* (personal communication). These data may be related with the difference in the morphological nucleoid modifications which have been observed between fast growing and slow growing *Rhizobia* during the symbiotic process with the legumes. The mature bacteroid of slow growing *Rhizobia* retained discrete and fibrillar nucleoid structures while in effective mature bacteroids of fast growing strains there is a morphological alteration of the nucleoid which appears diffused or dispersed (25, 26). These structural changes do not correspond either to nucleoid degeneration or to a decreased nucleic acid content (27) but are likely due to unfolding of the chromosomal apparatus. As HU-type proteins are assumed to be involved in the condensation of DNA, one can therefore speculate that during maturation of bacteroids the HU-type protein of slow growing *Rhizobia* is more efficient than that of fast growing strains to maintain the conformation of the nucleoid.

ACKNOWLEDGEMENTS.- The authors acknowledge with pleasure the skilful technical assistance of A. Deck, M.J. Dupire and A. Hêmez. This work was supported by grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (CRL 80.20.35) and grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (ATP Chromatine 4203) and grant from "Aide à la Recherche Universitaire", 1982.

REFERENCES

1. Rouvière-Yaniv, J. and Gros, F. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3428-3432.
2. Varshavsky, A.J., Nedospasov, S.A., Bakayev, V.V., Bakayeva, T.G. and Georgiev, G.P. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 2725-2745.
3. Wu, F.Y.H., Kolb, A. and Buc, H. (1982) Biochim. Biophys. Acta 696, 231-238.
4. Rouvière-Yaniv, J., Yaniv, M. and Germond, J.E. (1979) Cell 17, 265-274.
5. Laine, B., Sautière, P., Biserte, G., Cohen-Solal, M., Gros, F. and Rouvière-Yaniv, J. (1978) FEBS-Lett. 89, 116-120.
6. Mende, L., Timm, B. and Subramanian, A.R. (1978) FEBS-Lett. 96, 395-398.

7. Laine, B., Kmićik, D., Sautière, P., Biserte, G. and Cohen-Solal, M. (1980) *Eur. J. Biochem.* 103, 447-461.
8. Hawkins, A.R. and Wootton, J.C. (1981) *FEBS-Lett.* 130, 275-278.
9. Nakayama, T. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 318-324.
10. Imber, R., Bächinger, H. and Bickle, T.A. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122, 627-632.
11. Dijk, J., White, S.W., Wilson, K.S. and Appelt K. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 4003-4006.
12. Haselkorn, R. and Rouvière-Yaniv, J. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1917-1920.
13. De Lange, R.J., Green, G.R. and Searcy, D.G. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 900-904.
14. Laine, B., BélaTche, D., Sautière, P. and Biserte, G. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 101-107.
15. Laine, B., BélaTche, D., Khanaka, H. and Sautière, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* 131, 325-331.
16. Elkan, G.H. (1981) *Int. Review Cytology, Suppl.* 13, 1-13.
17. Beringer, J.E. (1973) *Genetic Studies with *Rhizobium leguminosarum**, PhD Thesis, University of East Anglia, United Kingdom.
18. Kin Ichiro Miura (1967) *Methods in Enzymology, XII-A*, 543-545.
19. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
20. Kerckaert, J.P. (1978) *Anal. Biochem.* 84, 354-360.
21. Panyim, S. and Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 337-346.
22. Hardinson, R. and Chalkley, R. (1978) *Methods in Cell Biology* 17, 235-251.
23. Laine, B., Kerckaert, J.P., Sautière, P. and Biserte, G. (1978) *FEBS-Lett.* 96, 291-294.
24. Wide, L. (1969) Radioimmunoassays employing immunoabsorbents. In 1st Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology, p. 207.
25. Goodchild, D.J. and Bergersen, F.J. (1966) *J. Bacteriol.* 92, 204-213.
26. Newcomb, W. (1976) *Can. J. Bot.* 54, 2163-2186.
27. Paa, A.S., Lee, D. and Cowles, J.R. (1977) *J. Bacteriol.* 129, 1156-1158.

CHAPITRE III

ETUDES STRUCTURALES DES PROTÉINES DE TYPE HU

PLAN DU CHAPITRE III

ETUDES STRUCTURALES DES PROTEINES DE TYPE HU

III - 1 ETUDE DE LA PROTEINE HRmIII - 2 ETUDE COMPAREE DES PROTEINES DE TYPE HU DE *Rhizobiaceae*III - 3 DISCUSSION

III - 3-1 Relation entre la taxonomie numérique et
la phylogénie

III - 3-2 Relation entre la structure primaire et
la fonction biologique des protéines de
type HU

Au chapitre II nous avons comparé les propriétés physico-chimiques et la réactivité immunologique vis à vis des immunoglobulines anti protéine HRm de protéines de type HU isolées de plusieurs *Rhizobiaceae*. Cette étude comparative a montré que les protéines HAt et HR118 sont étroitement apparentées et diffèrent peu de la protéine HRm. La protéine HR153 diffère significativement des protéines citées précédemment. Enfin la protéine HRj présente des différences beaucoup plus marquées. Les propriétés de ces protéines reflètent parfaitement la position des bactéries d'où elles sont isolées dans le dendrogramme établi sur des études de taxonomie numérique.

Il nous a semblé particulièrement intéressant de poursuivre ce travail par une étude comparée de la structure primaire de ces protéines afin de déterminer de façon précise la parenté phylogénétique entre ces bactéries. En effet, considérant qu'une protéine est une copie d'une petite partie du génome, la comparaison de la structure primaire de protéine permet de relier des espèces génétiquement très différentes. La distance phylogénétique traduira donc la divergence taxonomique entre les bactéries étudiées. L'apport de renseignements d'ordre phylogénétique apparaît donc très intéressant pour relier des espèces de la famille *Rhizobiaceae* qui demeure encore mal connue.

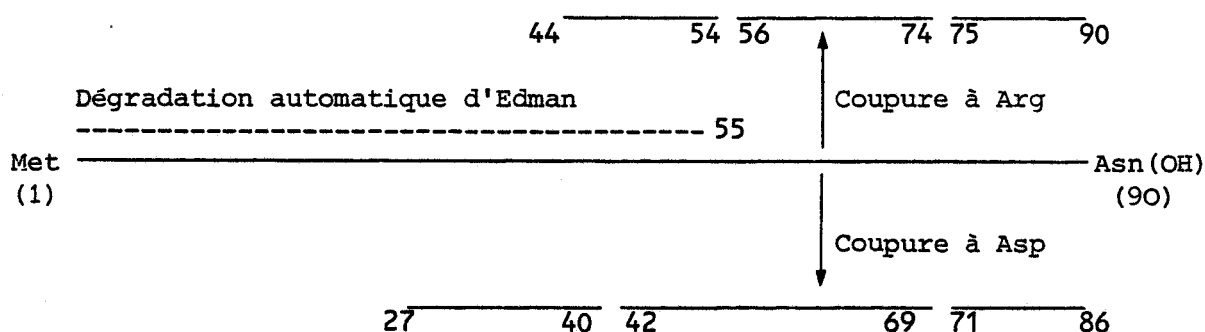
D'autre part la détermination de la structure primaire d'une protéine est nécessaire à l'étude de sa conformation

secondaire et tertiaire et constitue également une étape indispensable pour déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans son activité biologique.

Dans un premier temps, nous avons déterminé la séquence complète de la protéine HRm. Une fois établie, cette séquence nous a servi de référence pour l'étude comparée des protéines de type HU des autres *Rhizobiaceae*. Les stratégies de détermination de séquence en acides aminés utilisées pour la protéine HRm et pour les protéines homologues des autres *Rhizobiaceae* sont donc fondamentalement différentes.

III - 1 ETUDE DE LA PROTEINE HRm

La stratégie utilisée pour l'étude de la protéine HRm est présentée dans le schéma suivant :



La séquence amino-terminale 55 résidus a été déterminée par la méthode automatique de dégradation d'Edman sur la protéine native. Ensuite pour établir la séquence de la

moitié carboxy-terminale, nous avons cherché à obtenir un nombre restreint de grands fragments peptidiques qui se prêtent à la méthode automatique de dégradation d'EDMAN. Ces fragments ont été obtenus par coupure de la protéine au niveau des résidus d'arginine et d'acide aspartique.

III - 2 ETUDE COMPAREE DES PROTEINES DE TYPE HU DE *Rhizobiaceae*

Dans ce cas nous avons cherché à obtenir de petits peptides. Ce choix a été guidé par deux raisons : d'une part il est plus facile de détecter une substitution dans un court fragment peptidique, d'autre part ces petits peptides ont pu être séquencés par la méthode manuelle de dégradation d'EDMAN. Les protéines ont été hydrolysées par la trypsine et les peptides libérés ont été alignés par comparaison avec la structure primaire de la protéine HRm. Toutefois pour la protéine HR153 qui présente davantage de différences, il a été nécessaire de compléter l'étude de l'hydrolysate trypsique par celle de longs fragments libérés par coupure de la molécule au niveau des résidus d'acide aspartique.

Par ailleurs au cours de l'hydrolyse trypsique des protéines HRj-1 et HRj-2 de *R. japonicum*, nous avons observé un précipité important : ce phénomène est sans doute lié à la présence dans la molécule protéique d'un "core insoluble" résistant à l'action de la trypsine, et il a été la cause d'un

très faible rendement dans l'obtention des peptides. Il ne nous a donc pas été possible d'exploiter de façon satisfaisante les résultats de cette étude structurale.

Les résultats obtenus sur la protéine HRm sont présentés dans la publication 2:

Bernard LAINE, Denise BELAÏCHE, Hussain KHANAKA and Pierre SAUTIERE - Primary structure of the DNA-binding protein HRm from *Rhizobium meliloti*, Eur.J.Biochem. 131, 325-331 (1983)

La comparaison des protéines HAt, HR118 et HR153 avec la protéine HRm est présentée dans la publication 3 :

Hussain KHANAKA, Bernard LAINE, Pierre SAUTIERE and Jean GUILLAUME - Biochemical characteristics of DNA-binding HU type proteins from *Rhizobiaceae*, Eur.J.Biochem., (soumis pour publication).

III - 3 DISCUSSION

Les caractéristiques de la séquence en acides aminés des protéines HRm, HAt, HR118 et HR153 ont été présentées dans la discussion des publications 2 et 3. Nous souhaitons n'en développer ici que deux aspects :

- 1 - Relation entre la parenté phylogénétique et la taxonomie numérique.
- 2 - Relation entre la structure primaire et la fonction biologique de ces protéines.

III - 3-1 Relation entre la taxonomie numérique et la phylogénie

La comparaison de la séquence en acides aminés des protéines de type HU, HRm, HAt, HR118 et HR153 isolées de différentes *Rhizobiaceae* nous a permis de déterminer le pourcentage d'homologie structurale existant entre ces protéines (Figure 15). Nous avons également schématisé dans la figure 16 la distance phylogénétique entre les quatre protéines qui ont fait l'objet de notre étude. La distance phylogénétique entre plusieurs protéines correspond au nombre de substitutions existant entre elles ; ce nombre est représenté par une longueur mesurée en cm.

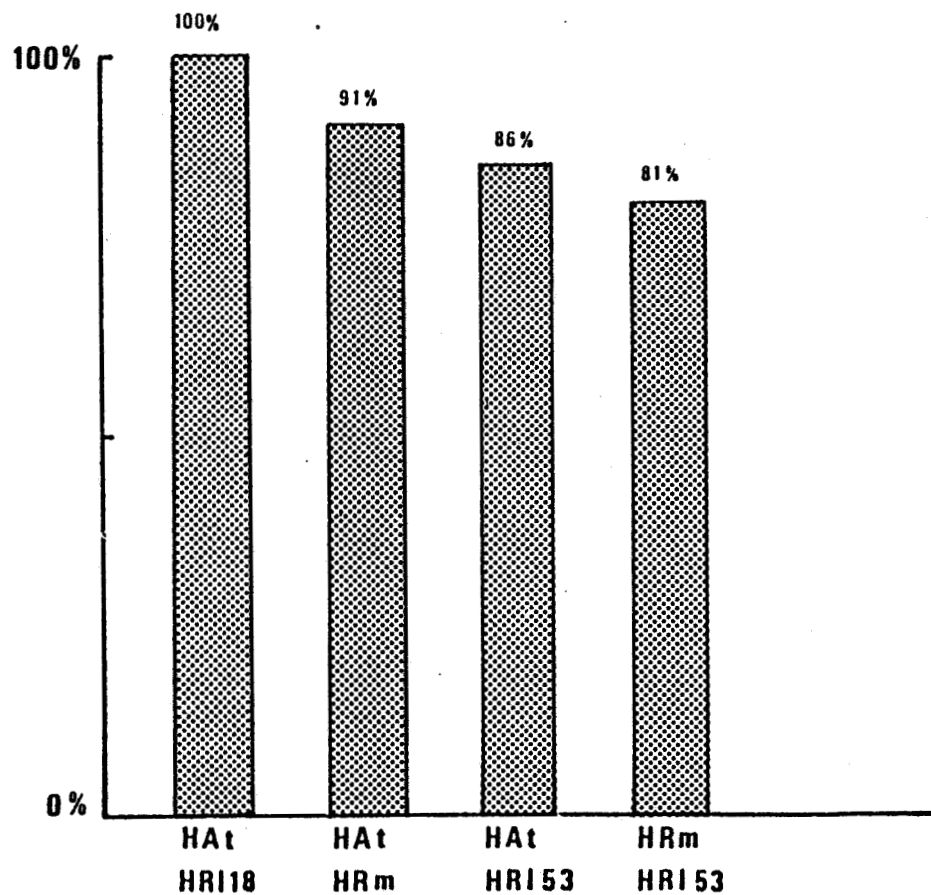


FIGURE 15 POURCENTAGE D'HOMOLOGIE DE SEQUENCE ENTRE LES PROTEINES DE TYPE HU ISOLEES DE DIFFERENTES RHIZOBIACEAE.

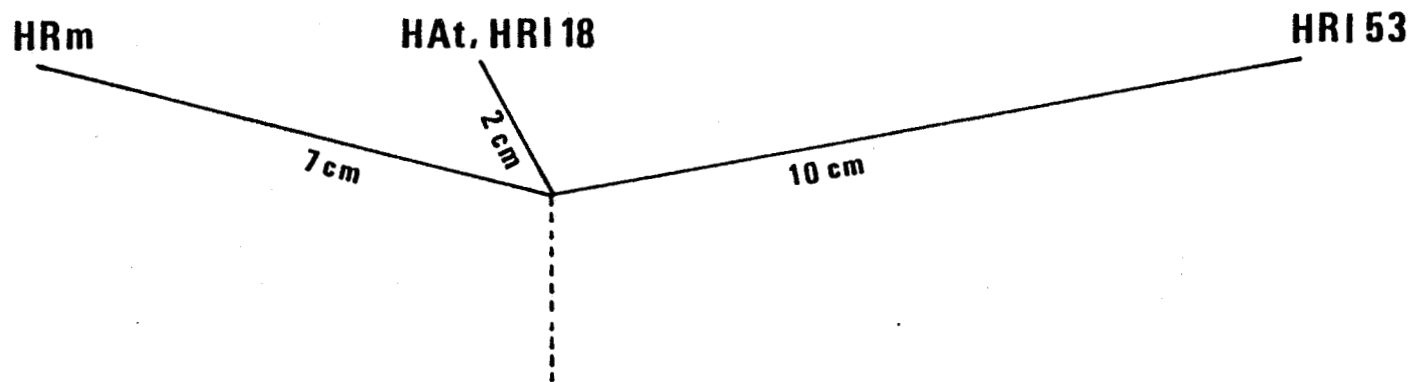


FIGURE 16 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA DISTANCE PHYLOGENETIQUE ENTRE LES PROTEINES HRm, HAt, HRI18 ET HRI53.

Le nombre de substitutions entre les différentes protéines est représenté par une longueur mesurée en cm.

La relation phylogénétique entre les protéines HRm, HAt, HR118 et HR153 confirme les résultats présentés au chapitre II concernant la comparaison des propriétés physico-chimiques et immunologiques de ces protéines. De plus la parenté phylogénétique de ces protéines reflète parfaitement la position des bactéries dans le dendrogramme établi à partir des études de taxonomie numérique. Soulignons en effet que :

- *Agrobacterium tumefaciens* et *Rhizobium leguminosarum* L18, à partir desquelles sont isolées les protéines HAt et HR118 qui présentent 100 p.100 d'homologie, appartiennent à un même groupe (groupe A de la figure 2 page 22).

- *Agrobacterium tumefaciens* présente des relations taxonomiques étroites avec *Rhizobium meliloti*. Pour notre part, nous observons entre les protéines HAt et HRm 91 p.100 d'homologie.

- Les protéines HR118 et HR153 sont donc très différentes ce qui confirme que le taxon *Rhizobium leguminosarum* est hétérogène comme l'avaient montré les études de taxonomie numérique : les souches L18 et L53 sont situées dans deux groupes distincts (groupes A et T de la figure 2).

- Par contre les protéines HR118 et HR153 de *Rhizobium leguminosarum* L18 et L53 sont plus éloignées l'une de l'autre phylogénétiquement que les protéines HAt et HRm. En effet les protéines HR118 et HR153 présentent 86 p.100 d'homologie de séquence. Ce pourcentage d'homologie entre deux protéines de deux souches appartenant à une même espèce définie par la spécificité d'hôte est plus faible que celui observé entre les protéines HAt

et HRm isolées de deux groupes distincts. Par ailleurs le calcul d'homologie de séquence ne tient pas compte de la nature des substitutions. Or entre les protéines HAt et HRm on observe une seule substitution non conservative tandis qu'entre les protéines HR118 et HR153 le nombre de substitutions non conservatives s'élève à 4.

Nos travaux de comparaison de séquence confirment que la classification basée sur la spécificité d'hôte n'est pas satisfaisante. Sachant que la souche L53 de *R. leguminosarum* est placée dans le groupe des *R. trifolii* du dendrogramme (Figure 2) il serait intéressant de caractériser la protéine de type HU d'une souche de *R. trifolii* et de déterminer si elle présente une parenté phylogénétique étroite avec la protéine HR153.

III - 3-2 Relation entre la structure primaire et la fonction biologique des protéines de type HU

Dans cette partie nous montrerons quelle peut être l'importance de la conservation ou de la variation de la structure primaire d'une protéine sur sa structure secondaire et sa fonction biologique. Connaissant la séquence en acides aminés des protéines HU-1, HU-2 et HRm, nous avons tracé leur diagramme d'hydrophobicité (Figure 17). Pour tracer ces diagrammes on reporte en ordonnée un coefficient d'hydrophobicité affecté à chaque acide aminé dont la position est indiquée en abscisse.

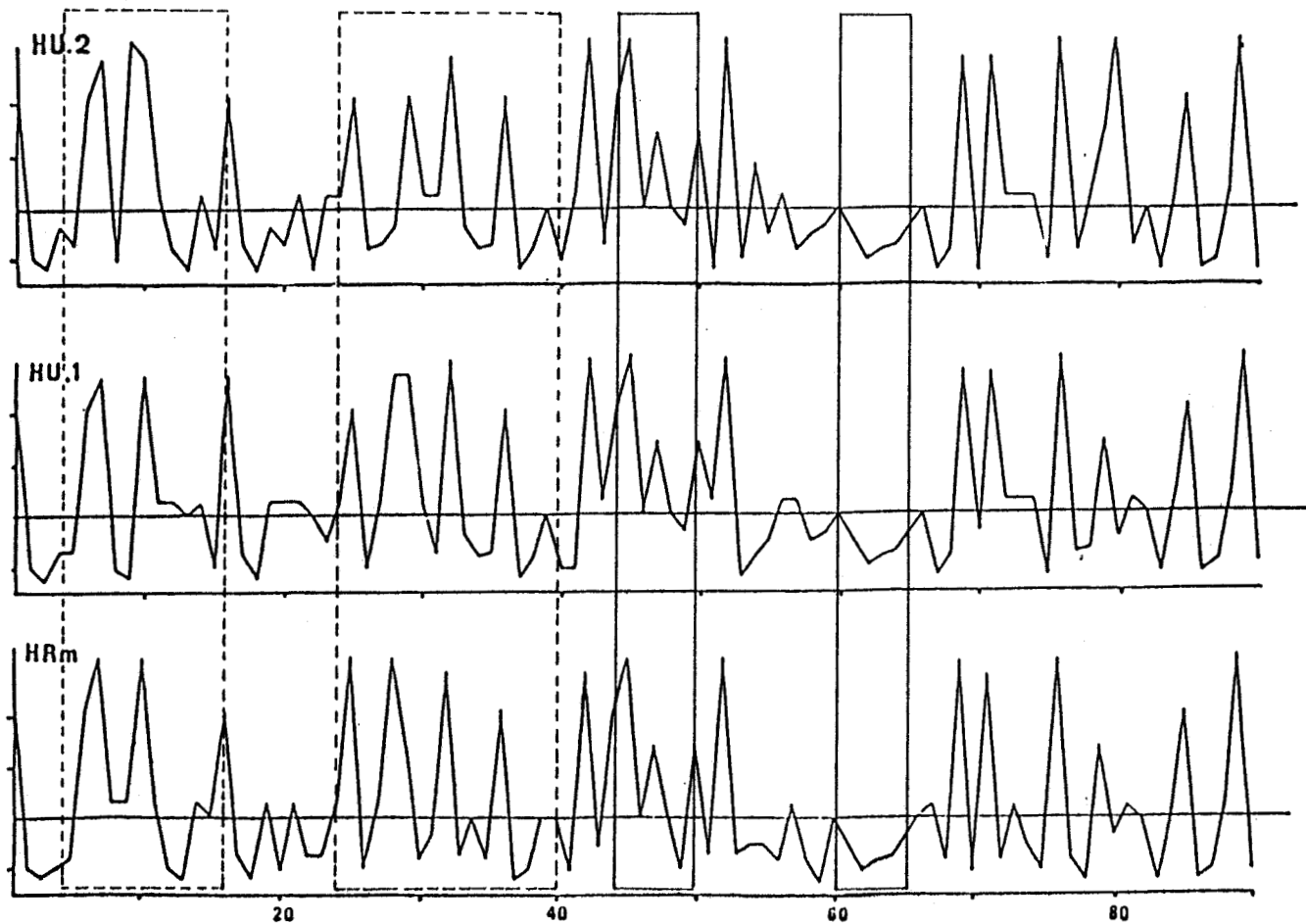
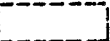


FIGURE 17 DIAGRAMME D'HYDROPHOBICITE DES PROTEINES HU-1, HU-2 ET HRm

Les diagrammes sont tracés selon la méthode de CID (1982).

Les cadres correspondent aux régions de séquence quasiment invariables.

Les cadres correspondent aux régions où l'hydrophobicité est bien conservée malgré de nombreuses substitutions.

Les diagrammes d'hydrophobicité des trois protéines sont fort similaires. Pourtant, par comparaison avec la protéine HU-1 prise comme référence, la protéine HU-2 présente 28 substitutions dont 17 sont non conservatives et la protéine HRm présente 43 substitutions dont 26 sont non conservatives. Il apparaît donc que les différences observées au niveau de la structure primaire ne modifient pas profondément l'hydrophobicité le long de la chaîne polypeptidique. Ceci est particulièrement remarquable dans le tiers amino-terminal de ces protéines (résidus 1-30) où interviennent la plupart des substitutions (voir cadre  de la figure 17). Selon CID (1982) l'hydrophobicité reflète la structure secondaire des protéines : la similitude des diagrammes d'hydrophobicité des protéines HU-1, HU-2 et HRm suggère que la structure secondaire de ces protéines est peu différente. Les résultats obtenus au chapitre IV confirment cette hypothèse.

La plupart des substitutions observées entre les protéines HRm, HAt et HR118 sont conservatives et ne modifient pas de façon significative l'hydrophobicité des résidus d'acides aminés, pour cette raison nous n'avons pas jugé utile de montrer le diagramme d'hydrophobicité de ces protéines. Par contre, certaines substitutions observées dans la protéine HR153 modifient la structure secondaire de la chaîne polypeptidique et méritent d'être soulignées. La glycine en position 39 strictement conservée dans toutes les protéines de type HU étudiées jusqu'à présent (voir figure 5 de la publication 2) et responsable de la formation d'un coude β , est remplacée dans la protéine HR153 par une lysine. Cette substitution modifie donc à la fois la

conformation et la charge de cette région de la protéine. De même avec la substitution Ala → Pro en position 81 le segment compris entre les résidus 72 et 81 contient trois résidus de proline ce qui lui confère une configuration fortement repliée.

D'autres substitutions observées entre la protéine HRm et la protéine HR153 ont une importance sur l'interaction de ces protéines avec le DNA : la perte d'une fonction basique forte consécutive à la substitution Arg → His en position 54 est compensée par la substitution Glu → Ala en position 56, ce qui rétablit à + 3 la charge nette de la région 54-62 de caractère hydrophile. Selon LAMMI et coll. (1984) cette région constituerait un site majeur d'interaction DNA-protéine : l'interaction DNA-protéine mettant en jeu des liaisons électrostatiques entre les acides aminés chargés positivement et les groupes phosphate du DNA. Ainsi pourrait s'expliquer que les protéines HRm et HR153, qui ont une charge nette respectivement égale à + 2 et + 3 aient une affinité similaire pour le DNA : elles sont éluées de la colonne de DNA-cellulose par une molarité en NaCl de 150 et 170 mM respectivement (Voir chapitre II).

Nous avons également présenté dans la figure 18-A la séquence de la région 54-62 des protéines HU-1 et HU-2 d'*E. coli*. Dans ces protéines la charge nette du site d'interaction DNA-protéine est plus faible que celle de la séquence homologue de la protéine HRm (+ 2 et + 3 respectivement pour les protéines HU et HRm); il apparaît donc surprenant que la protéine HU ait une affinité plus forte que la protéine HRm pour le DNA (Voir

chapitre V). En réalité si cette séquence prend une conformation α hélicoïdale les résidus d'arginine, en position 55, 58 et 61 des protéines HU-1 et HU-2 se trouvent du même côté de l'hélice α (Figure 18-B): cette disposition est favorable à l'établissement d'une interaction DNA-protéine. Dans la protéine HU-1 l'hélice α est stabilisée malgré la présence de la glycine en position 60 grâce à l'attraction des résidus Glu et Arg en position 54 et 61. Notons que la glycine connue pour être "destructeur" d'hélice α est rencontrée dans les hélices $\alpha_2 - \alpha_3$ du répresseur $cI\lambda$ et $\alpha E - \alpha F$ de la protéine CAP, comme l'ont montré sans ambiguïté les études de diffraction des rayons X (OHLENDORF et coll., 1982). Par contre dans la protéine HRm la répulsion entre les résidus d'arginine en position 54 et 61, s'ajoute à l'effet de la glycine pour destabiliser l'hélice α et seuls les résidus d'arginine (position 55) et de lysine (position 59) seraient inclus dans le segment en conformation α hélicoïdale. La disposition des résidus basiques ne serait pas aussi favorable que celle observée dans les protéines HU-1 et HU-2 pour l'établissement de l'interaction avec le DNA.

En conclusion les études comparatives des séquences des protéines HRm, HR118, HAt et HR153 nous ont permis d'établir une parenté phylogénétique entre les protéines de type HU chez les *Rhizobiaceae*. D'autre part en comparant les séquences de plusieurs protéines de type HU nous avons pu proposer une hypothèse expliquant leur affinité respective pour le DNA. On voit ainsi que la comparaison de séquence en acides aminés constitue une approche permettant d'établir la relation entre la structure et la fonction biologique d'une protéine.

CHARGE NETTE

A

	54	62	
HRl ₅₃	His-Arg-Ala-Ala-Thr-Lys-Gly-Arg-Asn		+3
	⊕	⊕	
HRm	Arg-Arg-Glu-Ala-Ser-Lys-Gly-Arg-Asn		+3
	⊕	⊕	
HU-1	Glu-Arg-Ala-Ala-Arg-Thr-Gly-Arg-Asn		+2
	⊖	⊕	
HU-2	His-Arg-Ala-Glu-Arg-Thr-Gly-Arg-Asn		+2
	⊕	⊖	

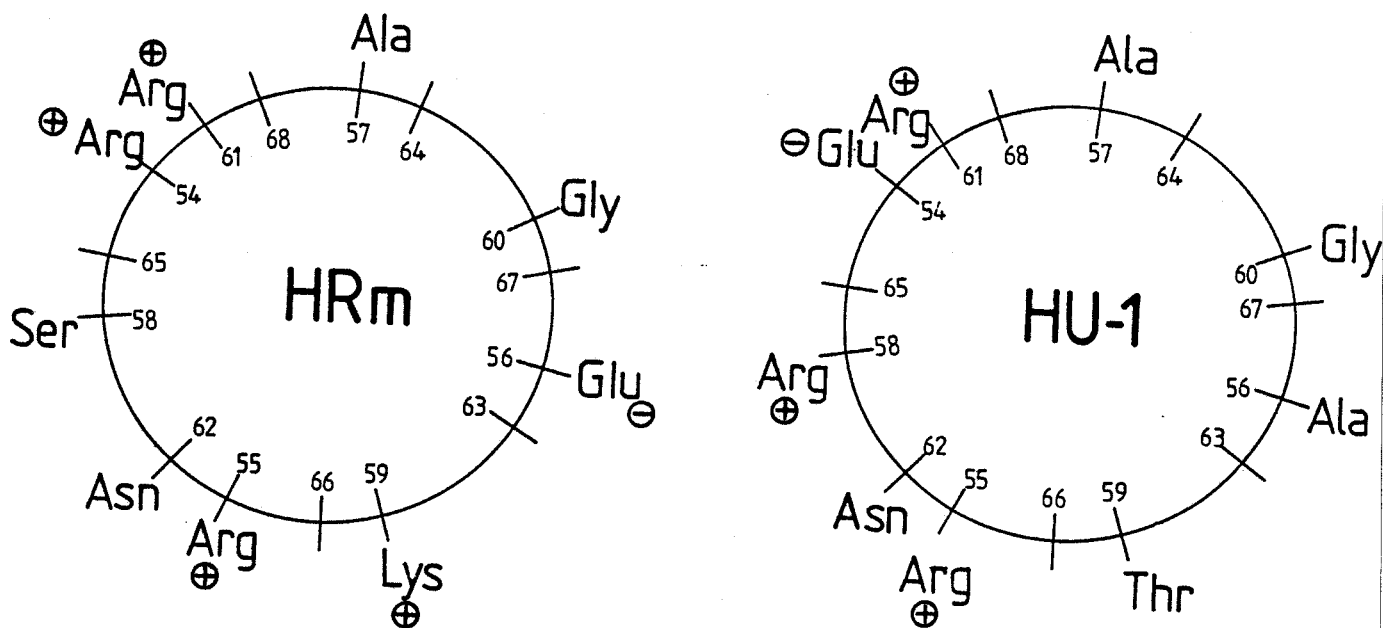
B

FIGURE 18

A - STRUCTURE PRIMAIRE DE LA REGION 54-62 DES PROTEINES HRm, HR153, HU-1 ET HU-2

B - DISPOSITION DES ACIDES AMINES DE CETTE REGION DES PROTEINES HRm ET HU-1 DANS UNE HELICE α

Eur. J. Biochem. 131, 325–331 (1983)
© FEBS 1983

Primary Structure of the DNA-Binding Protein HRm from *Rhizobium meliloti*

Bernard LAINE, Denise BÉLAÏCHE, Hussain KHANAKA, and Pierre SAUTIÈRE

Unité 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Lille; and
Laboratoire de Microbiologie Université des Sciences et Techniques de Lille, Villeneuve d'Ascq

(Received October 5, 1982) – EJB 6072

The amino acid sequence of protein HRm, a DNA-binding HU-type protein of 90 residues (M_r 9303), isolated from *Rhizobium meliloti*, has been established from automated sequence analysis of the protein and from structural data provided by peptides derived from cleavage of the protein at arginine and aspartic acid residues.

The comparison of the primary structure of protein HRm with that of other HU-type proteins shows that two short sequences, of 7 and 6 residues respectively, located in the median part of the molecule, appear highly conserved and may be important in the function of the protein.

Several authors have suggested that low-molecular-weight basic DNA-binding proteins isolated from *Escherichia coli* [1–4] could play a role in the condensation of the chromosomal DNA which is packaged in a compact structure [5] and has been visualized by electron microscopy to be condensed in a repeating beaded structure [6]. The most extensively studied of these proteins, the protein HU [1], is a hetero-complex constituted of two polypeptide chains termed HU-1 and HU-2, of 90 residues each [7–9]. Closely related proteins have been isolated from different species widely remote in the bacterial kingdom including Eubacteria (*Salmonella typhimurium* [10], *Pseudomonas aeruginosa* [11], *Bacillus subtilis* [12] and *Bacillus globigii* [13]), Cyanobacteria (*Anabaena* and *Synechocystis* [14]) and an Archaeobacteria (*Thermoplasma acidophilum* [15]). In support of the hypothesis of a role of the HU-type proteins in the condensation of DNA are the findings obtained essentially with the protein HU from *E. coli* and the protein HTa from *T. acidophilum*. The proteins HU and HTa have been shown to be associated with the chromosomal DNA [2, 10, 15] and to stabilize DNA against thermal denaturation [16, 17]. Protein HU can form nucleosome-like structures with circular double-stranded DNA which is condensed by a ratio of 2.4 relative to naked DNA [18]. Protein HTa condenses linear double-stranded DNA into globular particles [19]. The proteins HU-1 and HU-2 [8, 9] and the protein HTa [20] have been completely sequenced. The partial sequences of the HU-type proteins from *P. aeruginosa* [11] and from the Cyanobacterium *Synechocystis* [21] have also been reported.

A DNA-binding HU-type protein has been recently characterized in *Rhizobium meliloti* [22]. This protein termed HRm is a single polypeptide chain and exhibits lower affinity for double-stranded DNA than does *E. coli* protein HU.

In this paper we present the complete amino acid sequence of protein HRm established from automated sequence analysis of the protein and from structural data provided by peptides

derived from cleavage of the protein at arginine and aspartic acid residues.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Rhizobium meliloti, strain 2011 Str 3 (streptomycin-resistant mutant) was provided by J. Denarie (Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles, France) and was grown as described in [23]. The protein HRm was isolated and purified as in [22].

Carboxypeptidase A (treated with PhMeSO₂F) was obtained from Worthington. The protease from submaxillary gland of mouse (endoproteinase Arg-C) was from Boehringer.

Trifluoroacetic acid, dimethyl allylamine, propan-1-ol and dithioerythritol were sequanal grade from Pierce. Benzene and chloro-1-butane for sequential analysis were purchased from S.D.S. (Peypin, France). Phenylisothiocyanate, heptane and heptafluorobutyric acid were sequanal grade from Beckman. Polybrene was purchased from Aldrich and the dipeptide Gly-Gly from Sigma. Acetonitrile for HPLC was from Carlo Erba. All other reagents were of the highest purity available.

Structural Studies

Carboxy-Terminal Analysis. Protein HRm (80 nmol) dissolved in 0.8 ml of 0.2 M *N*-methyl-morpholine acetate, pH 8.0 was digested at 37°C with carboxypeptidase A (15 µg, 0.7 unit). At 10 min and 30 min, aliquots were taken off, acidified with glacial acetic acid and freeze-dried. The released amino acids were analysed on the amino acid analyser.

Cleavage at Arginyl Residues. Protein HRm (650 nmol) was digested with the protease from submaxillary gland of mouse in 0.1 M sodium bicarbonate (2 ml) pH 8.0 at 37°C for 4 h, using an enzyme-to-substrate ratio of 1:50 (w/w). The digestion was stopped by lowering the pH at 3.0 with glacial acetic acid.

Cleavage at Aspartyl Residues. Protein HRm (650 nmol) was hydrolysed with 1 ml of 0.25 M acetic acid in an evacuated sealed tube for 15 h at 105°C.

Abbreviations. HRm, DNA-binding HU-type protein isolated from *Rhizobium meliloti*; PhMeSO₂F, phenylmethylsulfonyl fluoride.

Enzymes. Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1); endoproteinase Arg-C (EC 3.4.–.–).

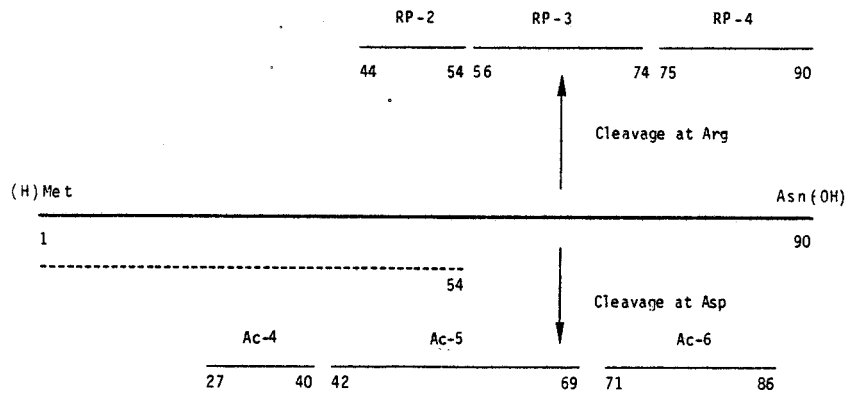


Fig. 1. Strategy used for the determination of the amino acid sequence of protein HRm. (---) Automated Edman degradation of protein HRm

Table 1. Automated Edman degradation of protein HRm

In this table and in Tables 3–6, HPLC = identification and quantification of phenylthiohydantoin derivatives of amino acids by high-pressure liquid chromatography [22,25]; GC = identification by gas chromatography [26]; – = not quantified

Cycle number	Residue number	Residue	Yield nmol	Identification
1	1	Met	114	HPLC, GC
2	2	Asn	222	HPLC
3	3	Lys	264	HPLC
4	4	Asn	220	HPLC
5	5	Glu	195	HPLC
6	6	Leu	251	HPLC
7	7	Val	–	HPLC, GC
8	8	Ala	244	HPLC
9	9	Ala	268	HPLC
10	10	Val	–	HPLC, GC
11	11	Ala	210	HPLC
12	12	Asp	–	HPLC
13	13	Lys	114	HPLC
14	14	Ala	174	HPLC
15	15	Gly	143	HPLC
16	16	Leu	123	HPLC
17	17	Ser	27	HPLC
18	18	Lys	86	HPLC
19	19	Ala	127	HPLC
20	20	Asp	84	HPLC
21	21	Ala	118	HPLC
22	22	Ser	22	HPLC
23	23	Ser	26	HPLC
24	24	Ala	90	HPLC
25	25	Val	–	HPLC, GC
26	26	Asp	47	HPLC
27	27	Ala	74	HPLC
28	28	Val	–	HPLC, GC
29	29	Phe	49	HPLC, GC
30	30	Glu	20	HPLC, GC
31	31	Thr	12	HPLC
32	32	Ile	45	HPLC, GC
33	33	Gln	15	HPLC
34	34	Gly	37	HPLC, GC
35	35	Glu	15	HPLC, GC
36	36	Leu	18	HPLC, GC
37	37	Lys	29	HPLC
38	38	Asn	17	HPLC, GC
39	39	Gly	31	HPLC
40	40	Gly	38	HPLC
41	41	Asp	19	HPLC, GC

Table 1 (continued)

Cycle number	Residue number	Residue	Yield	Identification
42	42	Ile	19	HPLC, GC
43	43	Arg	22	HPLC, GC
44	44	Leu	8	HPLC, GC
45	45	Val	–	HPLC, GC
46	46	Gly	28	HPLC, GC
47	47	Phe	17	HPLC, GC
48	48	Gly	27	HPLC, GC
49	49	Asn	13	HPLC, GC
50	50	Phe	8	HPLC
51	51	Ser	1	HPLC
52	52	Val	–	HPLC, GC
53	53	Ser	1	HPLC
54	54	Arg	–	HPLC

Fractionation of Peptides. The enzymatic digest and the acid hydrolysate were freeze-dried and submitted to fractionation by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. The separation of peptides was performed with a Waters Associates ALC/GPC 244 apparatus equipped with a U 6 K sample injector and a Cecil 212 variable-wavelength ultraviolet monitor. The samples were dissolved in 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid in distilled water, centrifuged at 4000 × g for 5 min and loaded on a C₁₈ μBondapak column (9 μm, 0.39 × 30 cm) (Waters Associates) equilibrated with 10% (v/v) acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid. Peptides were eluted with a linear gradient of acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid as indicated in Fig. 2 and 3. All runs were carried out at room temperature at a constant flow rate of 2 ml/min. The solvents were degassed for 20 min by sonication and for 1 min under vacuum with stirring.

Sequence Determination. Automated Edman degradation of the protein HRm and of large peptides was performed as indicated in [22]. Manual Edman degradation of peptides was carried out as in [24]. The phenylthiohydantoin derivatives of amino acids were identified by high-pressure liquid chromatography as indicated in [22].

Nomenclature of Peptides. Peptides obtained by cleavage of the protein at arginyl residues with the protease from submaxillary gland of mouse are designated by RP-. Peptides derived from cleavage at aspartyl residues are designated by Ac-. The peptides are numbered according to their position in the sequence of the protein.

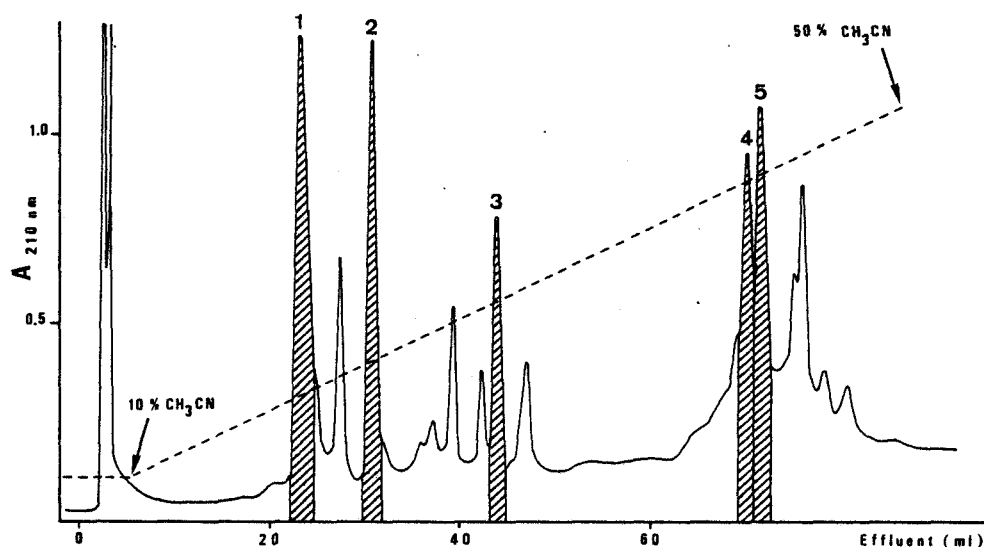


Fig. 2. Elution pattern of peptides generated by cleavage at arginyl residues with the protease from submaxillary gland of mouse and fractionated by reverse-phase HPLC. The digest (130 nmol) was loaded on a column of C_{18} microBondapak (0.39×30 cm) equilibrated with 10% (v/v) acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid. The column was eluted with a linear gradient (---) from 10% to 50% acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid. Fractions of 0.8 ml were collected at a flow rate of 2 ml/min. The elution of peptides was monitored at 210 nm. The fractions used for sequence determination were numbered by order of elution from 1 to 5

Table 2. Amino acid composition of peptides used for the sequence determination

Values are expressed as number of residues per mole of peptide. Values in parentheses are the nearest integers. No corrections were made for degradative losses of threonine and serine. The last column shows the amino acid composition of protein HRm determined in [22]

Amino acids	RP-1 residues 1 to 43	RP-2 residues 44 to 54	RP-3 residues 56 to 74	RP-4 residues 75 to 90	Ac-4 residues 27 to 40	Ac-5 residues 42 to 69	Ac-6 residues 71 to 86	Protein HRm
Aspartic acid	7.08 (7)	1.25 (1)	2.03 (2)	3.05 (3)	1.14 (1)	1.83 (2)	1.29 (1)	13
Threonine	0.90 (1)		0.99 (1)	0.99 (1)	0.81 (1)	0.88 (1)	0.95 (1)	3
Serine	2.30 (3)	1.42 (2)	1.38 (2)			3.14 (4)		7
Glutamic acid	4.47 (4)		2.11 (2)		2.67 (3)	2.13 (2)		6
Proline			1.96 (2)	1.03 (1)		0.81 (1)	1.73 (2)	3
Glycine	3.66 (4)	1.83 (2)	1.82 (2)	1.77 (2)	2.67 (3)	4.05 (4)	1.89 (2)	10
Alanine	7.91 (8)		2.91 (3)	1.89 (2)	1.32 (1)	2.21 (2)	2.34 (2)	13
Valine	4.06 (4)	2.06 (2)	1.02 (1)	2.12 (2)	1.06 (1)	2.70 (3)	1.30 (1)	9
Methionine	0.94 (1)							1
Isoleucine	2.10 (2)		1.03 (1)		0.90 (1)	1.05 (1)	0.89 (1)	3
Leucine	3.00 (3)	1.13 (1)		1.13 (1)	1.10 (1)	1.40 (1)	1.05 (1)	5
Phenylalanine	1.07 (1)	2.01 (2)		1.10 (1)	0.99 (1)	1.87 (2)	0.97 (1)	4
Lysine	3.94 (4)		1.12 (1)	2.92 (3)	1.18 (1)	1.49 (1)	2.75 (3)	8
Arginine	1.28 (1)	1.12 (1)	2.29 (2)			4.15 (4)	0.85 (1)	5
Number of residues	43	11	19	16	14	28	16	90
No. fraction	Fig. 2				Fig. 3			
	4-5	3	1	2	3	4	1	

RESULTS

The strategy used for the determination of the amino acid sequence of the protein HRm is presented in Fig. 1. The sequence of the first 54 amino acid residues was determined by automated Edman degradation of the protein. The sequence of the carboxy-terminal half of the molecule was established from structural data provided by large peptides generated by highly specific cleavages of the protein. The protein HRm was successively cleaved at arginyl and aspartyl residues and

only the peptides which allowed us to determine the sequence are presented.

Automated Edman Degradation of the Protein HRm

Automated Edman degradation of the protein HRm was performed in two different runs, with samples of 260 nmol and 420 nmol, respectively. The repetitive yield calculated from alanine residues at positions 8 and 24 was 94% in both ex-

Table 3. Automated Edman degradation of peptide RP-2

Cycle number	Residue number	Residue	Yield nmol	Identification
1	44	Leu	65	HPLC
2	45	Val	-	HPLC, GC
3	46	Gly	20	HPLC
4	47	Phe	52	HPLC, GC
5	48	Gly	17	HPLC
6	49	Asn	36	HPLC
7	50	Phe	33	HPLC, GC
8	51	Ser	7	HPLC
9	52	Val	-	HPLC, GC
10	53	Ser	2	HPLC
11	54	Arg	3	HPLC

Table 4. Automated Edman degradation of peptide RP-3

Cycle number	Residue number	Residue	Yield nmol	Identification
1	56	Glu	138	HPLC
2	57	Ala	86	HPLC
3	58	Ser	20	HPLC
4	59	Lys	86	HPLC
5	60	Gly	36	HPLC
6	61	Arg	-	HPLC
7	62	Asn	26	HPLC
8	63	Pro	36	HPLC, GC
9	64	Ser	-	HPLC, GC
10	65	Thr	7	HPLC
11	66	Gly	16	HPLC
12	67	Ala	14	HPLC
13	68	Glu	2	HPLC, GC
14	69	Val	-	HPLC, GC
15	70	Asp	12	HPLC, GC
16	71	Ile	2	HPLC, GC
17	72	Pro	10	HPLC
18	73	Ala	7	HPLC

periments. Positive identifications were achieved through step 54 (Table 1) [22].

Cleavage at Arginyl Residues

The peptides derived from cleavage of the protein HRm at arginyl residues by digestion with the protease from submaxillary gland of mouse were fractionated by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (Fig. 2). The five hatched

Table 5. Automated Edman degradation of peptide RP-4

Cycle number	Residue number	Residue	Yield nmol	Identification
1	75	Asn	71	HPLC, GC
2	76	Val	-	HPLC, GC
3	77	Pro	63	HPLC
4	78	Lys	66	HPLC, GC
5	79	Phe	66	HPLC, GC
6	80	Thr	25	HPLC
7	81	Ala	40	HPLC
8	82	Gly	-	HPLC
9	83	Lys	34	HPLC
10	84	Gly	-	HPLC
11	85	Leu	24	HPLC
12	86	Lys	22	HPLC, GC
13	87	Asp	3	HPLC
14	88	Ala	13	HPLC, GC
15	89	Val	-	HPLC, GC
16	90	Asn	6	HPLC

Table 6. Automated Edman degradation of peptide Ac-5

Cycle number	Residue number	Residue	Yield nmol	Identification
1	42	Ile	137	HPLC
2	43	Arg	59	HPLC
3	44	Leu	67	HPLC, GC
4	45	Val	121	HPLC, GC
5	46	Gly	59	HPLC, GC
6	47	Phe	51	HPLC, GC
7	48	Gly	27	HPLC
8	49	Asn	17	HPLC, GC
9	50	Phe	23	HPLC, GC
10	51	Ser	5	HPLC, GC
11	52	Val	45	HPLC, GC
12	53	Ser	4	HPLC
13	54	Arg	5	HPLC
14	55	Arg	8	HPLC
15	56	Glu	8	HPLC
16	57	Ala	4	HPLC
17	58	Ser	-	HPLC
18	59	Lys	-	HPLC
19	60	Gly	1	HPLC
20	61	Arg	-	HPLC
21	62	Asn	-	HPLC
22	63	Pro	-	HPLC

fractions correspond to pure peptides. Their amino acid compositions are presented in Table 2. The peptide RP-1 was found in both fractions 4 and 5. This is likely due to a partial deamidation of asparagine and glutamine residues which makes the peptide more hydrophilic. The peptides RP-2, RP-3 and RP-4 were obtained in fractions 3, 1 and 2 respectively. The peptide RP-2 (residues 44-54), RP-3 (residues 56-74) and RP-4 (residues 75-90) were completely sequenced by automated Edman degradation (Table 3, 4 and 5 and Fig. 4).

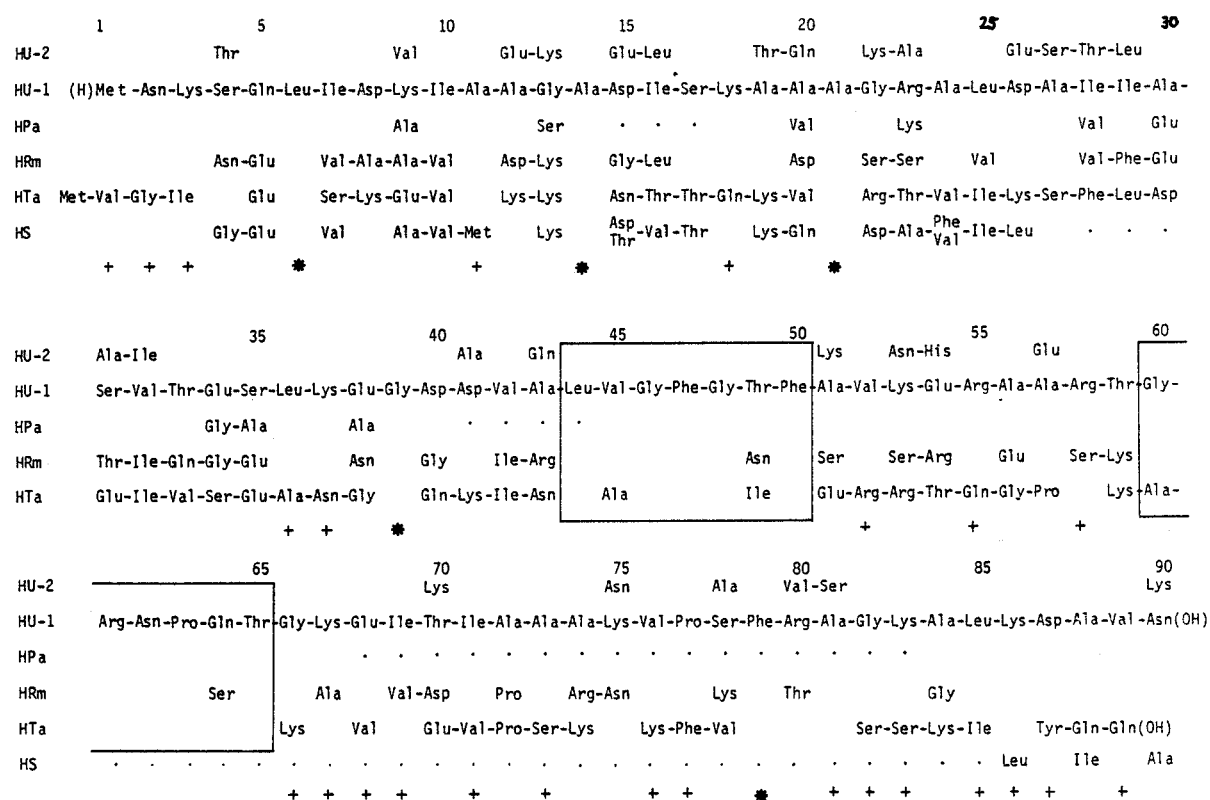


Fig. 5. Comparison of the amino acid sequences of DNA-binding HU-type proteins from different bacteria. Proteins: HU-1 and HU-2 from *E. coli* [9], HPa from *P. aeruginosa* [11], HRm from *R. meliloti*, HTa from *T. acidophilum* [20] and HS from the cyanobacterium *Synechocystis* [21]. HU-1 is given in full; for the other proteins, only the residues that differ from the HU-1 sequence are mentioned. Boxes indicate almost invariable sequences, stars indicate strictly conserved residues and + indicates positions where only one change is observed when all sequences are compared; . . . unidentified residues in proteins HPa and HS

high-pressure liquid chromatography (Fig. 3). The peptides AC-1, Ac-4, Ac-5 and Ac-6 were obtained pure in fractions 2, 3, 4 and 1 respectively. The amino acid compositions of peptides Ac-4, Ac-5 and Ac-6 are presented in Table 2. The sequence of peptide Ac-5 (residues 42–69) was established by automated Edman degradation up to residue 63 (Table 6, Fig. 4). The amino-terminal sequences of peptides Ac-4 (residues 27–40) and Ac-6 (residues 71–86) were determined by manual Edman degradation.

Complete Sequence of Protein HRm

The complete sequence of protein HRm is presented in Fig. 4. The sequence of the 54 first amino acid residues of the molecule was determined by automated Edman degradation of the whole protein. This sequence was confirmed by the amino acid composition of peptide RP-1 and by the structural data provided by peptides RP-2, Ac-4 and Ac-5.

The sequence RP-2–Arg–RP-3 (residues 44–74) was evidenced in peptide Ac-5. The peptide RP-4, lacking an arginyl residue is placed at the carboxy terminus of the protein HRm from the specificity, strictly limited to arginyl bonds, of the protease isolated from submaxillary gland of mouse. The C-terminal position of this peptide was confirmed since identical data (release of asparagine and valine residues, respectively 0.9 and 0.7 mol/mol of substrate) were obtained from digestion of peptide RP-4 and of protein HRm with carboxypeptidase A. The alignment RP-3–RP-4 was established by peptide Ac-6.

The composition of the protein HRm as obtained from the complete sequence thus determined is in excellent agreement with the composition determined by amino acid analysis (Table 2).

DISCUSSION

The relative molecular mass of the protein HRm, calculated from the sequence, is 9303. This protein is mainly characterized by its high content of hydrophobic residues which represent 42% of the total amino acids. These hydrophobic residues are distributed throughout the polypeptide chain. They are probably involved in strong interactions to form homopolymers which can be observed in polyacrylamide gel electrophoresis and in gel filtration chromatography performed in non-denaturing conditions.

A slightly asymmetric distribution of basic and acidic residues can be observed in protein HRm: the amino-terminal region (residues 1–53) has a net charge of -1 compared to $+3$ for the carboxy-terminal region (residues 54–90). Moreover the carboxy-terminal region includes the cluster Arg-Arg and the sequence Lys⁵⁹-Gly-Arg⁶¹ whereas the five basic residues of the amino half of the protein are scattered throughout the polypeptide chain.

An asymmetry of the distribution of the charged residues is also found in proteins HU-1, HU-2 [9] and HTa [20] in which the net charge of the carboxy-terminal region is $+5$, $+5$ and $+11$ respectively. The difference in the basic character of these proteins is reflected by the difference in their affinity

for DNA: during the isolation process, the proteins HRm, HU and HTa, of which the net charge is +2, +4 and +13 respectively, are eluted from a DNA-cellulose column with an NaCl concentration of approximately 0.12 M, 0.35 M and 0.75 M respectively [1, 22, 27].

Like the other bacteria *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium meliloti* contains a single HU-type protein whereas two polypeptide chains, HU-1 and HU-2 which differ from each other by 28 residues, are present in *Escherichia coli* [9, 11, 12]. Two HU-like proteins have also been observed in *Thermoplasma acidophilum* [20] and in the cyanobacteria *Synechocystis* [21], but the differences between the two polypeptide chains within each species are very few. Thus, in *T. acidophilum* the second form of protein HTa differs only from the first one by an additional residue at the amino terminus; in the protein HS from *Synechocystis*, of which the complete primary structure remains to be established, only two microheterogeneities have been observed in the amino-terminal sequence (27 identified residues). By comparison the corresponding sequences of proteins HU-1 and HU-2 differ by 12 residues.

The comparison of the sequence of protein HRm with that of other HU-type proteins (Fig. 5) shows that substitutions occur more frequently in the amino-terminal third of the molecule. On the other hand, two sequences, indicated by the boxes, appear almost invariable and may be important in the function of the protein. They contain residues which give to these sequences a high potential for β -turn conformation: glycine residues at positions 46, 48, 60 and proline residue at position 63. Indeed a β -turn conformation is predicted for these regions when a statistical predictive method [28] is applied to proteins HU-1 and HU-2 from *E. coli* [29]. In addition to the sequences mentioned above, five residues indicated by stars in Fig. 5 are strictly conserved in all sequences of HU-type proteins determined up to now. We must also emphasize that changes observed at positions 10, 17, 25, 29, 32, 42, 71 and 85 are uniquely conservative substitutions and that at 25 positions indicated by + in Fig. 5, only one change can be observed when comparing all the known sequences.

The degree of sequence homology between the HU-type proteins and protein HU-1 taken as reference was calculated as 87%, 52% and 26% for HPa, HRm and HTa respectively. This is in good agreement with the respective phylogenetic relationships of these bacteria evidenced by Fox et al. [30]. However these sequence data are not sufficient to make a valuable statement on the structural stability of the HU-type protein and need to be completed by structural study of HU-type proteins isolated from other bacteria chosen among the major lines of the prokaryotic descent described by Fox et al. [30].

The authors are grateful to Professor J. Guillaume (Université de Lille I) who provided the cultures of *Rhizobium meliloti*. They acknowledge with pleasure the skilful technical assistance of M. J. Dupire, T. Ernout and A. Hémez. They thank also Dr G. Briand and O. Hannedouche from the *Service commun de Séquence Unité 16/124 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (Lille) for the sequencer runs. This work was supported by grant from the *Institut National de la Santé et de la*

Recherche Médicale (CRL 80.20.35) and grants from the *Centre National de la Recherche Scientifique* (*Action Thématique Programmée Chromatine* 4203 and L.A. 268).

REFERENCES

- Rouvière-Yaniv, J. & Gros, F. (1975) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **72**, 3428–3432.
- Varshavsky, A. J., Nedospasov, S. A., Bakayev, V. V., Bakayeva, T. G. & Georgiev, G. P. (1977) *Nucleic Acids Res.* **4**, 2725–2745.
- Lathe, R., Buc, H., Lecocq, J. P. & Bautz, E. K. F. (1980) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **77**, 3548–3552.
- Hübscher, U., Lutz, H. & Kornberg, A. (1980) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **77**, 5097–5101.
- Pettijohn, D. E. (1976) *CRC Crit. Rev. Biochem.* **4**, 175–202.
- Griffith, J. D. (1976) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **73**, 563–567.
- Laine, B., Sautière, P., Biserte, G., Cohen-Solal, M., Gros, F. & Rouvière-Yaniv, J. (1978) *FEBS Lett.* **89**, 116–120.
- Mende, L., Timm, B. & Subramanian, A. R. (1978) *FEBS Lett.* **96**, 395–398.
- Laine, B., Kmićik, D., Sautière, P., Biserte, G. & Cohen-Solal, M. (1980) *Eur. J. Biochem.* **103**, 447–461.
- Rouvière-Yaniv, J. (1978) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **42**, 439–447.
- Hawkins, A. R. & Wootton, J. C. (1981) *FEBS Lett.* **130**, 275–278.
- Nakayama, T. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**, 318–324.
- Imber, R., Bächinger, H. & Bickle, T. A. (1982) *Eur. J. Biochem.* **122**, 627–632.
- Haselkorn, R. & Rouvière-Yaniv, J. (1976) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **73**, 1917–1920.
- Searcy, D. G. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **395**, 535–547.
- Rouvière-Yaniv, J., Gros, F., Haselkorn, R. & Reiss, C. (1977) in *The Organisation and Expression of the Eukaryotic Genome* (Bradbury, E. M. & Javaherian, K., eds) pp. 211–231, Academic Press, New York.
- Stein, D. B. & Searcy, D. G. (1978) *Science (Wash. DC)* **202**, 219–221.
- Rouvière-Yaniv, J., Yaniv, M. & Germond, J. E. (1979) *Cell*, **17**, 265–274.
- Searcy, D. G. & Stein, D. B. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **609**, 180–195.
- De Lange, R. J., Williams, L. C. & Searcy, D. G. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 905–911.
- Aitken, A. & Rouvière-Yaniv, J. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 461–467.
- Laine, B., Bélaïche, D., Sautière, P. & Biserte, G. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106**, 101–107.
- Beringer, J. E. (1973) Ph.D. Thesis, University of East Anglia, UK.
- Edman, P. & Henschen, A. (1975) in *Protein Sequence Determination* (Needleman, S. B., ed.) 2nd edn, pp. 232–279, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hermann, J., Titani, K., Ericsson, L. H., Wade, R. D., Neurath, H. & Walsh, K. A. (1978) *Biochemistry*, **17**, 5672–5679.
- Pisano, J. J. & Bronzert, T. J. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 5597–5607.
- De Lange, R. J., Green, G. R. & Searcy, D. G. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 900–904.
- Fasman, G. D., Chou, P. Y. & Adler, A. J. (1976) *Biophys. J.* **16**, 1201–1238.
- Laine, B. (1980) Ph.D. Thesis, Université des Sciences et Techniques de Lille, France.
- Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Zablén, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B. J., Stahl, D. A., Luehrsén, K. R., Chen, K. N. & Woese, C. R. (1980) *Science (Wash. DC)* **209**, 457–463.

B. Laine, D. Bélaïche, and P. Sautière, Unité de Recherches Ultrastructurales et Biochimiques sur les Cellules Normales et Cancéreuses (Unité 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Institut de Recherches sur le Cancer, Cité Hospitalière, 2 Place de Verdun, F-59020 Lille-Cedex, Nord, France

H. Khanaka, Laboratoire de Microbiologie, Université des Sciences et Techniques de Lille, F-59655 Villeneuve-d'Ascq, Nord, France

PUBLICATION 3

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF DNA-BINDING HU-TYPE
PROTEINS FROM *RHIZOBIACEAE*

Hussain KHANAKA¹, Bernard LAINE¹, Pierre SAUTIERE¹ and
Jean GUILLAUME²

¹Unité Associée CNRS 409 Place de Verdun 59045 Lille Cédex, France

²Laboratoire de Microbiologie, Université des Sciences et Techniques
de Lille I 59655 Villeneuve d'Ascq

soumise à Eur.J.Biochem.

SUMMARY

The physico-chemical and structural properties of DNA-binding HU-type proteins from several species of *Rhizobiaceae* were compared. These include *Rhizobium meliloti*, two strains of *Rhizobium leguminosarum* displaying highly different phenotypic characters and *Agrobacterium tumefaciens*.

HU-type proteins isolated from *R. leguminosarum* L18 and *A. tumefaciens* are identical and show slight differences with the *R. meliloti* HU-type protein. On the other hand the *R. leguminosarum* L53 HU-type protein is quite different from the proteins cited above ; several amino acid substitutions encountered in this protein result in significant changes in the folding of the polypeptide chain.

The biochemical characteristics of these proteins are in good agreement with the respective position of these bacteria in the phylogeny determined by numerical taxonomy.

Abbreviations :

PhMeSO₂F, phenylmethylsulfonyl fluoride ;

TosPheCH₂Cl, N-tosylphenylalanyl chloromethane

Enzymes :

Carboxypeptidase A (E.C. 3.4.17.1) ;

Trypsin (E.C. 3.4.21.4)

INTRODUCTION

The *E. coli* DNA-binding protein HU [1] is a heterotypic dimer which consists of two polypeptides of 90 residues each [2] displaying closed sequence homology [3, 4]. Protein HU protects DNA from thermal denaturation [5] and can fold up circular double stranded DNA into nucleosome like structure [6]. This protein which is associated with the chromosomal and extrachromosomal DNA [7, 8] is assumed to be involved in the condensation of the DNA. Furthermore protein HU stimulates the enzymatic replication of the chromosomal origin of *E. coli* [9] and modulates transcription [1, 10]. HU-type proteins have been isolated from a variety of bacterial families [11 - 17] and amino-acid sequence data show for these proteins a good degree of structural stability [18, 19] when compared to that of other prokaryotic proteins such as cytochromes [20]. Our aim is to investigate the extent of structural stability of HU-type proteins within the family *Rhizobiaceae* which has been shown to be highly heterogeneous [21]. The current classification based upon host infectivity recognizes six species which are distributed into two biochemically very different groups : the slow growing *Rhizobia* and the fast growing *Rhizobia* in which the genus *Agrobacterium* is included because of their close taxonomic relationship. A previous work showed that the physico-chemical properties of the HU-type protein

isolated from the slow growing *R. japonicum* differ markedly from those of homologous proteins from fast growing Rhizobia [22]. This paper deals with the comparison of the physico-chemical and structural properties of HU-type proteins from fast growing Rhizobia. On the basis of phenotypic characters, several species, such as *Rhizobium meliloti* and *Agrobacterium*, appear homogeneous whereas others are heterogeneous [23]. One strain of *R. meliloti* and *Agrobacterium tumefaciens* and two strains of *R. leguminosarum* displaying highly different phenotypic characters were chosen for our study.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Rhizobium meliloti strain 2011 str. 3 (from Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles, FRANCE), *Agrobacterium tumefaciens* strain B 6 (from Rijksuniversiteit, Gent, BELGIUM), *Rhizobium leguminosarum* strains L18 and L53 (from Research Institute of Ontario, CANADA) were grown as described in [24].

Carboxypeptidase A (treated with PhMeSO_2F) was obtained from Worthington. Acetonitrile for reverse phase high pressure liquid chromatography was from Carlo Erba. All solvents and reagents for sequence determination were as indicated in [18].

Nomenclature of proteins

HU-type proteins from *Rhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum* L18 and L53 were respectively named HRm, HAt, HR118 and HR153.

Isolation of proteins

HU-type proteins were prepared by affinity chromatography on a DNA-cellulose column and purified by gel filtration chromatography as in [22].

Analytical gel electrophoresis

Analytical gel electrophoresis was performed on polyacrylamide slab gel (150 x 140 x 0.75 mm) in 0.9 M acetic acid, 2.5 M urea [25] using a 17 % acrylamide concentration.

Generation of peptides

Proteins were digested with TosPheCH₂Cl-trypsin in 0.1 M N-methylmorpholine acetate at pH 8.0 and 37°C for 4 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1:50. Cleavage of protein HR153 at aspartyl residues was performed with 0.25 M acetic acid (10 mg of protein/ml of acetic acid) in an evacuated sealed tube for 15 h at 105°C.

Fractionation of peptides

The tryptic digests and the acid hydrolysate were freeze-dried and submitted to fractionation by reverse-phase high-pressure liquid chromatography as in [18] on a C₁₈ micro-Bondapak column. Alternatively peptides were separated by chromatography or electrophoresis on thin layer sheets (Polygram cel 300 from Macherey-Nagel, Germany) using solvent or buffer systems described in [26]. Amino acid analyses of proteins and peptides were performed as in [18].

Sequence determination

Automated Edman degradation was carried out in a Beckman 890 C sequencer ; in the presence of polybrene [27], and using 0.33 M quadrol as coupling buffer for the native protein HAt, and using 0.1 M quadrol for large peptides. Manual Edman degradation of small peptides was performed as in [28]. The phenylthiohydantoin derivatives of amino acids were identified and quantified by high-pressure liquid chromatography as indicated in [16].

Carboxy-terminal analysis

The HU-type proteins (30 nmol) dissolved in 1.0 ml of 0.2 M N-methyl-morpholine acetate pH 8.0, were digested at 37°C with carboxypeptidase A (5 µg, 0.2 unit). At 1 h and 2 h, aliquots were taken off, acidified with glacial acetic acid and freeze-dried. The released amino acids were analysed on an amino acid analyser.

Nomenclature of peptides

Peptides derived from cleavage at aspartyl residues and tryptic peptides were designated by Ac- and T- respectively. The peptides were numbered according to their position in the sequence of the proteins.

RESULTS

Proteins HR118 and HR153 were prepared by a procedure already used for the isolation of proteins HRm and HAt [16,22]. This procedure consists of affinity chromatography on a DNA-cellulose column followed by gel filtration chromatography. The purity of the proteins was assessed by polyacrylamide gel electrophoresis (Fig.1). In acidic medium and in the presence of 2.5 M urea, proteins HR118 and HAt have an identical migration whereas protein HR153 exhibits a higher cathodic migration. On the other hand, by comparison with protein HRm taken as reference, the migration of proteins HR118 and HAt is slower and that of protein HR153 is faster. Similar electrophoretic behaviours were observed in the presence of 6 M urea and 0.38 % Triton X-100 (data not shown).

The amino acid compositions of proteins HRm, HAt, HR118 and HR153 are presented in Table 1. The amino acid compositions of proteins HAt and HR118 are strictly identical and appear closely related to that of protein HRm, particularly in their number of hydrophobic and basic residues. On the other hand protein HR153 differs significantly from proteins HR118 and HAt by an additional residue of proline and one residue of histidine, and also by its content in threonine, serine and glutamic acid.

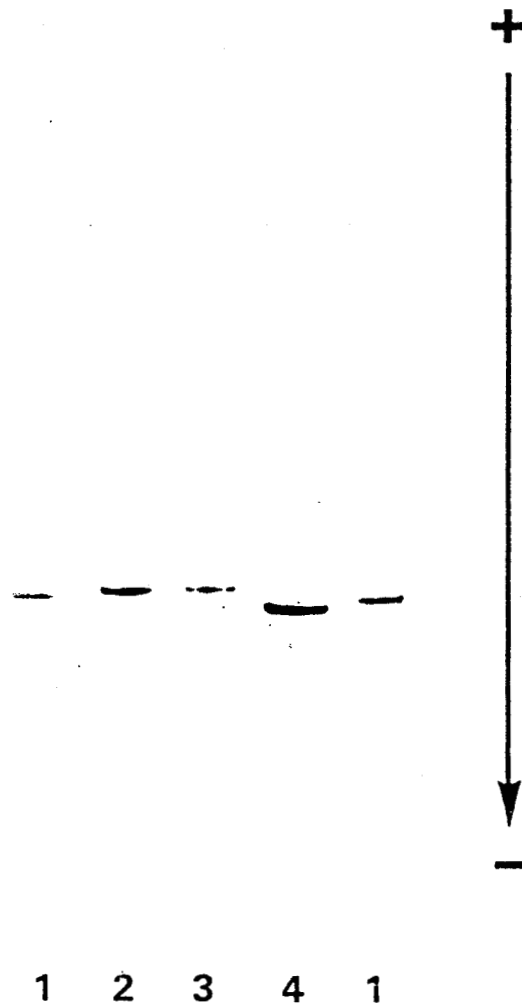


Fig. 1 : Polyacrylamide gel electrophoresis of purified HU-type proteins : HRm (1), HAt (2), HR118 (3) and HR153 (4). 3 μ g samples in 0.01 M HCl, 8 M urea, 0.5 M 2-mercaptoethanol were applied to the gel. Electrophoresis was performed at 22 mA for 3 h. in 0.9 M acetic acid - 2.5 M urea on a gel containing 17 % acrylamide. The gel was stained overnight with 0,5 % Coomassie blue R-250 in acetic acid/ethanol/water (1 : 2 : 7, by vol.) and destained by diffusion in acetic acid/ethanol/water (4 : 5 : 31, by vol.).

TABLE 1 AMINO ACID COMPOSITIONS OF HU-TYPE PROTEINS FROM
R. MELILOTI (HRm), *A. TUMEFACIENS* (HAt), *R. LEGUMINOSARUM* L18 (HR118)
 AND *R. LEGUMINOSARUM* L53 (HR153)

Amino acids	HRm [16]	HAt [22]	HR118	HR153
Aspartic acid	13	11	10.7 (11) ^a	11.8 (12) ^a
Threonine ^b	3	3	3.1 (3)	4.8 (5)
Serine ^b	7	10	9.5 (10)	6.0 (6)
Glutamic acid	6	7	7.1 (7)	5.2 (5)
Proline	3	3	3.0 (3)	3.9 (4)
Glycine	10	9	8.9 (9)	9.0 (9)
Alanine	13	14	13.7 (14)	14.1 (14)
Cysteine	-	-	0 -	0 -
Valine	9	9	9.0 (9)	9.8 (10)
Methionine	1	1	1.1 (1)	1.0 (1)
Isoleucine ^c	3	2	2.1 (2)	2.0 (2)
Leucine	5	5	5.1 (5)	5.0 (5)
Tyrosine	-	-	0 -	0 -
Phenylalanine	4	4	3.9 (4)	4.0 (4)
Histidine	-	-	0 -	1.0 (1)
Lysine	8	8	8.0 (8)	8.8 (9)
Arginine	5	5	4.8 (5)	3.9 (4)
TOTAL	90	91	91	91

The results are expressed in number of residues per mole of protein

a Number in parentheses is the nearest integer

b Values for threonine and serine were obtained by linear extrapolation to zero hydrolysis time

c 72 h hydrolysis values

Strategy used for the determination of the amino acid sequence of proteins HAt, HR118 and HR153

The tryptic peptides generated from each protein were characterized by their elution volume from the C₁₈ micro-Bondapak column on which they were fractionated, their amino acid composition and amino acid sequence. As they were identical or showed very slight differences with those of protein HRm, they were aligned by comparison with the amino acid sequence of protein HRm which has been completely determined [18]. Furthermore the amino terminal sequence of protein HAt was confirmed by the data provided from automated sequence analysis of the native molecule. The complete sequence of protein HR153, which presents a large number of differences by comparison with protein HRm, was established from additional data provided by large overlapping peptides generated by cleavage at aspartyl residues.

Amino acid sequence of protein HAt

The elution pattern of protein HAt tryptic peptides separated by reverse-phase HPLC is presented in Fig. 2 in comparison with those of the tryptic peptides of proteins HRm, HR118 and HR153. The hatched fractions correspond to peptides common to the four proteins. All the protein HAt peptides were obtained pure except peptide T-6 eluted in fraction 1 together with free

Fig. 2 : Elution patterns of tryptic peptides from proteins HRm, HAt, HR118 and HR153 fractionated by reverse-phase high pressure liquid chromatography. The hydrolysates were loaded on a C₁₈ micro Bondapak column (0.39 x 30 cm) equilibrated with 0,05 % trifluoroacetic acid. Peptides were eluted with a linear gradient (----) from 0 to 30 % of acetonitrile in 0,05 % trifluoroacetic acid. Fractions of 0.8 ml were collected at a flow rate of 2 ml/min. The elution of peptides was monitored at 210 nm. The fractions used for sequence determination were numbered by order of elution. The hatched fractions correspond to peptides common to the four proteins. The unnumbered fractions correspond to peptides generated by partial cleavage of susceptible bonds and which were not used for the sequence analysis of the proteins.

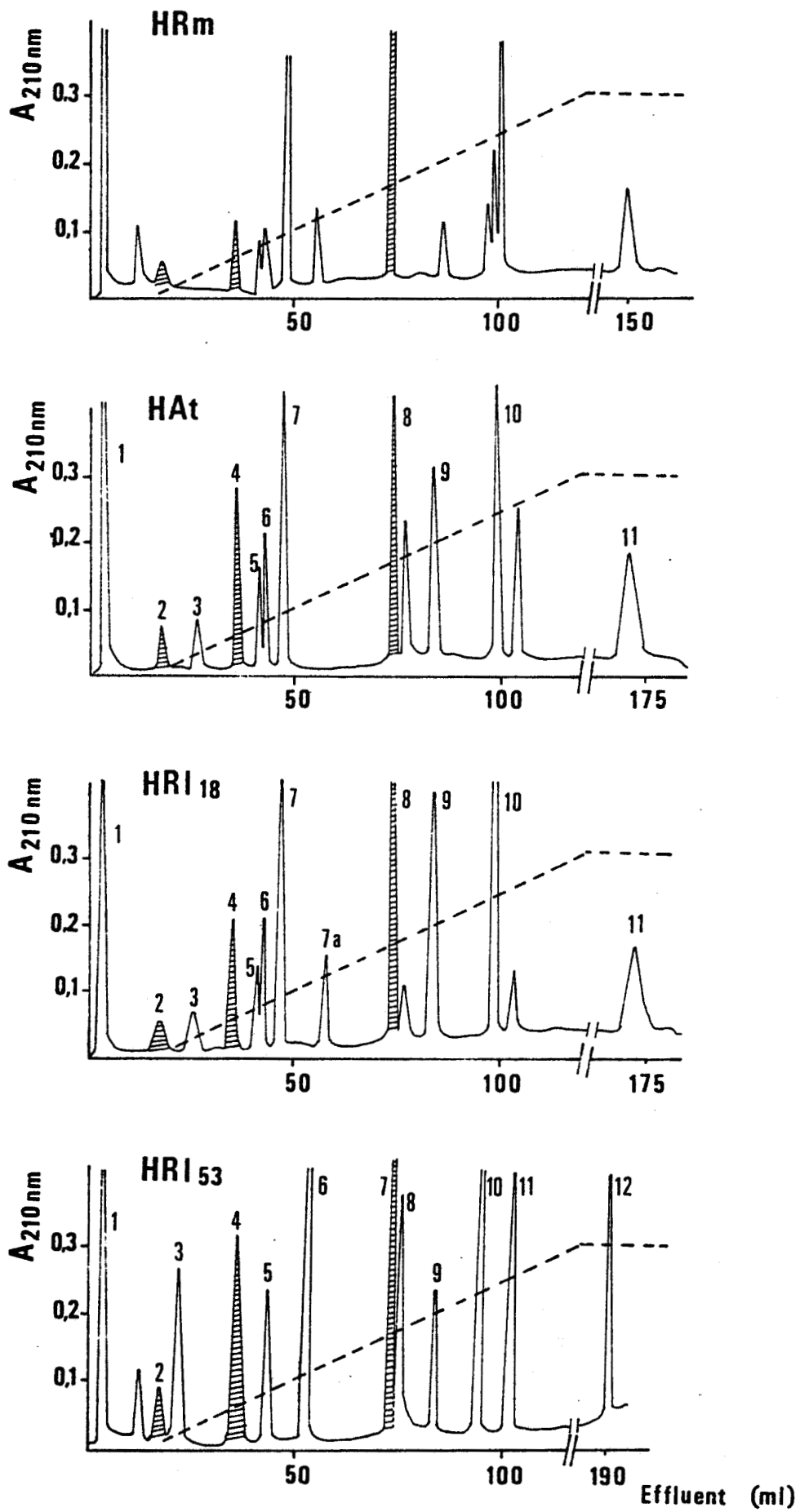


Fig. 2

arginine from which it was separated by thin-layer chromatography. Their amino acid composition are given in Table 2 and their alignment in comparison with the primary structure of protein HRm is given in Fig. 3. The incomplete cleavage of the Lys₃-Asn₄ bond yielded the peptides T-1 and T-1-a. The amino terminal amino acid sequence of protein HAt determined by the structural study of peptides T-1, T-1-a, T-2 and T-3 was ascertained up to residue 26 by the data provided from automated Edman degradation of the protein. In peptide T-5 two residues of serine and one residue of arginine were not positively identified but as the arginyl residue is assigned at the carboxy terminus of this peptide from the specificity of the trypsin, the two residues of serine were unambiguously placed at positions 51 and 53.

The bond Arg₆₁-Asn₆₂ is cleaved with a low yield and the peptide T-7 covering the sequence 60-74 was obtained predominantly to the peptide which covers the sequence 62-74. In protein HRm [18] this bond was also resistant to trypsin and to protease from submaxillary gland of mouse. On the other hand, digestion of protein HAt with carboxypeptidase A for 2 h released the following residues (mol/mol protein) : serine 0.9, asparagine 0.9, valine 0.8 and alanine 0.7. These results thus confirm the presence of a residue of serine at the carboxy-terminus of protein HAt as shown by the

TABLE 2 AMINO ACID COMPOSITION OF TRYPTIC PEPTIDES FROM *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* PROTEIN HAT

Amino acids	T-1 residues 1-13	T-2 residues 14-18	T-3 residues 19-37	T-4 residues 38-43	T-5 residues 44-54	T-6 residues 56-59	T-7 residues 60-74	T-8 residues 75-78	T-9 residues 79-83	T-10 residues 84-86	T-11 residues 87-91	Protein HAt
Aspartic acid	2,0(2)		2,1(2)	2,2(2)			1,9(2)	1,0(1)			2,0(2)	11
Threonine		1,0(1)	0,9(1)				1,0(1)					3
Serine	1,1(1)		2,0(2)		2,8(3)	0,9(1)	1,2(1)		1,0(1)		1,1(1)	10
Glutamic acid	2,1(2)		2,9(3)			1,0(1)	1,0(1)					7
Proline							1,9(2)	1,0(1)				3
Glycine		1,0(1)		2,3(2)	2,4(2)		2,2(2)		1,1(1)	1,1(1)		9
Alanine	2,1(2)	1,1(1)	4,8(5)		1,2(1)	1,0(1)	2,2(2)		1,1(1)		1,0(1)	14
Valine	1,9(2)		2,8(3)		1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)			1,0(1)	9
Methionine	0,5(1)											1
Isoleucine				0,9(1)			0,8(1)					2
Leucine	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)		1,2(1)					1,0(1)		5
Phenylalanine			1,0(1)		1,8(2)				0,9(1)			4
Lysine	1,8(2)	0,9(1)	0,9(1)			1,0(1)		1,0(1)	0,9(1)	0,9(1)		8
Arginine				1,0(1)	1,0(1)		1,8(2)					5
Number of residues	13	5	19	6	11	4	15	4	5	3	5	91
Fraction number	9	6	11	5	10	1	8	4	7	2	3	

Results are expressed as the number of residues/mol. peptide. Values in parentheses are residues/mol. derived from the final sequence

Fig. 3 : Amino acid sequences of proteins HAt and HR118, --- and --- correspond to tryptic peptides from proteins HAt and HR118 respectively. The peptides of both proteins were aligned by comparison with the primary structure of protein HRm [18]. Methods used for determination of the sequence are indicated as follows : (+), automated Edman degradation (AED) of protein HAt; --- , manual Edman degradation; --- , carboxypeptidase hydrolysis of proteins.

structural data obtained from peptide T-11.

The tryptic peptides account for 90 of the 91 residues present in the protein (Table 2). The missing residue corresponds to free arginine eluted in fraction 1 (Fig. 2) and which is released by cleavage of the Arg₅₄-Arg₅₅ bond.

Amino acid sequence of protein HR118

The elution pattern of the tryptic peptides from protein HR118 is almost identical to that of tryptic peptides from protein HAt (Fig. 2). It differs only from the latter by the presence of an additional fraction (fraction 7a) which corresponds to the peptide T-10 a (residues 84 to 91) (Fig. 3), generated by the incomplete cleavage of the bond Lys₈₆-Asp₈₇. Peptide T-6 eluted in fraction 1 was separated from free arginine by thin-layer chromatography.

The amino acid compositions of the tryptic peptides from protein HR118 are given in table 3. The comparison of these peptides with the homologous peptides from protein HAt shows a complete identity between the two sets of peptides with respect to elution volumes, amino acid compositions and amino terminal sequences. It can be assumed therefore that the primary structure of protein HR118 is identical to that of protein HAt (Fig. 3).

TABLE 3 AMINO ACID COMPOSITION OF TRYPTIC PEPTIDES FROM *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* L18 PROTEIN HR118

Amino acids	T-1 residues 1-13	T-2 residues 14-18	T-3 residues 19-37	T-4 residues 38-43	T-5 residues 44-54	T-6 residues 56-59	T-7 residues 60-74	T-8 residues 75-78	T-9 residues 79-83	T-10 residues 84-86	T-11 residues 87-91	Protein HR118
Aspartic acid	2,0(2)		2,4(2)	2,1(2)			2,0(2)	1,1(1)			1,9(2)	11
Threonine		0,9(1)	1,0(1)				1,0(1)					3
Serine	1,1(1)		1,9(2)		2,8(3)	1,0(1)	1,0(1)		1,1(1)		1,0(1)	10
Glutamic acid	1,9(2)		3,2(3)			1,1(1)	1,1(1)					7
Proline							2,0(2)	1,0(1)				3
Glycine		1,7(1)		2,4(2)	2,1(2)		2,0(2)		1,2(1)	1,2(1)		9
Alanine	1,9(2)	1,1(1)	4,6(5)		1,1(1)	0,9(1)	2,0(2)		1,0(1)		1,0(1)	14
Valine	1,9(2)		2,8(3)		1,0(1)		1,1(1)	1,0(1)			1,1(1)	9
Methionine	0,2(1)											1
Isoleucine				0,7(1)			1,0(1)					2
Leucine	1,0(1)	1,0(1)	1,1(1)		1,0(1)					1,0(1)		5
Phenylalanine			1,1(1)		1,9(2)				0,9(1)			4
Lysine	1,7(2)	1,0(1)	0,8(1)			1,0(1)		1,0(1)	0,9(1)	1,0(1)		8
Arginine				0,7(1)	1,0(1)		1,8(2)					5
Number of residues	13	5	19	6	11	4	15	4	5	3	5	91
Fraction number	9	6	11	5	10	1	8	4	7	2	3	

The tryptic peptides T-11 and T-10a which are devoided of basic residues are placed at the carboxy-terminus of protein HR118 from the specificity of the trypsin. Their sequence fit the carboxy-terminal sequence of protein HR118 established as Ala-Val-Asn-Ser after digestion of the protein with carboxypeptidase A.

Amino acid sequence of protein HR153

The peptides derived from protein HR153 by tryptic digestion and cleavage at aspartyl residues were fractionated by reverse-phase high-pressure liquid chromatography : their elution patterns are presented in figures 2 and 4 respectively. Peptides T-4 and T-7 which coeluted in fraction 1 were separated by thin-layer electrophoresis and peptides T-5 and T-9 which coeluted in fraction 4 were purified by thin-layer chromatography. All others peptides were obtained pure directly. The amino acid compositions and the alignment of tryptic and acetic peptides from protein HR153 are presented in table 4 and figure 5 respectively.

The amino-terminal sequence of protein HR153 (residues 1-19) was determined from data provided by peptides T-1, T-1-b, T-2 and Ac-1. The alignment T-2 - T-3 was established with peptide Ac-1 since only peptide T-3 has a serine residue at its amino-terminus. The amino-terminal sequence of peptide T-3 was determined by manual Edman degradation up to residue 32.

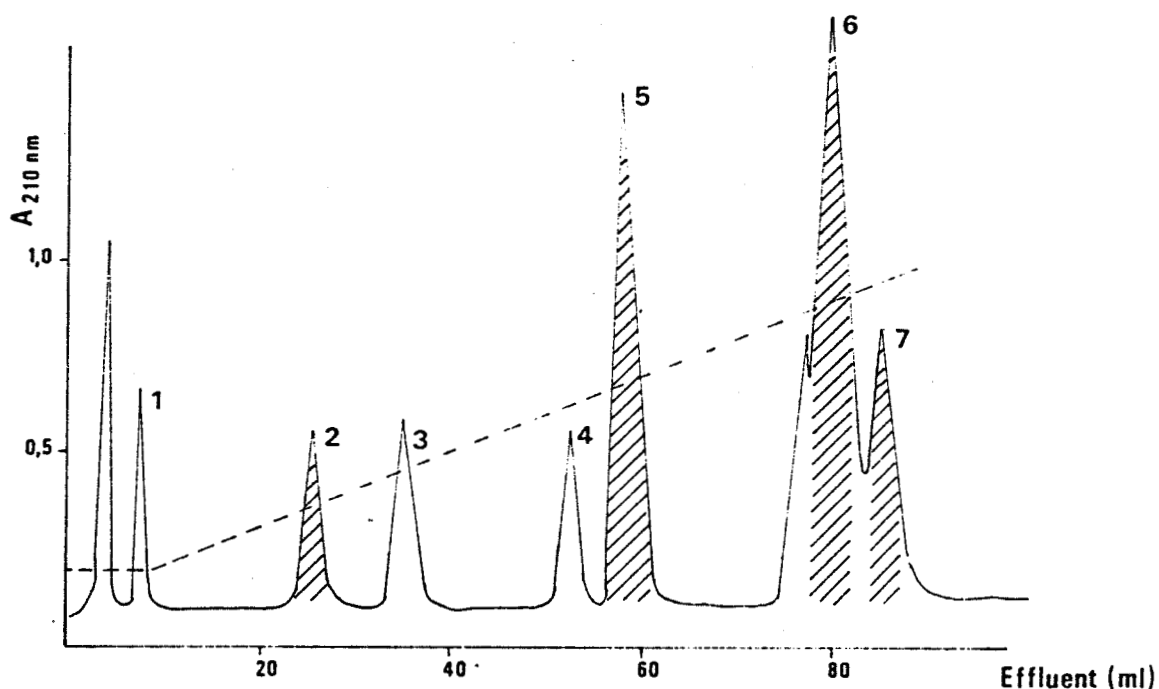


Fig. 4 : Elution pattern of peptides generated by cleavage of protein HR153 at aspartyl residues and fractionated by reverse-phase high pressure liquid chromatography. The hydrolysate (600 nM) was loaded on a column of C₁₈ micro Bondapak (0,39 x 30 cm) equilibrated with 5 % acetonitrile in 0.05 % trifluoroacetic acid. The column was eluted with a linear gradient (----) from 5 to 25 % acetonitrile in 0,05 % trifluoroacetic acid. Fractions of 0.8 ml were collected at a flow rate of 2 ml/min. The elution of peptides was monitored at 210 nm. Hatched fractions correspond to peptides used for sequence determination.

TABLE 4 AMINO ACID COMPOSITION OF TRYPTIC PEPTIDES AND OF LARGE ACETIC ACID
FRAGMENTS FROM *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* L53 PROTEIN HR153

Amino acids	T-1 residues 1-13	T-2 residues 14-18	T-3 residues 19-37	T-4 residues 38-39	T-5 residues 40-43	T-6 residues 44-55	T-7 residues 56-59	T-8 residues 60-74	T-9 residues 75-78	T-10 residues 79-83	T-11 residues 84-86	T-12 residues 87-91	Ac-1 residues 1-19	Ac-4 residues 31-40	Ac-5 residues 42-69	Ac-6 residues 71-86	Protein HR153	
Aspartic acid	2,2(2)		3,0(3)	1,0(1)	1,1(1)			2,0(2)	1,1(1)			1,9(2)	2,2(2)	1,1(1)	1,4(1)	1,2(1)	12	
Threonine		0,9(1)				1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)		1,0(1)			1,2(1)		2,9(3)	1,0(1)	5	
Serine	1,1(1)		2,0(2)			2,0(2)		1,0(1)					1,9(2)		2,8(3)		6	
Glutamic acid	2,1(2)		2,2(2)					1,1(1)					2,0(2)	2,1(2)	1,4(1)		5	
Proline								1,9(2)	1,0(1)	1,0(1)					0,9(1)	2,9(3)	4	
Glycine		1,0(1)			1,2(1)	2,2(2)		2,0(2)		1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,1(1)	0,9(1)	3,3(4)	1,6(2)	9	
Alanine	2,1(2)	1,0(1)	4,8(5)			1,2(1)	2,0(2)	2,0(2)					0,9(1)	3,2(3)	1,1(1)	4,1(4)	1,1(1)	14
Valine	2,4(2)		3,6(4)			1,4(1)		1,2(1)	1,0(1)				1,2(1)	2,0(2)	1,8(2)	2,1(2)	1,1(1)	10
Methionine	0,3(1)												0,5(1)					1
Isoleucine					0,9(1)			0,9(1)							0,9(1)	1,0(1)		2
Leucine	1,0(1)	1,0(1)	1,1(1)			1,1(1)					1,0(1)		1,9(2)	1,1(1)	1,3(1)	1,0(1)		5
Phenylalanine			1,1(1)			2,1(2)				1,0(1)					1,9(2)	1,0(1)		4
Lysine	1,7(2)	1,0(1)	0,8(1)	1,0(1)			1,0(1)		0,9(1)	1,0(1)	0,9(1)		2,7(3)	2,0(2)	1,3(1)	3,0(3)		9
Histidine						1,0(1)									0,9(1)			1
Arginine					0,9(1)	1,1(1)		1,9(2)							2,7(3)	1,1(1)		4
Number of residues	13	5	19	2	4	12	4	15	4	5	3	5	19	10	28	16		91
Fraction number	9	5	12	1	4	10	1	7	4	6	2	3	7	2	6	5		

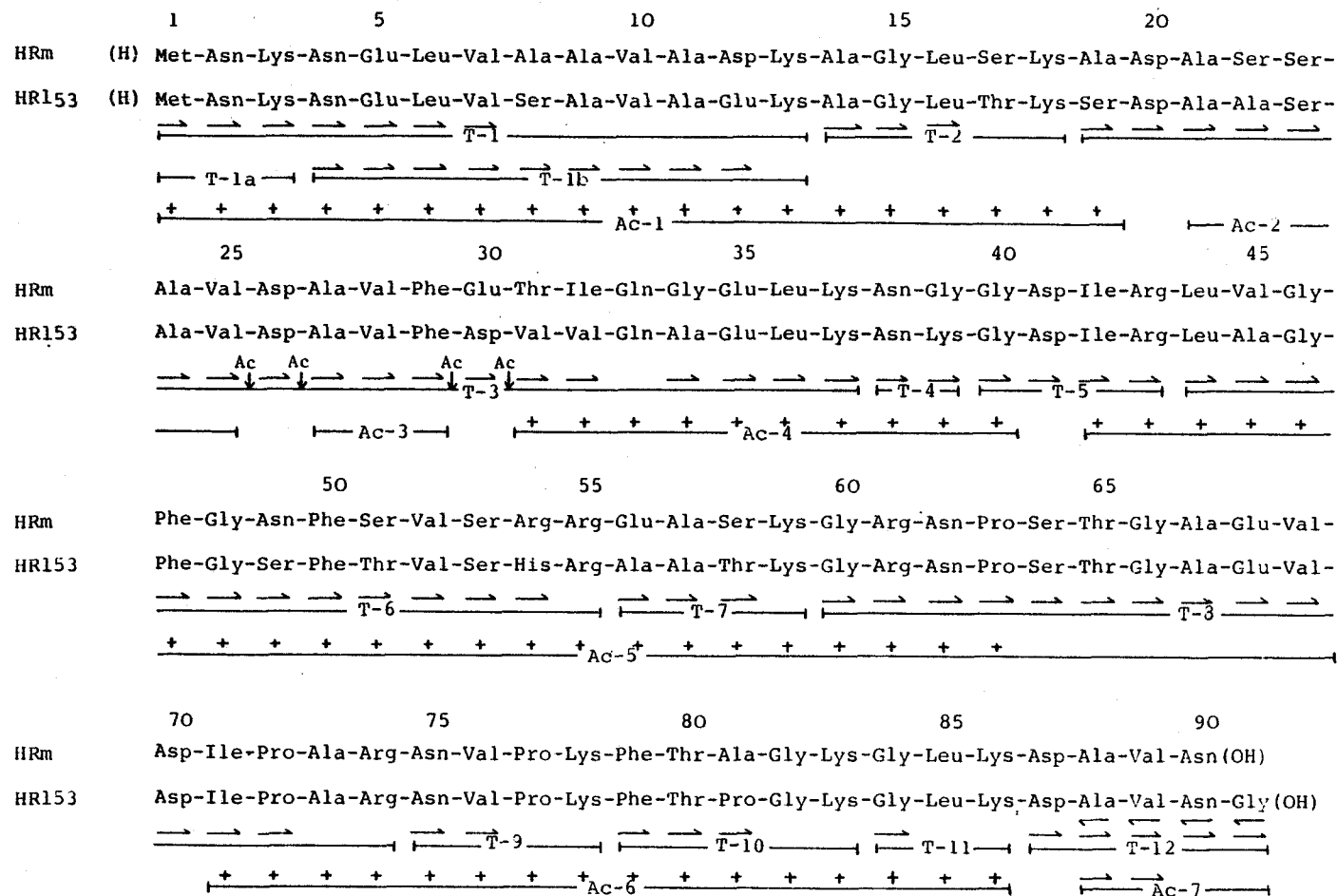


Fig. 5 : Complete amino acid sequence of protein HR153. Methods used for determination of the sequence are indicated as follows : \longrightarrow , manual Edman degradation of peptides ; + , automated Edman degradation of peptides ; \longleftarrow , carboxypeptidase hydrolysis of protein.

Peptide T-3 was then submitted to acetic acid hydrolysis and the sequence of the carboxy-terminal fragment (residues 31-37) was completely determined by manual Edman degradation. Peptide Ac-4 overlaps peptides T-3, T-4 and T-5 ; although Ac-4 covers only the amino-terminus of peptide T-5, the alignment T-4 - T-5 is the unique one fitting with the remainder of the sequence of protein HR153.

The sequence 42 to 74 was determined from data provided by peptides T-5, T-6, T-7, T-8 and Ac-5. This sequence was brought up to residue 86 by peptide Ac-6 which overlaps peptides T-8, T-9, T-10 and T-11. No overlap of peptides T-11 and T-12 was provided but peptide T-12 which lacks basic residues, was assigned to the carboxy terminus of protein HR153. Furthermore, the data provided from digestion of protein with carboxypeptidase A are in good agreement with the carboxy-terminal position of peptide T-12, in the sequence of the protein.

DISCUSSION

The proteins HAt and HR118 exhibit identical electrophoretic mobilities, have identical amino acid compositions and the structural studies indicate that both proteins have the same amino acid sequence. On the other hand protein HR153 differs from proteins HAt and HR118 by its higher electrophoretic mobility in acidic medium, its amino acid composition and by 12 substitutions. The substitutions Thr \rightarrow Val and Ser \rightarrow Ala observed at positions 31 and 34 respectively, modify the hydrophobicity of this segment. As a result of the substitution Ala \rightarrow Pro at position 81 the carboxy-terminal sequence of protein HR153 contains three residues of proline which gives to this region (residues 72-81) a highly folded conformation. Furthermore this substitution is of importance in an evolutionary point of view since the number and the position of the residues of proline are very well conserved in HU-type proteins sequences [18,19]. However, a proline residue has been observed at position 81 in HU-type protein from *B.stearothermophilus* [19]. The change Gly \rightarrow Lys at position 39 must be emphasized since Gly is strictly conserved at this position in all sequences of HU-type proteins determined up to now [18,19]. This residue is located in a β -turn between helix α_2 (residues 21-37) and β pleated sheet strand 1 (residues 40-44) and plays a crucial role in the tertiary structure of the molecule [29]. Protein HR153 contains a residue of histidine at position 54; the presence of histidine is seldom observed in HU-type proteins, but the change Arg \rightarrow His

has also been encountered in protein HU-2 from *E. coli* [3, 4]. In protein HR153, the loss of a positive charge induced by the substitution Arg → His is balanced by the change Glu → Ala at position 56. Thus the net charge of the hydrophilic domain (residues 54-62) is identical in the proteins HAt, HR118 and HR153. According to TANAKA [29] and LAMMI [30] this hydrophilic domain is presumably involved in the binding of the protein to the DNA whereas the hydrophilic region located between residues 37 and 43, would not interact with the DNA. This could therefore explain why the substitution Gly → Lys at position 39 in protein HR153 which has a net charge of + 3, does not increase the affinity of the protein for the DNA-cellulose as compared to proteins HAt and HR118, the net charge of which is + 2. Indeed each of the three proteins is adsorbed on the DNA-cellulose column at 50 mM NaCl, and is eluted by increasing the salt molarity to 170 mM.

The strains of *Rhizobium leguminosarum* exhibit a large diversity and are scattered in several groups presenting different phenotypic characters [23]. Our results substantiate the heterogeneity of the species *R. leguminosarum* since the HU-type proteins isolated from the strains L18 and L53, which are placed in two different groups, appear quite different from each other. On the other hand proteins HR118 and HAt isolated from strains which are found in the same group show identical biochemical properties and amino acid

Fig. 6 : Comparison of the amino acid sequences of HU-type proteins from different Rhizobiaceae. Protein HRm is given in full ; for the other proteins, only the residues which differ from protein HRm sequence are mentioned. + and * correspond respectively to conservative and non conservative substitutions between protein HRm and proteins HAt, HR118 and HR153.

HR _m	1	5	10	15	20	
HA _t						
HR118						
HR153						
HR _m	25	30	35	40		
HA _t						
HR118						
HR153						
HR _m	45	50	55	60	65	
HA _t						
HR118						
HR153						
HR _m	70	75	80	85	90	
HA _t						
HR118						
HR153						

Met-Asn-Lys-Asn-Glu-Leu-Val-Ala-Ala-Val-Ala-Asp-Lys-Ala-Gly-Leu-Ser-Lys-Ala-Asp-Ala-Ser-
 Ser-Ala-Val-Asp-Ala-Val-Phe-Glu-Thr-Ile-Gln-Gly-Glu-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg-Leu-
 Val-Gly-Phe-Gly-Asn-Phe-Ser-Val-Ser-Arg-Arg-Glu-Ala-Ser-Lys-Gly-Arg-Asn-Pro-Ser-Thr-Gly-
 Ala-Glu-Val-Asp-Ile-Pro-Ala-Arg-Asn-Val-Pro-Lys-Phe-Thr-Ala-Gly-Lys-Gly-Leu-Lys-Asp-Ala-Val-Asn

Fig. 6

sequences. Therefore the strains located within one group defined by numerical taxonomy have HU-type proteins exhibiting close similarities.

A closer phylogenetic distance is observed between protein HRm and proteins HAt or HR118 than between proteins HRm and HR153. By comparison with the amino acid sequence of protein HRm (Fig. 6), proteins HAt and HR118 present eight conservative and one non conservative substitutions whereas protein HR153 shows 17 substitutions, five of which are not conservative. In addition to these substitutions the three proteins have an additional residue at the carboxy-terminus. Crossed immunoprecipitation experiments show that proteins HAt and HR118 react almost as strongly as protein HRm against anti-protein HRm immunoglobulins while protein HR153 reacts very weakly. We can therefore infer that the antigenic sites of HU-type proteins overlap one or both of the sequences defined by residues 30 through 39 and 51 through 58 where most of the differences between protein HR153 and proteins HAt or HR118 are encountered.

Quite different physico-chemical and immunochemical properties between HU-type proteins from slow-growing and fast-growing species of Rhizobiaceae were previously reported [22]. That previous work and the results dealing with the structural variability of HU-type proteins from fast growing Rhizobiaceae indicate that the phylogenetic relationships of these proteins are in good agreement with the respective taxonomical position of these bacteria.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to M. CATTEAU for the choice of bacterial strains. They acknowledge with pleasure the skilful technical assistance of F. BOUTTEAU, A. DECK, M.J. DUPIRE, T. ERNOUT and A. HEMEZ. They thank also D. BELAICHE, O. HANNEDOUCHE and A. LEMAIRE from the Service commun de Séquence Unité 16 INSERM, Unité 409 CNRS for sequencer runs. This work was supported by grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (CRL 80.20.35).

REFERENCES

1. Rouvière-Yaniv, J. & Gros, F. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3428-3432.
2. Laine, B., Sautière, P., Biserte, G., Cohen-Solal, M., Gros, F. & Rouvière-Yaniv, J. (1978) *FEBS Lett.* 89, 116-120.
3. Mende, L., Timm, B. & Subramanian, A.R. (1978) *FEBS Lett.* 96, 395-398.
4. Laine, B., Kmiécik, D., Sautière, P., Biserte, G. & Cohen-Solal, M. (1980) *Eur. J. Biochem.* 103, 447-461.
5. Rouvière-Yaniv, J., Gros, F., Haselkorn, R. & Reiss, C. (1977) in *The Organisation and Expression of the Eukaryotic Genome* (Bradbury, E.M. & Javaherian, K., eds) pp. 211-231, Academic Press, New York.
6. Rouvière-Yaniv, J., Yaniv, M. & Germond, J.E. (1979) *Cell* 17, 265-274.
7. Varshavsky, A.J., Nedospasov, S.A., Bakayev, V.V., Bakayeva, T.G. & Georgiev, G.P. (1977) *Nucleic Acids Res.* 4, 2725-2745.
8. Wu, F.Y.H., Kolb, A. & Buc, H. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 696, 231-238.
9. Dixon, N.E. & Kornberg, A. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 424-428.

10. Losso, M.A., Miano, A., Gianfranceschi, G.L. & Gualerzi, C.O. (1982) *Biochem.Int.* 5, 423-427.
11. Hawkins, A.R. & Wootton, J.C. (1981) *FEBS Lett.* 130, 275-278.
12. Nakayama, T. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 318-324.
13. Imber, R., Bächinger, H. & Bickle, T.A. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122, 627-632.
14. Haselkorn, R. & Rouvière-Yaniv, J. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1917-1920.
15. Searcy, D.G. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 395, 535-547.
16. Laine, B., Belaïche, D., Sautière, P. & Biserte, G. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 101-107.
17. Dijk, J., White, S.W., Wilson, K.S. & Appelt, K. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 4003-4006.
18. Laine, B., Bélaïche, D., Khanaka, H. & Sautière, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* 131, 325-331.
19. Kimura, M. & Wilson, K.S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 4007-4011.
20. Van Beeumen, J. (1980) in *28th Colloquium protides of the biological fluids* (Peeters, H. ed) Brussels 28, pp. 61-68.

21. Elkan, G.H. (1981) *Int. Review Cytology, Suppl.*
13, 1-13.
22. Khanaka, H., Laine, B., Sautière, P. & Guillaume, J.
(1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 471-477.
23. Catteau, M., Legrand, M.D., Khanaka, H. & Guillaume, J.
(1984) *Syst. Appl. Microbiol.* (submitted for publication).
24. Beringer, J.E. (1973) "Genetic studies with *Rhizobium leguminosarum*"
ph. D. Thesis, University of East Anglia, United Kingdom.
25. Panyim, S. & Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 337-346.
26. Sautière, P., Moschetto, Y., Dautrevaux, M. & Biserte, G. (1970) *Eur. J. Biochem.* 12, 222-226.
27. Hunkapiller, M.W. & Hood, L.E. (1978) *Biochemistry* 17, 2124-2133.
28. Edman, P. & Henschen, A. (1975) in *Protein Sequence Determination* (Needleman, S.B., ed) 2nd edn., pp. 232-279, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York.
29. Tanaka, I., Appelt, K., Dijk, J., White, S.W. & Wilson, K.S.
(1984) *Nature* 310, 376-381.
30. Lammi, M., Paci, M. & Gualerzi, C.O. (1984) *FEBS Lett.* 170, 1405-1411.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES PROTÉINES HRM ET HU

PLAN DU CHAPITRE IV

ETUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES PROTEINES HR_m ET HUIV - 1 MATERIEL ET METHODESIV - 2 RESULTATS ET DISCUSSION

IV - 2-1 Etude en fonction de la température

IV - 2-2 Etude en fonction de la force ionique

IV - 2-3 Conclusion

La structure secondaire des protéines HRm et HU a été étudiée par dichroïsme circulaire : cette méthode permet essentiellement de déterminer le taux de conformation α hélicoïdale des protéines. Ce taux varie en fonction de la température et de la force ionique. Les informations acquises sur la conformation des protéines seront utilisées lors de l'étude des interactions protéine HRm-DNA et protéine HU-DNA. En effet, des résultats obtenus sur les protéines cro et CAP et le fragment amino-terminal du répresseur cI montrent que la structure secondaire de ces protéines a un effet important dans leurs interactions avec le DNA (OHLENDORF et coll., 1982).

Les études en dichroïsme circulaire ont été réalisées en collaboration avec le Dr.J.P.AUBERT dans le Service de Biophysique de Madame M-H.LOUCHEUX (U.124 INSERM).

IV - 1 MATERIEL ET METHODES

Les protéines HRm et HU (4 mg) sont dissoutes dans 0.25 ml de tampon Tris 0.1M - HCl pH 8.0 en présence de chlorhydrate de guanidine 6M. Les solutions sont laissées à 4°C pendant 72 heures. Les éventuels agrégats de protéines qui pourraient subsister après ce traitement dénaturant sont éliminés par

chromatographie de gel filtration sur une colonne de Sephadex G-100 (Superfine) 1,6x30cm équilibrée et éluée à 4°C par le tampon Tris 10 mM, NaCl 20 mM ajusté à pH 7.4.

La composition en protéine des échantillons a été déterminée par analyse des acides aminés effectuée après hydrolyse acide totale : des concentrations variant de 0.1 à 0.5 mg de protéine/ml ont été utilisées.

Les mesures ont été effectuées avec un dichrographe Jobin-Yvon (R.J.Mark III) qui permet des mesures de spectre dans un domaine de longueurs d'onde compris entre 180 et 800 nm. L'informatisation de cet appareil permet le calcul des spectres expérimentaux avec toute la précision nécessaire. L'épaisseur de la cellule de mesure est de 1 cm.

L'ellipticité molaire θ a été calculée à partir du spectre expérimental par la formule :

$$\theta = 3300 \frac{M}{c \cdot d} \cdot \Delta s \text{ en deg. } \text{dmol}^{-1} \text{ cm}^2$$

M : Masse moléculaire moyenne des résidus d'acides aminés

c : Concentration en g/l

d : Epaisseur de la cuve

Δ : Intensité du signal obtenu mesurée en mm

s : Sensibilité de l'appareil

Le pourcentage d'hélicité α des protéines HU et HRm a été estimé par la méthode de CHEN et coll.(1974). On considère qu'il existe une relation linéaire entre l'ellipticité à 222 nm et le pourcentage d'hélicité α des protéines : l'ellipticité de la structure totalement inorganisée est de $-1000 \text{ deg. } \text{dmol}^{-1} \text{ cm}^2$ et celle de la structure 100 p.100 hélicoïdale est de $-30000 \text{ deg. } \text{dmol}^{-1} \text{ cm}^2$.

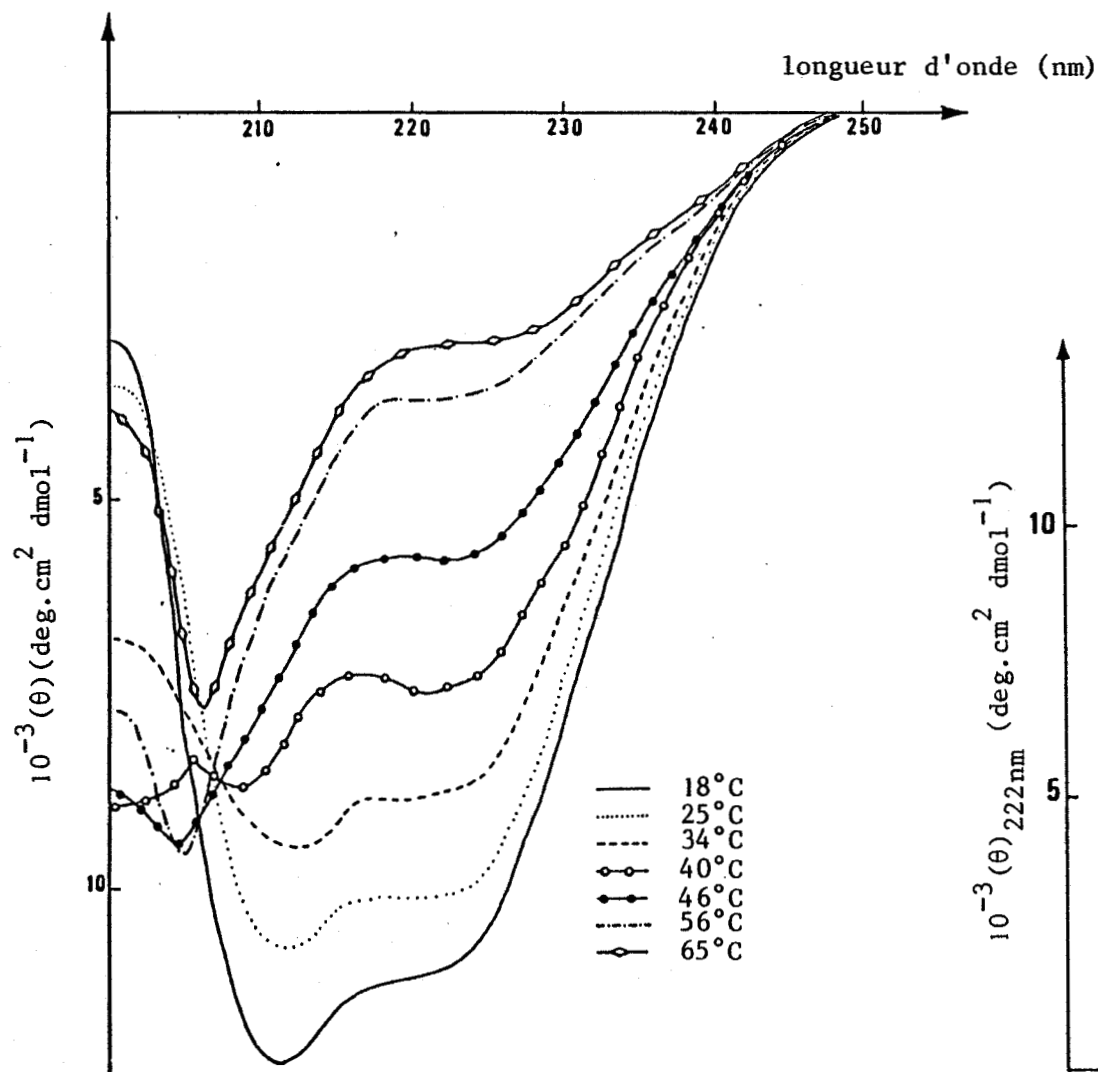
IV - 2 RESULTATS ET DISCUSSION

IV - 2-1 Etude en fonction de la température

L'étude dichroïque a été menée dans le domaine spectral 250-190 nm. Cette région permet la visualisation de la structure secondaire des protéines. Le spectre dichroïque des protéines HU et HRm à 18°C (Figures 19 et 20) est caractérisé par une ellipticité élevée à 222 nm. Ceci indique que ces macromolécules possèdent dans leur structure secondaire beaucoup d'hélice α . Le taux d'hélice α calculé pour les protéines HU et HRm est de l'ordre de 37 p.100.

Bien que les protéines HU-1, HU-2 et HRm présentent de nombreuses différences dans leur séquence en acides aminés (par exemple le taux d'homologie de séquence entre les protéines HU-1 et HRm est de 52 p.100) leur courbe d'hydrophobicité présente une remarquable similitude (voir chapitre III). Ceci explique que les protéines HU et HRm aient un taux d'hélice α semblable.

Lorsqu'on augmente progressivement la température, la structure secondaire de la protéine HU est instable (Fig.19, A et B). Dès 30°C on peut observer une perte de l'hélicité. Cette perte s'accroît au fur et à mesure que l'on chauffe et la température de demi-transition se situe vers 40°C. Cette

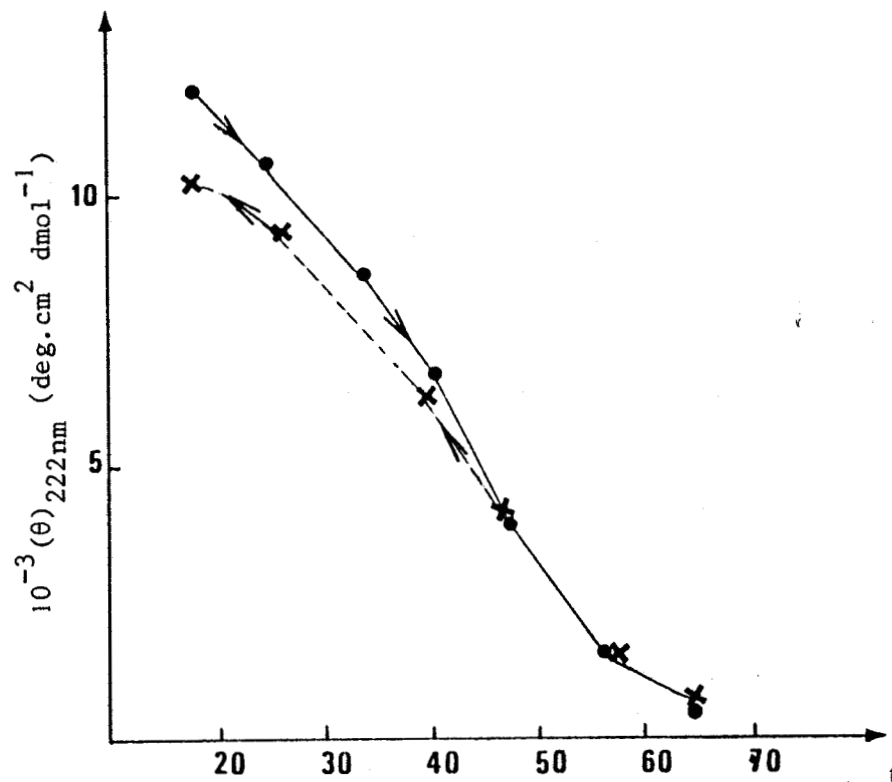


A - Spectres dichroïques obtenus en augmentant la température. Pour simplifier la figure nous n'avons pas présenté les spectres obtenus au cours du refroidissement.

FIGURE 19

VARIATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE
DE LA PROTEINE HU AVEC LA TEMPERATURE

La concentration en protéine est de 0.1 mg/ml

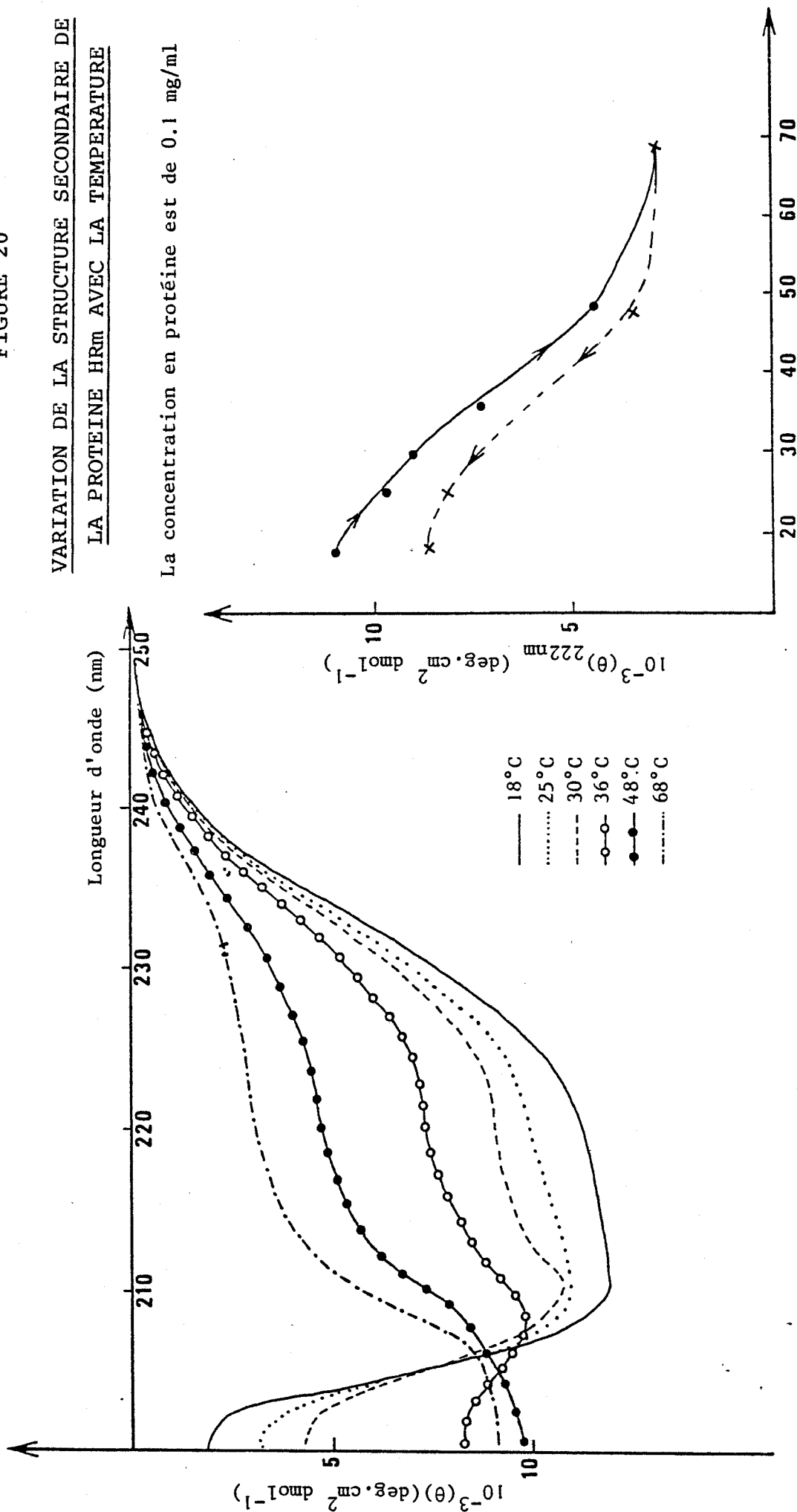


B - Transition à 222 nm obtenue lors de l'élévation de la température (—) et lors du refroidissement (-----).

FIGURE 20

VARIATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DE
LA PROTEINE HRm AVEC LA TEMPERATURE

La concentration en protéine est de 0.1 mg/ml



A - Spectre dichroïque obtenu en augmentant la température. Pour simplifier la figure nous n'avons pas présenté les spectres obtenus au cours du refroidissement.

B - Transition à 222 nm obtenue lors de l'élévation de la température (—) et lors du refroidissement (-----).

diminution du taux d'hélice α s'accompagne d'une augmentation de structure inorganisée et non pas d'une augmentation de structure β qui aurait pu conduire à la formation d'agrégats. Ce phénomène explique la possibilité de renaturation de la protéine HU lorsque l'on baisse à nouveau la température. Le même phénomène est observé pour la protéine HRm (Fig. 20, A et B).

La protéine HU a été décrite par ROUVIERE-YANIV et GROS (1975) comme une protéine thermostable ce qui apparaît être en contradiction avec nos résultats. En fait, ces auteurs ont étudié l'effet de la température sur la fonction de la protéine : après avoir été chauffée à 100°C pendant 15 minutes et refroidie, l'effet de la protéine HU sur la transcription du DNA n'est pas altérée. Il est donc probable qu'après refroidissement, la protéine se soit suffisamment bien réorganisée pour conserver ses propriétés biologiques vis-à-vis de la transcription.

IV - 2-2 Etude en fonction de la force ionique

Les variations de la structure secondaire de la protéine HU (0.1 mg/ml) ont été étudiées en fonction d'une concentration croissante en NaCl de 20 mM à 1500 mM (Figure 21).

On observe une variation monotone du pourcentage d'hélice α caractérisée par l'augmentation de la valeur de l'ellipticité à 222 nm. L'effet de NaCl atteint son maximum vers 600 mM.

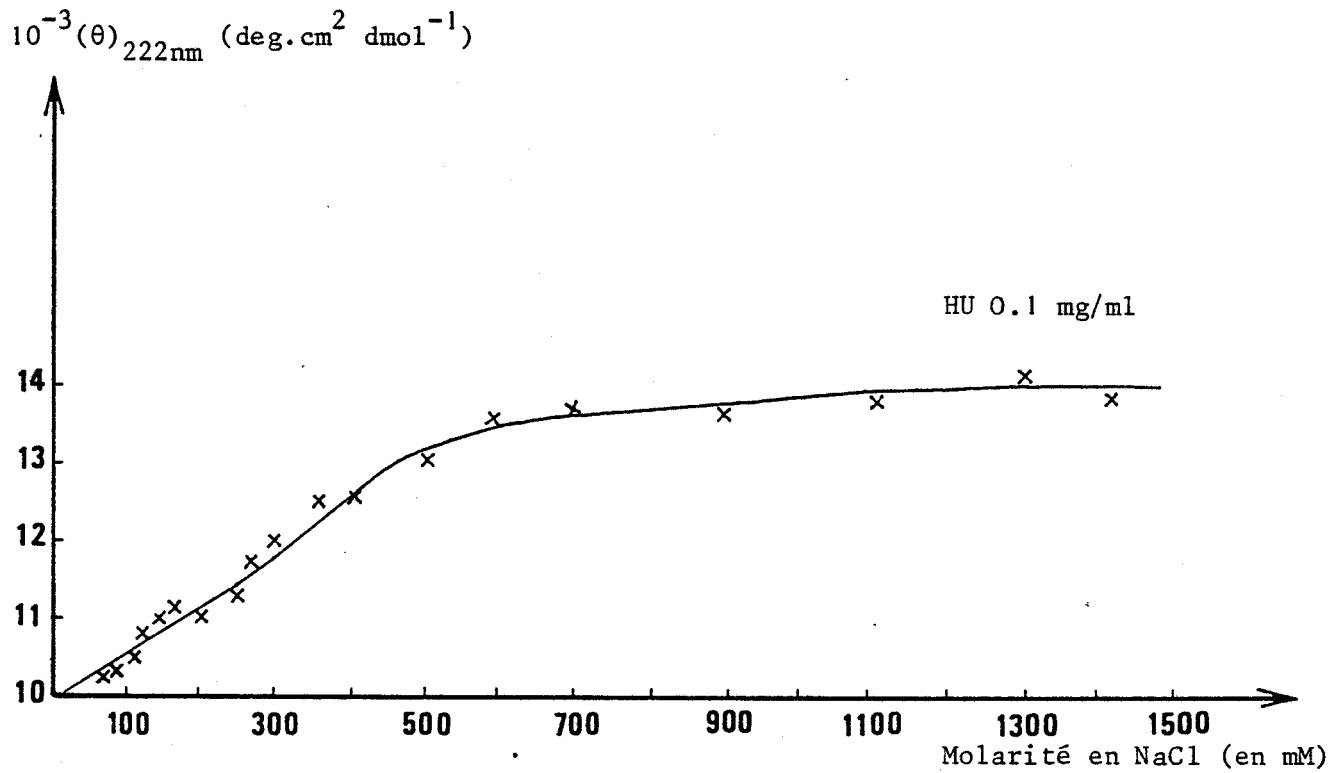


FIGURE 21 TRANSITION A 222 nm OBSERVEE POUR LA PROTEINE HU EN FONCTION DE LA MOLARITE EN NaCl

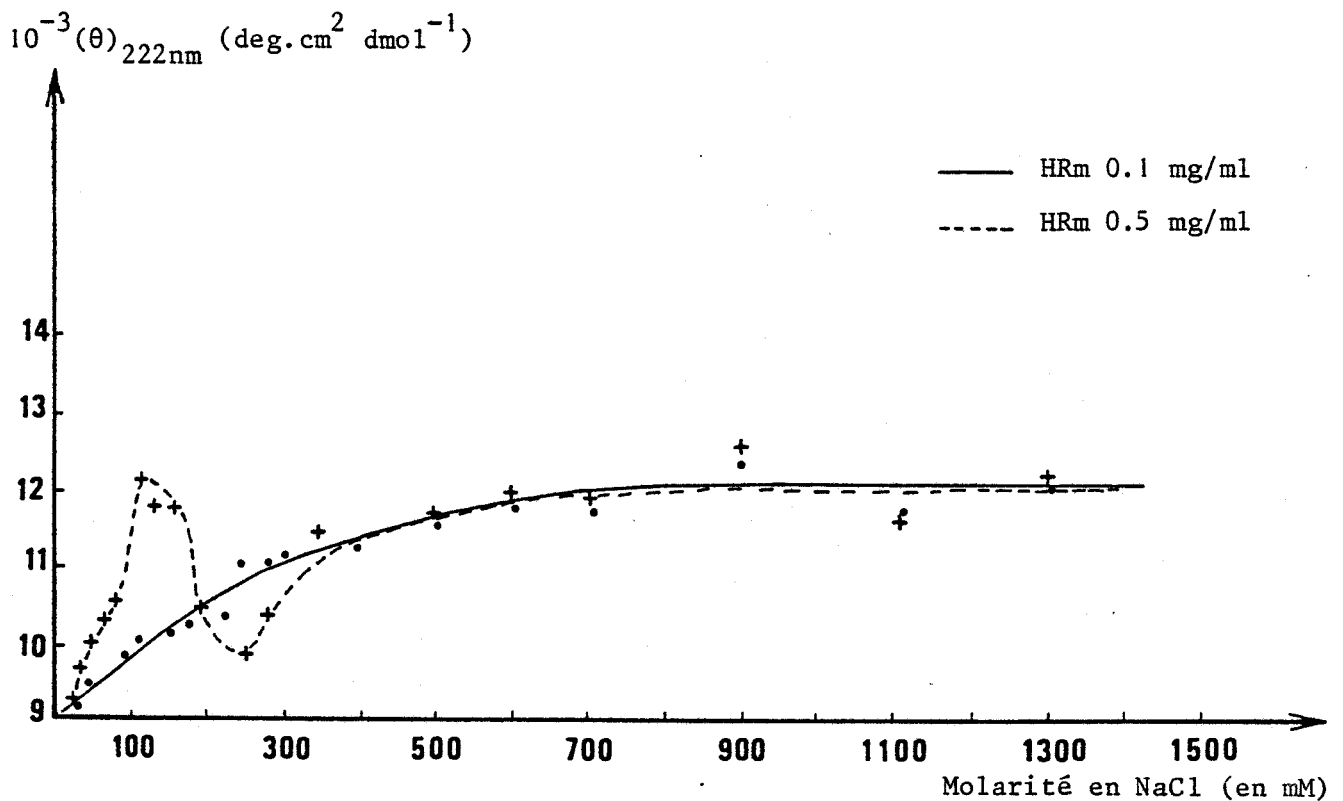


FIGURE 22 TRANSITION A 222 nm OBSERVEE POUR LA PROTEINE HRm EN FONCTION DE LA MOLARITE EN NaCl

Pour la protéine HRm l'étude des spectres dichroïques en fonction de la force ionique, a été réalisée à deux concentrations en protéines (0.1 et 0.5 mg/ml) (Figure 22). A la concentration de 0.1 mg/ml, la protéine HRm se comporte comme la protéine HU et on observe également une variation monotone de l'hélicité α . Par contre à la concentration de 0.5 mg/ml la variation de $[\theta]_{222 \text{ nm}}$ est différente : la courbe présente un maxima à 110 mM NaCl puis un minima à 250 mM NaCl. Ensuite l'ellipticité à 222 nm réaugmente pour atteindre les valeurs obtenues avec une concentration en protéine de 0.1 mg/ml. L'augmentation importante du taux d'hélicité de la protéine HRm observée à 110 mM NaCl pourrait être due à de fortes interactions intermoléculaires qui n'interviennent que si la concentration en protéine est suffisante. Un phénomène analogue est observé pour les histones. En effet lors d'expériences de reconstitution de la "core particle" sous-unité élémentaire d'organisation de la chromatine formée de deux molécules de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 et de 146 paires de bases de DNA, la concentration de la solution d'histones doit être au moins égale à 1 mg/ml.

IV - 2-3 Conclusion

L'étude de la structure secondaire des protéines HU et HRm a permis de montrer les caractéristiques suivantes :

- Les protéines HU et HRm ne sont pas thermostables du point de vue physico-chimique.
- Le taux d'hélice α de ces deux molécules est relativement élevé ; pour les deux protéines il est de l'ordre de 37 p.100.
- Les deux protéines acquièrent une conformation plus hélicoïdale lorsque la force ionique augmente.
- La concentration en protéine a un effet très important sur ce phénomène ce qui suggère qu'il y a formation de polymères protéiques.

CHAPITRE V

INTERACTION DU DNA AVEC LES PROTEINES HRM ET HU

PLAN DU CHAPITRE V

INTERACTION DU DNA AVEC LES PROTEINES HRm ET HU

V - 1 ETUDE DE LA SPECIFICITE DES PROTEINES HRm ET HUVIS-A-VIS DU DNA DE DIFFERENTES ORIGINES

V - 1-1 Méthode

V - 1-2 Résultats et discussion

V - 2 INTERACTION DES PROTEINES HRm ET HU AVEC LE PLASMIDEpBR322

V - 2-1 Objectif

V - 2-2 Matériel et méthode

V - 2-3 Résultats

L'interaction de la protéine HU avec le DNA a été étudiée par plusieurs auteurs en utilisant différentes méthodes. Les principaux résultats ont été présentés dans le chapitre I. Mais ces travaux ayant été effectués avec des DNA d'origine eucaryotique, nous avons recherché si les protéines HRm et HU présentent une spécificité vis-à-vis d'un DNA d'origine donnée. Les résultats obtenus au cours de ce travail nous ont amenés ensuite à approfondir l'étude de l'interaction de ces protéines avec le plasmide pBR322.

V - 1 ETUDE DE LA SPECIFICITE DES PROTEINES HRm ET HU VIS-A-VIS
DU DNA DE DIFFERENTES ORIGINES

Avant le début de nos travaux les protéines de type HU étaient préparées uniquement sur des DNA d'origine eucaryotique couplés à la cellulose. Il nous a semblé intéressant d'étudier l'affinité des protéines HRm et HU pour un DNA d'origine procaryotique, et de comparer les résultats avec ceux obtenus sur un DNA eucaryotique. Pour cela nous avons choisi le DNA de *Rhizobium meliloti*, d'*Escherichia coli* et d'érythrocyte de Poulet.

V - 1-1 Méthode

L'étude de l'interaction des protéines HRm et HU avec le DNA est effectuée par chromatographie d'affinité à la température de 4°C sur du DNA bicaténaire couplé à la cellulose. La méthode de préparation du DNA d'origine bactérienne et la méthode de chromatographie d'affinité sont présentées dans la partie technique.

L'affinité des protéines HRm et HU pour le DNA est déterminée par la force ionique nécessaire pour désorber les protéines fixées sur la colonne de DNA-cellulose.

V - 1-2 Résultats et discussion

Protéine HRm de *Rhizobium meliloti*

Les diagrammes d'élution sur colonne de DNA de *R. meliloti* et de DNA d'érythrocyte de Poulet sont présentés dans la figure 23 . La protéine HRm est désorbée de la colonne de DNA de *R. meliloti* entre 120 et 175 mM NaCl. Au maximum du pic dans lequel est éluee la protéine HRm la force ionique est de 150 mM en NaCl.

Avec une colonne de DNA d'*E. coli* nous avons obtenu un diagramme identique. Par contre sur une colonne de DNA d'érythrocyte de Poulet la protéine HRm commence à être éluee à une force ionique plus faible. Dans ce cas le maximum du pic est à 125 mM NaCl.

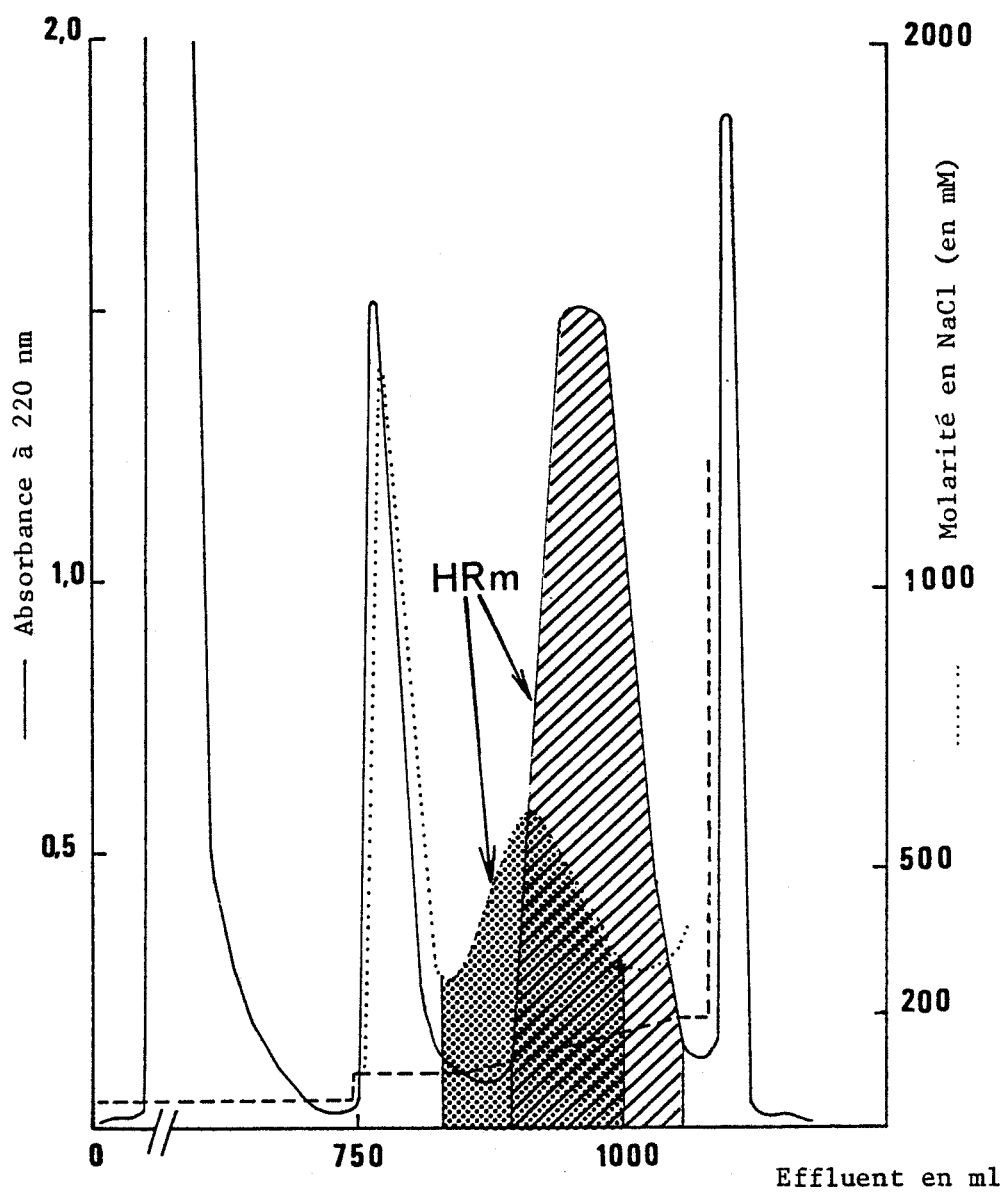


FIGURE 23 DIAGRAMME D'ELUTION DE LA PROTEINE HRm SUR COLONNE
DE DNA DE *Rhizobium meliloti* (—) ET DE DNA
D'ERYTHROCYTE DE POULET (- - - - -) .

Protéine HU d'*Escherichia coli*

Le diagramme d'élution de la protéine HU de la colonne de DNA de *R. meliloti* couplé à la cellulose est présenté dans la figure 24. La protéine HU est désorbée à 300 mM NaCl. Sur une colonne de DNA d'*E. coli* ou d'érythrocyte de Poulet il faut une force ionique identique pour éluer la protéine HU.

Discussion

Les résultats obtenus sur l'étude de la spécificité des protéines HRm et HU pour le DNA d'origines différentes sont résumés dans le tableau VII. Ils montrent que :

- La protéine HRm a la même affinité pour les deux DNA d'origine procaryotique, mais présente une affinité légèrement plus faible pour le DNA d'origine eucaryotique.
- La protéine HU par contre présente une affinité identique pour les trois types de DNA.
- L'affinité pour le DNA de *R. meliloti* ou d'*E. coli* de la protéine HRm est deux fois plus faible que celle de la protéine HU. Dans le chapitre III nous avons tenté de donner une explication à cette différence observée entre les deux protéines.

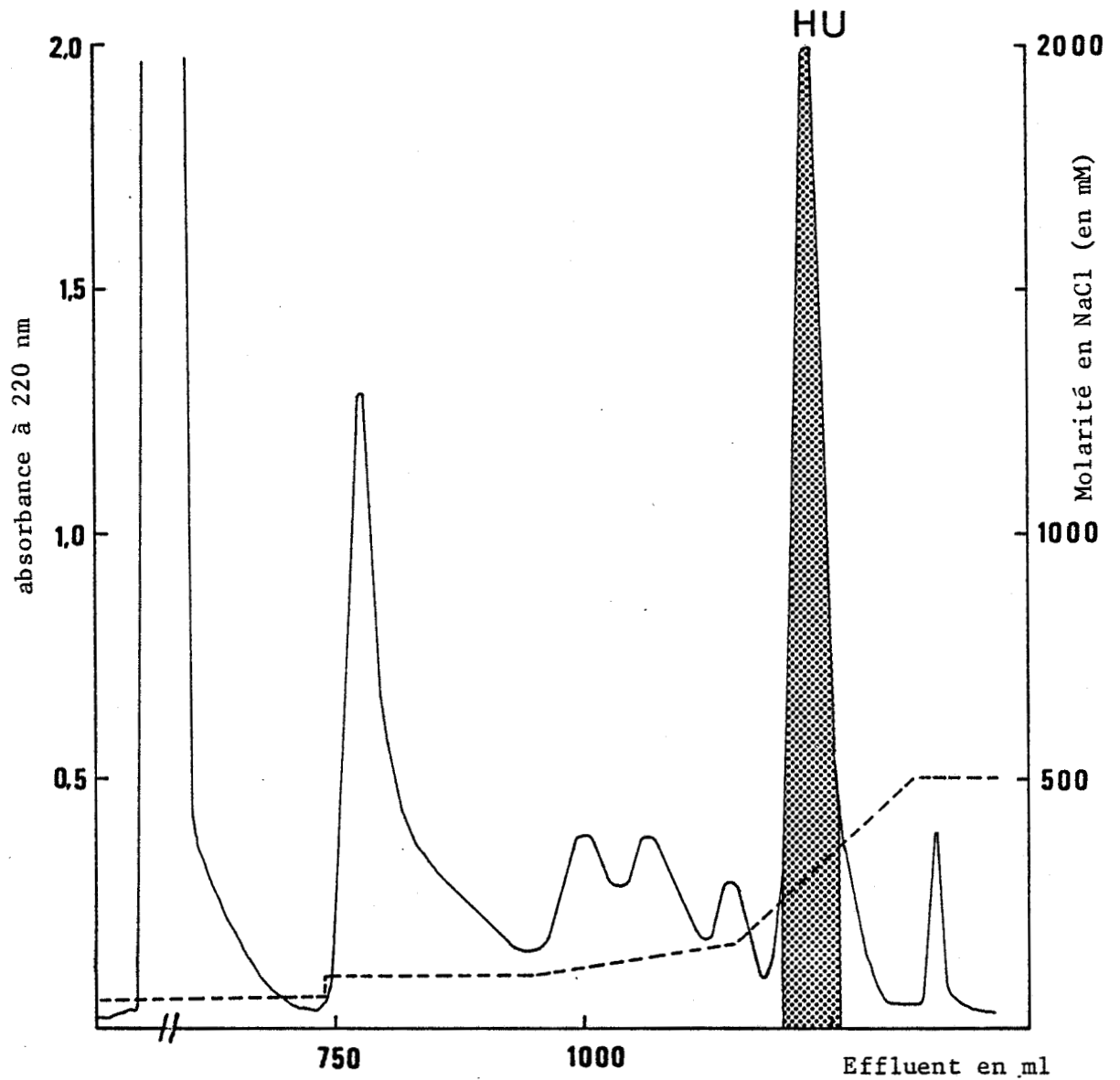


FIGURE 24 DIAGRAMME D'ELUTION DE LA PROTEINE HU SUR UNE COLONNE DE DNA DE *Rhizobium meliloti*.

TABLEAU VII

AFFINITE DES PROTEINES HU ET HRm POUR LE DNA D'ORIGINES DIFFERENTES

Protéines	DNA de Erythrocyte de Poulet	DNA de <i>Rhizobium meliloti</i>	DNA de <i>Escherichia coli</i>
HU	300 mM	300 mM	300 mM
HRm	125 mM	150 mM	150 mM

L'affinité est exprimée en molarité en NaCl au maximum du pic dans lequel les protéines HU et HRm sont éluées de la colonne de DNA-cellulose.

V - 2 INTERACTION DES PROTEINES HRm ET HU AVEC LE PLASMIDE

pBR322

V - 2-1 Objectif

L'observation de la différence d'affinité des protéines HU et HRm pour un même DNA nous a conduit à approfondir l'étude de l'interaction de ces protéines avec le DNA. En effet, ces résultats ne donnent qu'une indication de la force d'association avec un DNA. De plus la conformation du DNA utilisé dans ces expériences est forcément très différente de celle du DNA natif puisqu'il a été fixé sur la cellulose. Nous avons donc utilisé une méthode qui donne des indications à la fois sur la stabilité des complexes que forment les protéines avec un DNA natif et sur l'efficacité des protéines à modifier la conformation du DNA. En effet, il est vraisemblable que les protéines HU et HRm qui jouent le même rôle ont une efficacité fonctionnelle similaire, laquelle n'est pas forcément directement proportionnelle à la constante d'association protéine-DNA.

D'autre part, il nous semble intéressant de comparer l'interaction de ces protéines pour un DNA linéaire et pour un DNA circulaire superhélioidal. En effet, à l'exception des travaux de ROUVIERE-YANIV et coll.(1979) sur le plasmide SV40 toutes les études d'interaction DNA-protéine de type HU ont été réalisées sur du DNA linéaire. Pourtant dans les bactéries le DNA chromosomal ou extrachromosomal est circulaire et superhélioidal.

V - 2-2 Matériel et Méthodes

La concentration en protéine a été déterminée par analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale. Celle du DNA a été mesurée par spectroscopie d'absorption à 254 nm en considérant qu'une solution à 50 µg/ml a une absorbance égale à 1.0. Nous avons étudié l'interaction à la température ambiante des protéines HRm et HU avec le plasmide pBR322 circulaire superhélicoïdal et avec le pBR322 linéarisé par l'enzyme de restriction Hind III.

Cette étude a été effectuée par dichroïsme circulaire de la même manière que dans le chapitre IV. L'interaction entre deux molécules est analysée de la façon suivante : on enregistre les spectres de chacune des deux molécules. On appellera spectre théorique la somme des spectres des molécules mises en présence. On enregistre le spectre obtenu lorsque les deux molécules sont mélangées (spectre expérimental). Le spectre différentiel est la différence entre le spectre théorique calculé et le spectre expérimental. Lorsque deux molécules n'ont aucune interaction les effets dichroïques sont purement additifs et le spectre différentiel est nul. Par contre si une interaction existe le spectre différentiel ne sera plus nul et celui-ci mesurera directement l'interaction. Dans le cas de deux molécules de même nature ce calcul peut être effectué directement sur la valeur de l'ellipticité molaire. Dans le cas présent le DNA et une protéine sont deux espèces moléculaires différentes et par

conséquent seules les valeurs en mm peuvent être utilisées. Cependant étant donné que le spectre dichroïque des protéines dans le domaine 350-250 nm est nul ou négligeable, on pourra utiliser les valeurs de l'ellipticité molaire dans ce domaine.

Pour l'étude de l'interaction DNA-protéine nous avons procédé de la manière suivante : le DNA et la protéine en solution dans un tampon Tris 10 mM NaCl 20 mM de pH 7.4 sont mélangés. La concentration en NaCl est augmentée progressivement et nous avons suivi les variations du spectre différentiel. Nous avons tracé en fonction de la force ionique la variation de l'ellipticité à 275 nm.

Le signal dichroïque à 275 nm est caractéristique du DNA (Figure 25) et permet de mettre en évidence les changements de conformation du DNA. Signalons que l'ellipticité à 275 nm ne varie pas avec la force ionique entre 20 et 600 mM en NaCl.

V - 2-3 Résultats

V - 2-3-1 Etudes préliminaires

Des études préliminaires ont été effectuées sur le DNA circulaire superhélicoïdal pour déterminer les conditions optimales dans lesquelles seront analysées les interactions du DNA avec les protéines HRm et HU.

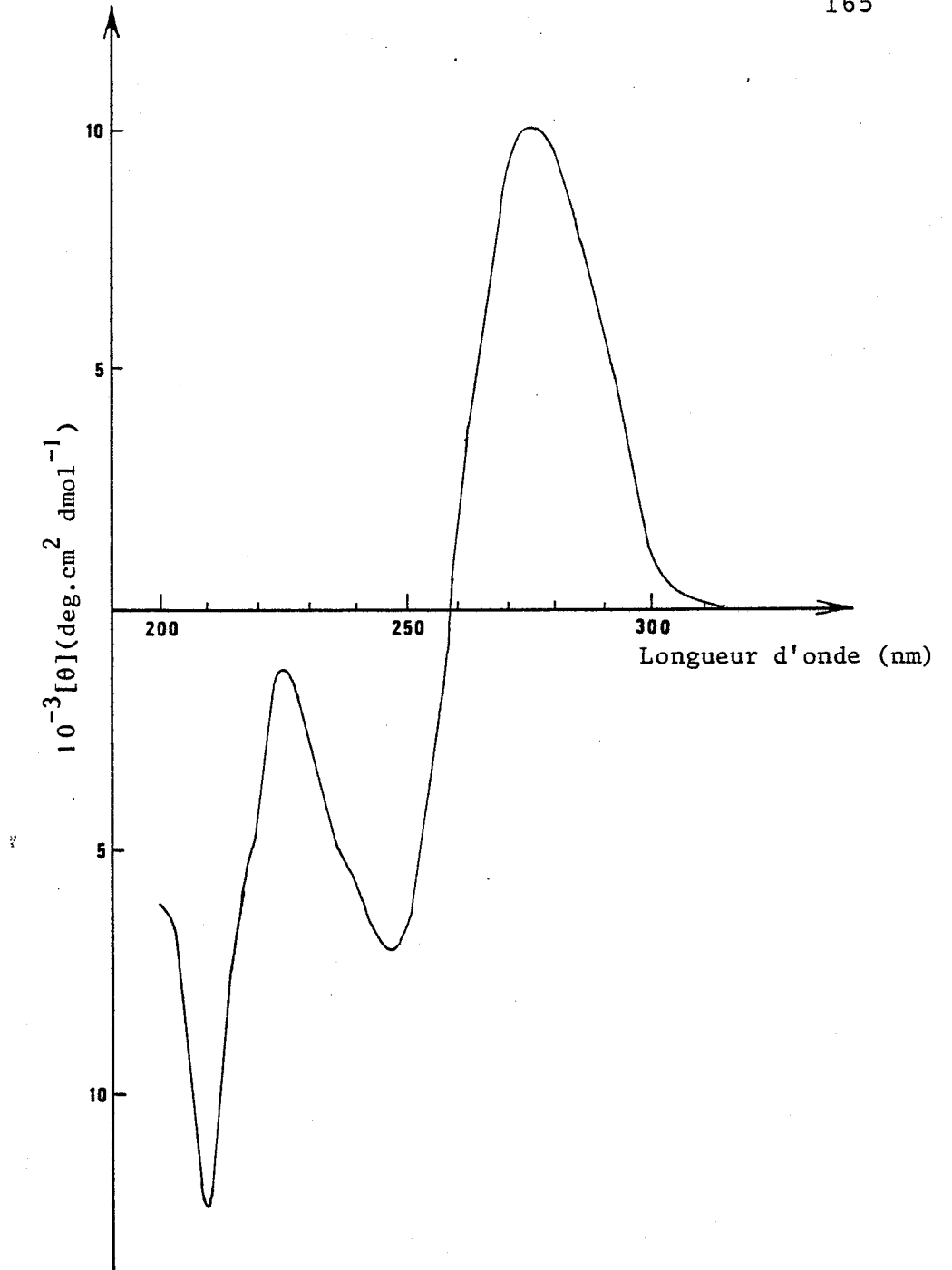


FIGURE 25 SPECTRE DICHROÏQUE DU PLASMIDE pBR322

V - 2-3-1-1 Etude de la cinétique de complexation

Différents temps de mélange DNA-protéine ont été étudiés (5 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 8 heures, 24 heures). Aucune évolution de l'interaction au cours du temps n'a pu être mise en évidence. Ceci indique que l'interaction entre ces deux molécules s'établit très rapidement et reste stable au cours du temps.

V - 2-3-1-2 Etude du rapport protéine-DNA (exprimé en poids)

A une solution contenant 20 μg de DNA nous avons ajouté progressivement de la protéine HRm pour faire varier le rapport pondéral protéine/DNA entre 0.1 et 1. Nous avons alors suivi la variation de l'ellipticité à 275 nm. Pour la protéine HRm ces études ont été effectuées dans trois conditions de force ionique: 20, 30 et 50 mM NaCl. Quelle que soit la force ionique on observe un plateau d'interaction pour un rapport HRm-DNA compris entre 0.2 et 0.3. (Figure 26).

La même expérience a été effectuée avec la protéine HU en présence de NaCl 50 mM (Figure 26). Dans ce cas le plateau d'interaction se situe pour un rapport compris entre 0.3 et 0.6.

Pour la protéine HRm, comme pour la protéine HU, la valeur absolue de l'interaction augmente avec la quantité de protéine.

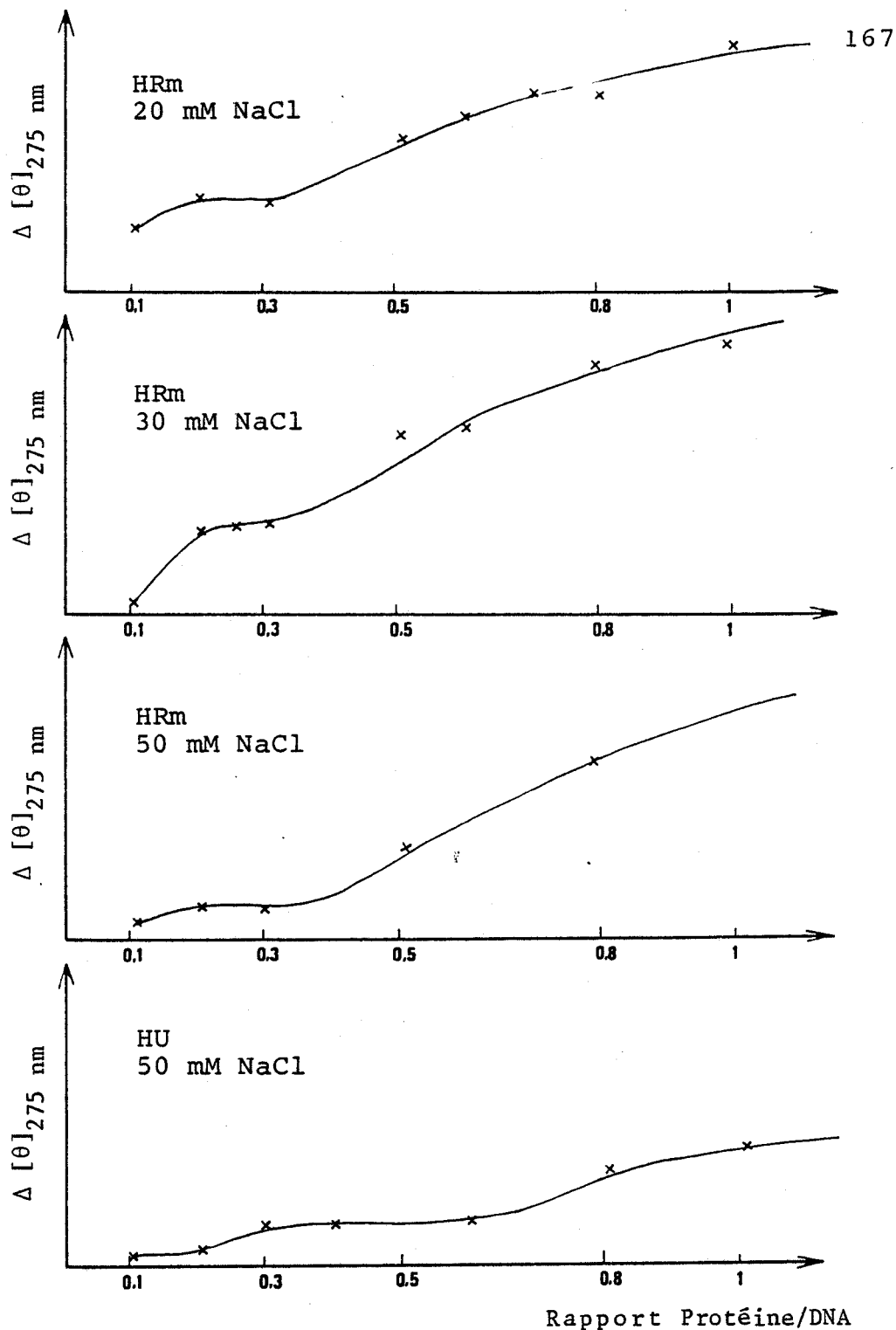


FIGURE 26 VARIATION DE L'ELLIPTICITE A 275 nm EN FONCTION DU RAPPORT PONDERAL PROTEINE/DNA.

L'unité de $\Delta [\theta]_{275 \text{ nm}}$ étant prise arbitrairement, les valeurs absolues ne sont pas significatives et n'ont pas été représentées.

Pour déterminer le rapport protéine-DNA qui sera utilisé dans nos études d'interaction nous avons dû trouver un compromis entre les informations fournies par la littérature et les possibilités techniques liées à notre méthode d'étude.

Dans le chromosome d'*E. coli* 150 à 200 paires de bases de DNA sont associées à une molécule de chacune des protéines HU et H1 (VARSHAVSKY et coll., 1976). Le rapport pondéral protéine HU-DNA *in vivo* serait donc de l'ordre de 0.1, mais le signal dichroïque du DNA étant beaucoup plus important que celui de la protéine, il n'est pas techniquement possible de travailler avec un rapport protéine/DNA aussi faible. En effet, pour observer une variation significative de la conformation de la protéine il faut une concentration en protéine au moins égale à 20 µg/ml tandis que la concentration en DNA ne peut dépasser 40 µg/ml.

Précédemment ROUVIERE-YANIV et coll. (1977) ont observé que la condensation du plasmide SV40 par la protéine HU est maximale avec un rapport pondéral protéine/DNA égale à 1. Ces résultats peuvent être liés à l'observation que nous avons faite au chapitre IV et qui suggérait que les forces entre les protéines nécessaires à la formation d'un édifice protéique sur lequel interagirait le DNA ne peuvent s'établir que si la concentration en protéine est suffisante. De plus des expériences effectuées avec un rapport protéine-DNA de 0.5, valeur située dans le plateau obtenu avec la protéine HU (Figure 26), nous ont donné des résultats moins nets que ceux obtenus avec un rapport égal à 1.0. Nous avons donc choisi de réaliser nos études ultérieures avec un rapport protéine-DNA égal à 1.0.

V - 2-3-2 Interaction DNA circulaire superhéliçoïdal-protéine

V - 2-3-2-1 Etudes en présence de NaCl

Complexe DNA circulaire superhéliçoïdal-protéine HU

L'étude de l'interaction du plasmide pBR322 sous forme circulaire superhéliçoïdale avec la protéine HU d'*E. coli* a été effectuée en mélangeant 40 µg de chacune des deux macromolécules. Les variations de l'ellipticité à 275 nm et du signal dichroïque à 222 nm du spectre différentiel en fonction de la force ionique sont présentées respectivement dans les figures 27 A et B. L'interaction entre la protéine HU et le DNA augmente progressivement avec la force ionique pour atteindre un maximum aux environs de 110 mM NaCl (Figure 27 A). Simultanément nous observons une augmentation de l'hélicité α de la protéine HU (traduite par l'augmentation du signal dichroïque à 222 nm (Figure 27 B). Ensuite lorsque la force ionique augmente l'interaction DNA-protéine diminue pour s'annuler à environ 350 mM. La transition observée pour l'hélicité de la protéine est beaucoup plus nette et se produit à 250 mM NaCl.

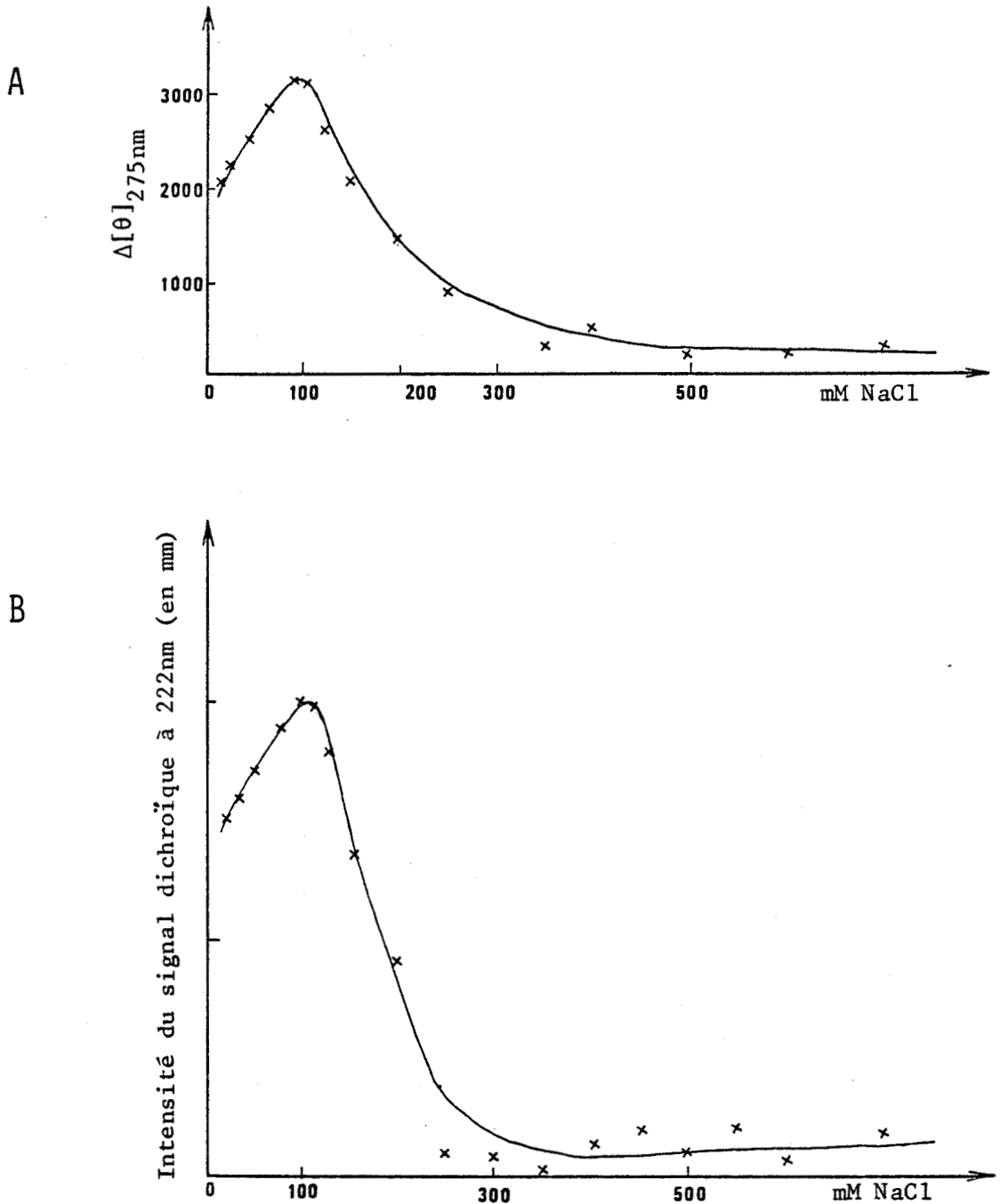


FIGURE 27 INTERACTION DU PLASMIDE pBR322 SOUS FORME CIRCULAIRE SUPERHELICOÏDALE AVEC LA PROTEINE HU.

A - Ellipticité à 275 nm en fonction de la concentration en NaCl.

B - Signal dichroïque à 222 nm en fonction de la force ionique.

Nous n'avons pas indiqué d'unité car la valeur réelle en mm est multipliée par un facteur arbitraire.

Complexe DNA circulaire superhéliçoïdal-protéine HRm

Les résultats obtenus lors de l'interaction du pBR322 avec la protéine HRm (40 µg de chacune des deux macromolécules) sont présentés dans les figures 28 A et B.

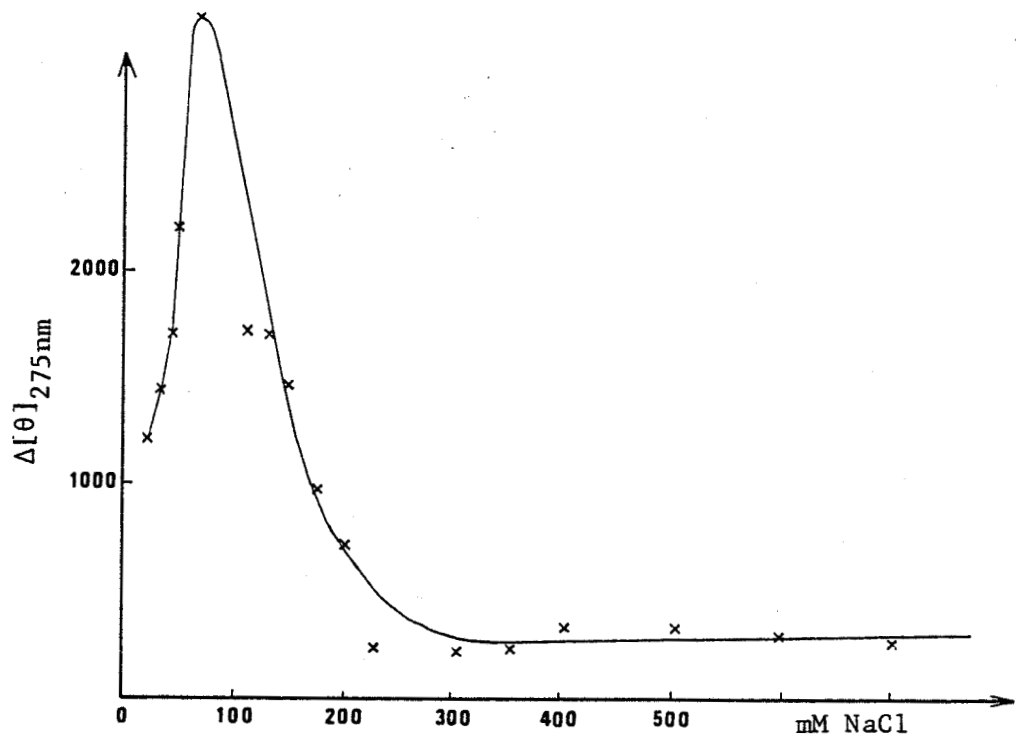
Avec la protéine HRm l'interaction mesurée à 275 nm est maximale à 70 mM NaCl et s'annule à 200 mM NaCl. Comme dans le cas de la protéine HU, la transition observée pour l'hélicité de la protéine HRm est très nette, elle intervient à 150 mM NaCl.

Discussion

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'interaction du DNA circulaire avec les protéines HU et HRm en présence de NaCl permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Lorsque les protéines HU et HRm interagissent avec le DNA, l'ellipticité à 275 nm augmente d'une même valeur ; la variation de l'ellipticité est de + 3000 deg. $\text{dmol}^{-1} \text{cm}^2$. Ceci indique que le changement de conformation du DNA provoqué par l'une ou l'autre de ces protéines est identique. Ainsi, bien que les protéines HU et HRm aient une structure primaire qui présente de nombreuses différences (le degré de similitude structurale est de 52 p.100), que leur charge nette et leur rétention sur une colonne de DNA cellulose soient différentes, elles ont une capacité identique à "compacter" le DNA. Nos résultats étayent donc l'hypothèse du rôle des protéines de type HU dans la conformation du DNA.

A



B

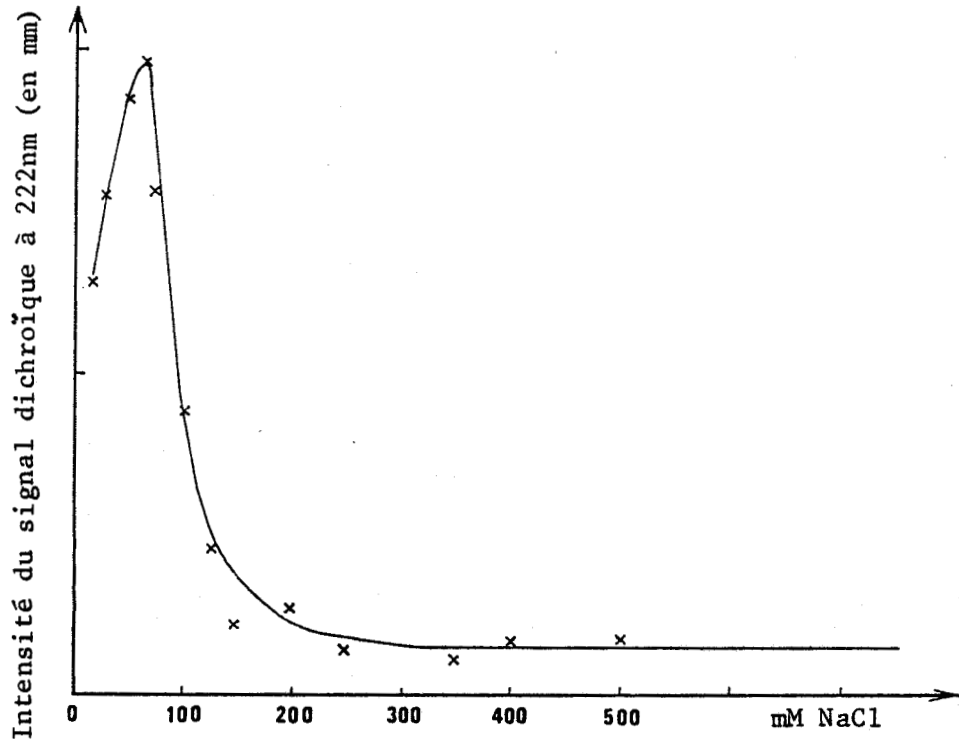


FIGURE 28 INTERACTION DU PLASMIDE pBR322 SOUS FORME CIRCULAIRE SUPERHELICOÏDALE AVEC LA PROTEINE HRm.

A - Ellipticité à 275 nm en fonction de la concentration en NaCl.

B - Signal dichroïque à 222 nm en fonction de la force ionique.

Nous n'avons pas indiqué d'unité car la valeur réelle en mm est multipliée par un facteur arbitraire.

- Les protéines HU et HRm subissent une modification de leur structure secondaire lorsqu'elles interagissent avec le DNA. On observe effectivement une augmentation de leur taux d'hélice α par rapport aux protéines prises isolément.

- La modification simultanée de la conformation du DNA et de la protéine montre que nous sommes en présence d'une interaction vraie et non pas d'une simple association entre molécules. LIAO et coll. (1981) ont observé que lors de l'interaction des sous-fractions de l'histone H1 avec le plasmide PM-2, la modification de la conformation du DNA en fonction de la force ionique suit une courbe parallèle à celle de la variation de l'hélicité des protéines. Ces auteurs ont souligné l'importance pour l'histone d'acquérir une conformation convenable afin d'interagir efficacement avec le DNA. Il en est probablement de même pour les protéines HU et HRm. Une conformation α hélicoïdale de sites d'interactions de protéines avec les acides nucléiques a déjà été décrite (ANDERSON et coll., 1981).

- La dissociation protéines-DNA observée par dichroïsme circulaire à 275 nm se produit à environ 300-350 mM NaCl pour la protéine HU et 200 mM NaCl pour la protéine HRm. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par chromatographie d'affinité sur DNA-cellulose puisque le complexe DNA-HU apparaît plus stable que le complexe DNA-HRm.

V - 2-3-2-2 Etudes en présence de MgCl₂

L'interaction du pBR322 avec les protéines HU et HRm a été étudiée en présence d'un cation divalent, Mg⁺⁺. Dans ce cas le complexe protéine-DNA est dissocié très vite. En effet dès que la concentration en ion magnésium atteint 5 mM le spectre d'interaction devient nul. La présence d'un ion divalent Mg⁺⁺ semble donc destabiliser très fortement et très facilement le complexe.

IMBER et coll. (1982) ont précédemment montré que le complexe formé entre des fragments de DNA du phage λ et la protéine de type HU de *Bacillus globigii* se dissocie dès que la molarité en MgCl₂ atteint 10 mM.

V - 2-3-3 Interaction DNA linéaire-protéine

L'étude de l'interaction des protéines HU et HRm avec le pBR322 linéarisé a été effectuée en utilisant 16 μ g de chacune des macromolécules. Pour une raison de rendement lors de la linéarisation du plasmide il ne nous a pas été possible de travailler avec une quantité plus élevée de matériel. La variation de l'ellipticité à 275 nm en fonction de la force ionique est présentée dans la figure 29. Dans ce cas la valeur $\Delta [\theta]$ à 275 nm est de 1000 deg. $\text{dmol}^{-1} \text{cm}^2$ alors qu'elle était de 3000 deg. $\text{dmol}^{-1} \text{cm}^2$ avec le DNA superhélioidal. La "compaction"

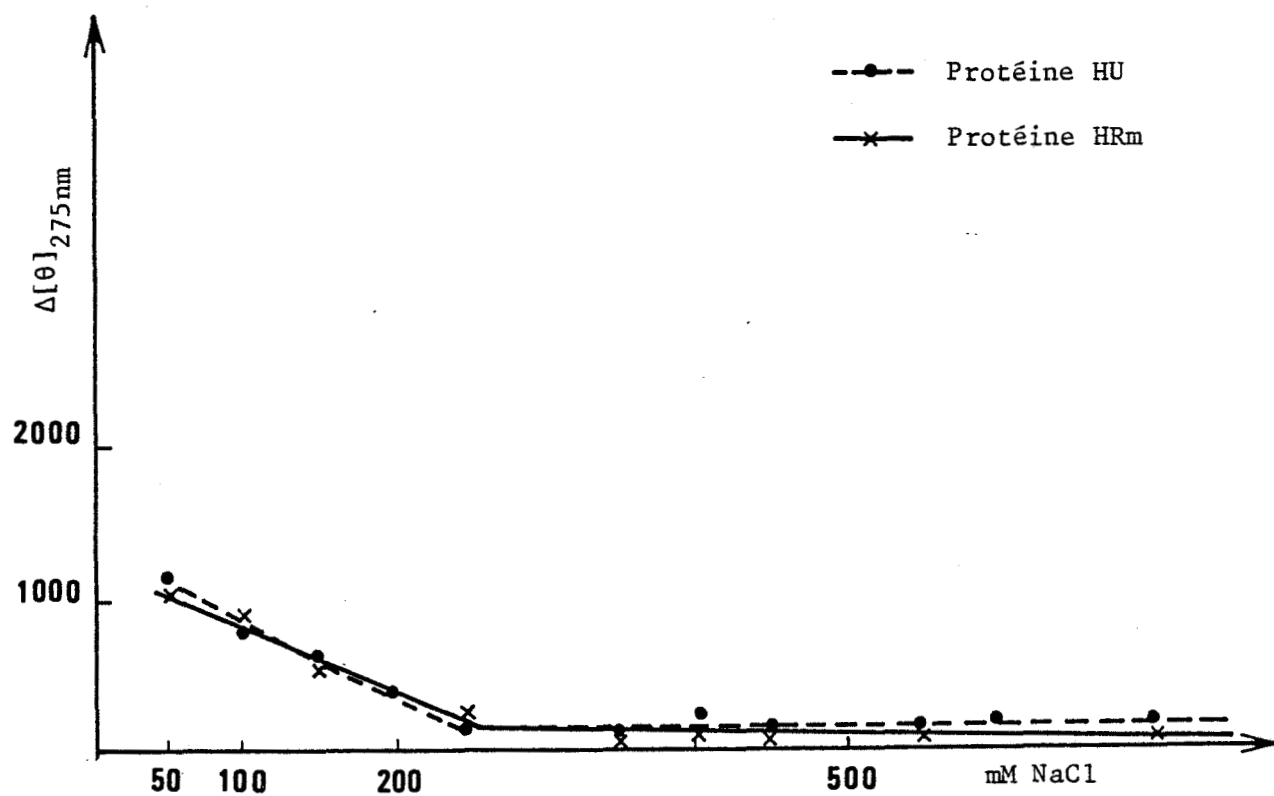


FIGURE 29 INTERACTION DES PROTEINES HU ET HRm AVEC LE PLASMIDE pBR322 LINEAIRE.

du DNA linéaire est donc beaucoup plus faible que celle du DNA circulaire superhélioidal.

Les complexes commencent à se dissocier à 70 mM NaCl. De plus les spectres d'interaction des deux protéines avec le DNA linéarisé sont parfaitement superposables, ce qui n'est pas le cas lorsque ces deux protéines forment un complexe avec le DNA circulaire. Lors de l'interaction des protéines de type HU avec le DNA linéarisé, il y a donc une très nette diminution de la "compaction" du DNA et une perte d'affinité et de spécificité des protéines pour le DNA. L'exploitation des résultats obtenus à 222 nm est beaucoup plus délicate, ceci est lié à la faible quantité de matériel utilisée. On peut dire que lors de cette interaction l'hélicité des deux protéines augmente mais il est très difficile d'affirmer qu'elle augmente moins que dans le cas du DNA circulaire.

Conclusion

La chromatographie d'affinité sur colonne de DNA-cellulose nous a permis de montrer que la protéine HRm présente une affinité préférentielle pour le DNA procaryotique tandis que la protéine HU ne présente pas de spécificité pour le DNA procaryotique ou eucaryotique. D'autre part, la protéine HU est nettement mieux retenue que la protéine HRm sur une colonne de DNA-cellulose.

Le dichroïsme circulaire nous a fourni d'intéressantes informations sur l'interaction des protéines HU et HRm avec le plasmide pBR322. Les deux protéines modifient avec la même efficacité la conformation du DNA circulaire.

L'interaction entre le plasmide et les protéines s'accompagne d'une augmentation de l'hélicité des protéines. Ce changement de conformation semble être une condition préalable à la formation du complexe.

L'interaction des protéines HU et HRm est beaucoup plus forte avec le plasmide sous forme superhélicoïdale qu'avec le plasmide linéarisé.

Les protéines HU et HRm forment avec le DNA superhélicoïdal des complexes qui ne présentent pas la même stabilité ; la stabilité est meilleure avec la protéine HU.

CONCLUSION

Nous avons isolé et caractérisé les protéines de type HU de cinq bactéries de la famille *Rhizobiaceae* : *R. meliloti*, *R. leguminosarum* (souches L18 et L53), *R. japonicum* et *R. tumefaciens*. Ces protéines sont appelées respectivement HRm, HR118, HR153, HRj et HAt.

La séquence en acides aminés des protéines HRm, HR118, HR153 et HAt a été déterminée.

Les caractéristiques physico-chimiques et immunologiques ainsi que la parenté phylogénétique de ces protéines reflètent parfaitement la position des bactéries dans le dendrogramme des *Rhizobiaceae*.

La structure secondaire des protéines HU et HRm a été étudiée dans différentes conditions de température et de force ionique. Ces études ont montré que ces protéines ne sont pas thermostables et que leur structure secondaire varie de façon significative avec la force ionique.

L'interaction des protéines HU et HRm avec le DNA a été étudiée par chromatographie d'affinité sur colonne de DNA-cellulose et dichroïsme circulaire. Bien que ces deux protéines n'aient pas la même affinité pour le DNA elles modifient avec la même efficacité la conformation du DNA. L'interaction des protéines HU et HRm est beaucoup plus forte avec un plasmide sous forme superhélicoïdale qu'avec un plasmide linéarisé. Les résultats confortent l'hypothèse selon laquelle les protéines de type HU ont un rôle sur la conformation du DNA.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBERTS, B. and HERRICK, G. (1971)
 DNA-cellulose chromatography.
 in "Methods in Enzymology": Eds. COLOWICK, S.P. and
 KAPLAN, N.O. Academic Press, New York, 21, 198-217.
- ANDERSON, W.F., OHLENDORF, D.H., TAKEDA, Y and MATTHEWS, B.W. (1981)
 Structure of the cro repressor from bacteriophage λ and
 its interaction with DNA.
Nature 290, 754-758.
- BAKAYEV, V.V. (1981)
 Structure of the chromosomal deoxyribonucleoproteins.
 XI - Organization of deoxyribonucleoprotein complex in
 the bacterial cell.
Molekulyarnaya Biologiya 15, 1350-1362.
- BECHET, M. et GUILLAUME, J.B. (1978)
 Mise en évidence d'ADN extrachromosomique chez *Rhizobium*
meliloti.
Can.J.Microbiol. 24, 960-966.
- BERTHOLD, V. and GEIDER, K. (1976)
 Interaction of DNA with DNA-binding proteins. The charac-
 terization of protein HD from *Escherichia coli* and its
 nucleic acid complexes.
Eur.J.Biochem. 71, 443-449.
- BUCHANAN, R.E. and GIBBONS, N.E. (1974)
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
 8th ed. WILLIAMS and WILKINS, Baltimore.
- CAIRNS, J. (1963)
 The bacterial chromosome and its manner of replication
 as seen by autoradiography.
J.Mol.Biol. 6, 208-213.
- CATTEAU, M., KHANAKA, H., LEGRAND, M.D. and GUILLAUME, J.B. (1984)
 Contribution to the study of *Rhizobium* and *Agrobacterium*
 genus : numerical taxonomy.
 in "Advance in nitrogen fixation research" Proc. of the
 5th Intern.Symp. on nitrogen fixation, Noorwijkerhout,
 the Netherlands, August 28-Septembre 3, 1983. Eds. VEEGER, C.
 and NEWTON, W.E., p.330.

- CHEN, Y.H., YANG, J.T. and CHAU, K.H. (1974)
 Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism.
Biochemistry 13, 3350-3359.
- CID, H., BUNSTER, M., ARRIAGADA, E. and CAMPOS, M. (1982)
 Prediction of secondary structure of proteins by means of hydrophobicity profiles.
FEBS Letters 150, 247-254.
- COLEMAN, J.E. and OAKLEY, J.L. (1980)
 Physical chemical studies of the structure and function of DNA binding (helix-destabilising) proteins.
C.R.C. Critical Reviews in Biochemistry 7, 247-289.
- CROWN, V.L., JARVIS, B.D.W. and GREENWOOD, R.M. (1981)
 Deoxyribonucleic acid homologies among acid producing strains of *Rhizobium*.
Int.J.Syst.Bacteriol. 31, 152-172.
- CUKIER-KAHN, R., JACQUET, M. and GROS, F. (1972)
 Two heat-resistant, low molecular weight proteins from *Escherichia coli* that stimulate DNA-directed RNA synthesis.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69, 3643-3647.
- CURRIER, T.C. and NESTER, E.W. (1976)
 Evidence for diverse types of large plasmids in tumor-inducing strains of *Agrobacterium*.
J.Bacteriol. 126, 157-165.
- DE LEY, J. and RASSEL, A. (1965)
 DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*.
J.Gen.Microbiol. 41, 85-91.
- DE LEY, J., BERNAERTS, M., RASSEL, A. and GUILMOT, J. (1966)
 Approach to an improved taxonomy of the genus *Agrobacterium*.
J.Gen.Microbiol. 43, 7-17.
- DE LEY, J. (1968)
 DNA base composition and classification of some more free-living nitrogen-fixing bacteria.
Antonie Van Leeuwehoek. J.Microbiol.Serol. 34, 66-70.
- DE ROSNAY, J. (1978)
 La fixation de l'azote : un espoir contre la faim dans le monde.
La Recherche 17, 10-11.
- DICKERSON, R. (1980)
 Le cytochrome C et l'évolution du métabolisme.
Pour la Science 31, 60-72.

- DIJK, J., WHITE, S.W., WILSON, K.S. and APPELT, K. (1983)
On the DNA binding protein II from *Bacillus stearothermophilus*. I - Purification, studies in solution, and crystallization.
J.Biol.Chem. 258, 4003-4006.
- DIXON, R.O.D. (1969)
Rhizobia with particular reference to relationship with host plants.
Ann.Rev.Microbiol. 23, 137-158.
- DRLICA, K. and WORCEL, A. (1975)
Conformational transitions in the *Escherichia coli* chromosome : analysis by viscometry and sedimentation.
J.Mol.Biol. 98, 393-411.
- DWORSKY, P. (1975)
A mild method for the isolation of folded chromosomes from *Escherichia coli*.
Z.Allg.Mikrobiol. 15, 231-241.
- DWORSKY, P. (1976)
Comparative studies on membrane-associated, folded chromosomes from *Escherichia coli*.
J.Bacteriol. 126, 64-71.
- DWORSKY, P. (1977)
Isolation of folded DNA from *Bacillus subtilis*.
FEMS Letters 1, 95-98.
- FAHRAEUS, G. (1957)
The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique.
J.Gen.Microbiol. 16, 374-381.
- FOX, G.E., STACKEBRANDT, E., HESPELL, R.B., GIBSON, J., MANILOFF, J., DYER, T.A., WOLFE, R.S., BALCH, W.E., TANNER, R.S., MAGRUM, L.J., ZABLEN, L.B., BLAKEMORE, R., GUPTA, R., BONEN, L., LEWIS, B.J., STAHL, D.A., LUEHRSEN, K.R., CHEN, K.N. and WOESE, C.R. (1980)
The phylogeny of Prokaryotes.
Science 209, 457-463.
- GEIDER, K. (1978)
Interaction of DNA with DNA-binding proteins. Protein exchange and complex stability.
Eur.J.Biochem. 87, 617-622.
- GEIDER, K. and HOFFMANN-BERLING, H. (1981)
Proteins controlling the helical structure of DNA.
Ann.Rev.Biochem. 50, 233-260.

- GIBBINS, A.N. and GREGORY, K.F. (1972)
Relatedness among *Rhizobium* and *Agrobacterium* species determined by three methods of nucleic acids hybridization.
J.Bacteriol. 3, 129-141.
- GOODCHILD, D.J. and BERGERSEN, F.J. (1966)
Electron microscopy of the infection and subsequent development of Soybean nodule cells.
J.Bacteriol. 92, 204-213.
- GRAHAM, P.H. (1964)
The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria.
J.Gen.Microbiol. 35, 511-517.
- GRAHAM, P.H. (1976)
Identification and classification of root nodule bacteria. in "Symbiotic nitrogen fixation in plants" Ed. NUTMAN, P.S., Cambridge University Press, Cambridge, England 7, p.99-112.
- GRIFFITH, J.D. (1976)
Visualization of procaryotic DNA in a regulary condensed chromatin-like fiber.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 563-567.
- GUILLEN, N., LE HEGARAT, F., FLEURY, A.M. and HIRSCHBEIN, L. (1978)
Folded chromosomes of vegetative *Bacillus subtilis* : composition and properties.
Nucleic Acids Research 5, 475-489.
- HASELKORN, R. and ROUVIERE-YANIV, J. (1976)
Cyanobacterial DNA-binding protein related to *Escherichia coli* HU.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 1917-1920.
- HAWKINS, A.R. and WOOTTON, J.C. (1981)
A single DNA-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* homologous to proteins NSI and NS2 (HU proteins) of *Escherichia coli* and other bacteria.
FEBS Letters 130, 275-278.
- HEBERLEIN, G.T., DE LEY, J. and TIJTGAT, R. (1967)
Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Chromobacterium*.
J.Bacteriol. 94, 116-124.
- HECHT, R.M., TAGGART, R.T. and PETTIJOHN, D.E. (1975)
Size and DNA content of purified *E.coli* nucleoids observed by fluorescence microscopy.
Nature 253, 60-62.

- HECHT, R.M., STIMPSON, D. and PETTIJOHN, D.E. (1977)
Sedimentation properties of the bacterial chromosome as
an isolated nucleoid and as an folded DNA fiber.
J.Mol.Biol. 3, 257-277.
- HENNECKE, H. (1981)
Recombinant plasmids carrying nitrogen fixation genes
from *Rhizobium japonicum*.
Nature 291, 354-355.
- HOOYKAAS, P.J.J., KIAPWIJK, P.M., NUTI, M.P., SCHILPEROORT, R.A.
and RÖRSCH, A. (1977)
Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to
avirulent *agrobacteria* and to *Rhizobium ex planta*.
J.Gen.Microbiol. 98, 477-484.
- HÜBSCHER, U., LUTZ, H. and KORNBERG, A. (1980)
Novel histone H2A-like protein of *Escherichia coli*.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77, 5097-5101.
- IMBER, R., BÄCHINGER, H. and BICKIE, T.A. (1982)
Purification and characterization of a small DNA-binding
protein, HB, from *Bacillus globigii*.
Eur.J.Biochem. 122, 627-632.
- JARVIS, B.D.W., MACLEAN, T.S., ROBERTSON, I.G.C. and FANNING, G.R.
(1977)
Phenetic similarity and DNA base sequence homology of
root nodule bacteria from New Zealand native legumes and
Rhizobium strains from agricultural plants.
N.Z.J. Agric.Res. 20, 235-248.
- JARVIS, B.D.W., DICK, A.G. and GREENWOOD, R.M. (1980)
Deoxyribonucleic acid homology among strains of *Rhizobium*
trifolii and related species.
Int.J.Syst.Bacteriol. 30, 42-52.
- JORDAN, D.C. (1962)
The bacteroids of the genus *Rhizobium*.
Bact.Rev. 26 (2), 119-141.
- JORDAN, D.C. (1982)
Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Brady-*
rhizobium *gen.nov.*, a genus of slow-growing, root nodule
bacteria from leguminous plants.
Int.J.Syst.Bacteriol. 32, 136-139.
- KAVENOFF, R. and RYDER, O.A. (1976)
Electron microscopy of membrane-associated folded chro-
mosomes of *Escherichia coli*.
Chromosoma 55, 13-25.

- KEANE, P.J., KERR, A. and NEW, P.B. (1970)
Crown gall of stone fruit. II - Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates.
Aust.J.Biol.Sci. 23, 585-595.
- KELLENBERGER, E., RYTER, A. and SECHAUD, J. (1958)
Electron microscopic study of DNA-containing plasmids.
II - Vegetative and phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states.
J.Biophys.Biochem.Cytol. 4, 671-678.
- KERSTERS, K., DE LEY, J., SNEATH, P.H.A. and SACKIN, M. (1973)
Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*.
J.Gen.Microbiol. 78, 227-239.
- KHANAKA, H. (1980)
Sensibilité aux antibiotiques et aux antiseptiques chez *Rhizobium* et *Agrobacterium*.
Thèse de Docteur de 3ème Cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- KHANAKA, H., CATTEAU, M. and TAILLIEZ, R. (1981)
Antibiotic sensitivity in *Rhizobium* and *Agrobacterium*.
Zbl.Bakt.Hyg., 1 Abt., C₂, 282-288.
- KIJNE, J.W. (1975)
The fine structure of peat root nodules. I - Vacuolar changes after endocytotic host cell infection by *Rhizobium leguminosarum*.
Physiol.Plant.Pathol. 5, 75-79.
- KISHI, F., EBINA, Y., MIKI, T., NAKAZAWA, T. and NAKAZAWA, A. (1982)
Purification and characterization of a protein from *Escherichia coli* which forms complexes with superhelical and single-stranded DNAs.
J.Biochem. 92, 1059-1068.
- KLEPPE, K., ÖVREBÖ, S. and LOSSIUS, I. (1979)
The bacterial nucleoid.
J.Gen.Microbiol. 112, 1-13.
- KORNBERG, T., LOCKWOOD, A. and WORCEL, A. (1974)
Replication of *Escherichia coli* chromosome with a soluble enzyme system.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71, 3189-3193.
- KORNBERG, R.G. (1977)
Structure of chromatin.
Ann.Rev.Biochem. 46, 931-954.
- KROL, A.J.M., HONTELEZ, J.G.J., VAN DEN BOS, R.C. and VAN KAMMEN, A. (1980)
Expression of large plasmids in the endosymbiotic form of *Rhizobium leguminosarum*.
Nucleic Acids Research 8, 4337-4347.

- LAINE, B., SAUTIERE, P. and BISERTE, G. (1978)
The amino- and carboxy-terminal amino acid sequences of protein HU from *Escherichia coli*.
FEBS Letters 89, 116-120.
- LAINE, B., BELAÏCHE, D., SAUTIERE, P. and BISERTE, G. (1982)
Characterization and structural study of the DNA-binding protein HRm from *Rhizobium meliloti*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 106 (1), 101-107.
- LAINE, B., BELAÏCHE, D., KHANAKA, H. and SAUTIERE, P. (1983)
Primary structure of the DNA-binding protein HRm from *Rhizobium meliloti*.
Eur. J. Biochem. 131, 325-331.
- LAMMI, M., PACI, M. and GUALERZI, C.O. (1984)
Proteins from the prokaryotic nucleoid. The interaction between protein NS and DNA involves the oligomeric form of the protein and at least one Arg residue.
FEBS Letters 170, 1405-1411.
- LATHE, R., BUC, H., LECOCQ, J.P. and BAUTZ, E. (1980)
Prokaryotic histone-like protein interacting with RNA polymerase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3548-3552.
- LEDEBOER, A.M. (1978)
Large plasmids in *Rhizobiaceae*.
ph.D. thesis, Leiden University, Leiden, The Netherlands.
- LIAO, L.W. and COLE, R.D. (1981)
Differences among subfractions of H1 histone in their interactions with linear and superhelical DNA.
J. Biol. Chem. 256, 6751-6755.
- LIPMAN, J.C. and CONYBEARE, A.B. (1936)
Bull. N. J. Agric. Exp. Sta. 607.
- LOSSO, M.A., MIANO, A., GIANFRANCESCHI, G.L. and GUALERZI, C.O. (1982)
Proteins from the prokaryotic nucleoid. II - Inhibition of DNA transcription by NS1 and NS2 (HU proteins).
Biochem. Int. 5(3), 423-427.
- MANIS, J.J., MILLER, J.R. and KLINE, B.C. (1976)
Partial characterization of nucleoids and nucleoid-plasmid complexes from *Salmonella typhimurium*.
J. Bacteriol. 127, 664-666.
- 't MANNETJE, L. (1967)
A re-examination of the taxonomy of the genus *Rhizobium* and related genera using numerical analysis.
Antonie van Leeuwenhoek 33, 477-491.

- MASTERSON, R.V., RUSSELL, P.R. and ATHERLY, A.G. (1982)
Nitrogen fixation (*nif*) genes and large plasmids of
Rhizobium japonicum.
J. Bacteriol. 152 (2), 928-931.
- MIANO, A., LOSSO, M.A., GIANFRANCESCHI, G.L. and GUALERZI, C.O. (1982)
Proteins from the prokaryotic nucleoid. I - Effect of NSI
and NS2 (HU) proteins on the thermal stability of DNA.
Biochem. Int. 5 (3), 415-422.
- MOFFETT, M.L. and COLWELL, R.R. (1968)
Adansonian analysis of the *Rhizobiaceae*.
J. Gen. Microbiol. 51, 245-266.
- MONCANY, M.L.J. (1982)
Determination des conditions intracellulaires chez *E. coli*.
Conséquences biologiques de leur modification.
Thèse de Docteur es-Sciences, Université de Paris VII.
- NAKAYAMA, T. (1980)
Purification of *B. subtilis* DNA-binding protein related
to *E. coli* HU.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 318-324.
- NUTI, M.P., LEDEBOER, A.M., LEPIDI, A.A. and SCHILPEROORT, R.A. (1977)
Large plasmids in different *Rhizobium* species.
J. Gen. Microbiol. 100, 241-248.
- NUTI, M.P., LEPIDI, A.A., PRAKASH, R.K., SCHILPEROORT, R.A. and
CANNON, F.C. (1979)
Evidence for nitrogen fixation *nif* genes on indigenous
Rhizobium plasmids.
Nature 282, 533-535.
- NUTMAN, P.S. (1965)
The relation between nodule bacteria and the legume host
in the rhizosphere and the process of infection.
in "Ecology of Soil. Borne plant pathogens" Eds BAKER, K.F.
and SNYDER, W.C. University of California Press, Berkeley,
pp. 231-247.
- OHLENDORF, D.H., ANDERSON, W.F., FISHER, R.G., TAKEDA, Y. and
MATTHEWS, B.W. (1982)
The molecular basis of DNA-protein recognition inferred
from the structure of *cro* repressor.
Nature 298, 718-723.
- OUDET, P., GROSS-BELLARD, M. and CHAMBON, P. (1975)
Electron microscopic and biochemical evidence that chroma-
tin structure is a repeating unit.
Cell 4, 281-300.

- PETTIJOHN, D.E., HECHT, R.M., STONINGTON, G.O. and STAMATO, T.D. (1972)
 Factors stabilizing DNA folding in bacterial chromosomes.
 in "DNA synthesis in vitro" Eds WELLS, R.D. and INMAN, R.B.,
 University Park Press, Baltimore, pp.145-162.
- PETTIJOHN, D.E. (1976)
 Prokaryotic DNA in nucleoid structure.
CRC Critical Reviews in Biochemistry 4, 175-202.
- PORTALIER, R. and WORCEL, A. (1976)
 Association of the folded chromosomes with the cell envelope of *E. coli* : characterization of the proteins at the DNA-membrane attachment site.
Cell 8, 245-255.
- PRAKASH, R.K., HOOYKAAS, P.J.J., LEDEBOER, A.M., KIJNE, J.W., SCHILPEROORT, R.A., NUTI, M.P., LEPIDI, A.A., CASSE, F., BOUCHER, C., JULLIOT, J.S. and DENARIE, J. (1980)
 Detection, isolation and characterization of large plasmids in *Rhizobium*.
 in "Nitrogen fixation", Vol II pp.139-163, Univ. Park Press, Baltimore, Maryland.
- RAAF, J. and BONNER, J. (1968)
 Properties of *Escherichia coli* deoxyribonucleoprotein as compared with the deoxyribonucleoprotein of higher organisms.
Arch. Biochem. Biophys. 125, 567-579.
- ROBERTS, G.P., LEPS, W.T., SILVER, L.E. and BRILL, W.J. (1980)
 Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains.
Appl. Environ. Microbiol. 39, 414-422.
- ROSENBERG, C., CASSE-DELBART, F., BOISTARD, P., TRUCHET, G. and DENARIE, J. (1981)
 in "Current perspectives in Nitrogen Fixation".
 Eds. GIBSON, A.H. and NEWTON, W.E., Griffin Press., Netley, S. Australia, pp.137-141.
- ROUVIERE-YANIV, J. and GROS, F. (1975)
 Characterization of a novel, low-molecular weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3428-3432.
- ROUVIERE-YANIV, J., GROS, F., HASELKORN, R. and REISS, C. (1977)
 Histone-like proteins in prokaryotic organisms and their interaction with DNA.
 in "The organization and expression of the eukaryotic genome" Eds. BRADBURY, E.M. and JAVAHERIAN, K., Academic Press, New York, pp.211-231.

- ROUVIERE-YANIV, J. (1978)
Localization on the HU protein on the *Escherichia coli* nucleoid.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 439-447. Cold Spring Harbor Laboratory, New York 11724.
- ROUVIERE-YANIV, J., YANIV, M. and GERMOND, J.E. (1979)
E. coli DNA-binding protein HU forms nucleosome-like structure with circular double stranded DNA.
Cell 17, 265-274.
- RUVKUN, G.B. and AUSUBEL, F.M. (1980)
Interspecies homology of nitrogenase genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 11, 191-195.
- RYTER, A. (1968)
Association of the nucleus and the membrane of bacteria : a morphological study.
Bacteriol. Rev. 32, 39-54.
- RYTER, A. and CHANG, A. (1975)
Localization of transcribing genes in the bacterial cell by means of high resolution autoradiography.
J. Mol. Biol. 98, 797-810.
- SADOFF, H.L., SHIMEL, B. and ELLIS, S. (1979)
Characterization of *Azotobacter vinelandii* deoxyribonucleic acid and folded chromosomes.
J. Bacteriol. 138, 871-877.
- SEARCY, D.G. (1975)
Histone-like protein in the procaryote *Thermoplasma acidophilum*.
Biochim. Biophys. Acta 395, 535-547.
- SOKAL, R.R. and MICHENER, C.D. (1958)
A statistical method for evaluating systematic relationships.
Kansas Univ. Sci. Bull. 38, 1409-1438.
- SPASSKY, A. and BUC, H. (1977)
Physico-chemical properties of a DNA-binding protein : *Escherichia coli* Factor H1.
Eur. J. Biochem. 81, 79-90.
- STEIN, D.B. and SEARCY, D.G. (1978)
Physiologically important stabilization of DNA by a prokaryotic histone-like protein.
Science 202, 219-221.
- STONINGTON, G.O. and PETTIJOHN, D.E. (1971)
The folded genome of *Escherichia coli* isolated in a protein-DNA-RNA complex.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 6-9.

- SURYANARAYANA, T. and SUBRAMANIAN, A.R. (1978)
Specific association of two homologous DNA-binding proteins to the native 30-S ribosomal subunits of *Escherichia coli*.
Biochim.Biophys.Acta 520, 342-357.
- SUTRINA, S.L. and SCOCCA, J.J. (1983)
DNA-binding proteins of *Haemophilus influenzae* : purification and characterization of a major intracellular binding protein.
J.Bacteriol. 155, 246-253.
- TAKEUCHI, M. and TSUGITA, A. (1970)
Isolation and characterization of nucleoprotein, "nuclear fraction" from *Bacillus subtilis*.
J.Biochem. 67, 237-248.
- TEMPST, P. and VAN BEEUMEN, J. (1983)
The amino acid sequence of cytochrome C-556 from *Agrobacterium tumefaciens* strain Apple 185.
Eur.J.Biochem. 135, 321-330.
- VAN BEEUMEN, J. (1980)
On the evolution of bacterial cytochrome C.
28th Colloquium Protides of the Biological fluids, Brussels, 28, 61-68.
- VARSHAVSKY, A.J., NEDOSPASOV, S.A., BAKAYEV, V.V., BAKAYEVA, T.G. and GEORGIEV, G.P. (1977)
Histone-like proteins in the purified *Escherichia coli* deoxyribonucleoprotein.
Nucleic Acids Research 4, 2725-2745.
- VINCENT, J.M. (1974)
Root-nodules symbioses with *Rhizobium*. The biology of nitrogen fixation (A.Quispel, Editor).
Frontiers of Biology 33, 265-341.
- WHITE, L.O. (1972)
The taxonomy of the crown-gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to Rhizobia and other Agrobacteria.
J.Gen.Microbiol. 72, 565-574.
- WORCEL, A. and BURGI, E. (1972)
On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*.
J.Mol.Biol. 71, 127-147.
- WORCEL, A. and BURGI, E. (1974)
Properties of a membrane-attached form of the folded chromosome of *Escherichia coli*.
J.Mol.Biol. 82, 91-105.

- WU, F.Y.H., KOLB, A. and BUC, H. (1982)
A transcriptionally active plasmid-protein complex isolated from *Escherichia coli*.
Biochim.Biophys.Acta 696, 231-238.
- ZAENEN, I., VAN LAREBEKE, N., TEUCHY, H., VAN MONTAGU, M. and SCHELL, J. (1974)
Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains.
J.Mol.Biol. 86, 109-127.
- ZENTGRAF, H., BERTHOLD, V. and GEIDER, K. (1977)
Interaction of DNA with DNA binding proteins. II - Displacement of *Escherichia coli* DNA unwinding protein and the condensed structure of DNA complexed with protein HD.
Biochim.Biophys.Acta 474, 629-638.
- ZURKOWSKI, W. and LORKIEWICZ, Z. (1976)
Plasmid deoxyribonucleic acid in *Rhizobium trifolii*.
J.Bacteriol. 128, 481-484.

PARTIE TECHNIQUE

MATERIEL ET METHODES

PLAN DE LA PARTIE TECHNIQUE - MATERIEL ET METHODES

- I SOUCHES BACTERIENNES
- II MILIEUX DE CULTURE
- III CULTURE EN MASSE DES BACTERIES
- IV TESTS DE NODULATION *IN VITRO* (INFECTIVITE)
- V EFFICIENCE
- VI EXTRACTION ET PURIFICATION DU DNA BACTERIEN
- VII PREPARATION DU PLASMIDE
- VIII ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE
- IX PREPARATION DES PROTEINES DE TYPE HU
- X TECHNIQUE D'IMMUNODIFFUSION D'OUCHTERLONY

I - SOUCHES BACTERIENNES

Nous avons choisi pour notre étude quatre souches de *Rhizobium*, une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* et deux souches d'*Escherichia coli*. Il s'agit de *Rhizobium meliloti* souche 2011 Str3, *Rhizobium leguminosarum* souche L18 et L53, *Rhizobium japonicum* souche J5 (à croissance lente), *Agrobacterium tumefaciens* souche AB6 et *Escherichia coli* souche W3350 et HB101 (possédant le plasmide pBR322).

Toutes les souches de *Rhizobium* utilisées sont capables de noduler leurs plantes hôtes et sont efficaces.

Les caractéristiques et origines de ces souches sont présentées dans le tableau VIII.

II - MILIEUX DE CULTURE

II - 1 Tampon exempt d'azote RN⁻

MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
Eau distillée, q.s.p.	1 litre
pH 7.2 à 7.5	

La stérilisation se fait à 120°C pendant 20 minutes. Nous avons employé ce tampon dépourvu d'azote pour laver la culture de *Rhizobium* avant l'inoculation dans le milieu de NICOL et THORNTON (voir II - 4).

TABLEAU VIII

ORIGINE DES SOUCHES UTILISEES

Souches	Appellation d'origine	Origine	Isolement	Phénotype
AB6	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	R.U.G.	Pommier Grown gall Strenandram IWA U.S.A. 1963	Sauvage
2011 Str3	<i>Rhizobium meliloti</i>	Versailles J.DENARIE		Str R
L18	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	R.I.O.	non connu	Sauvage
L53	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	R.I.O.	<i>Pisum arvense</i> 1928	Sauvage
J5	<i>Rhizobium japonicum</i>	Gembloux	Soja 1956	Sauvage
W3350	<i>Escherichia coli</i>	Institut Pasteur Paris		Sauvage
HB101	<i>Escherichia coli</i>	Institut Pasteur Lille		Sauvage

R.U.G. = Rijksuniversiteit Gent Belgium

R.I.O. = Research Institute of Ontario, Canada

II - 2 Milieu complet RC

Les cultures et la conservation des souches de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* sont réalisées sur le milieu complet RC de composition :

K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4, 7 H_2O$	0.2 g
Extrait de levure Difco	1 g
Eau distillée, q.s.p.	1 litre
pH 7.2 à 7.5	

Le milieu est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. La source de carbone (glucose) est additionnée de façon à avoir une concentration de 1 p.100 ; celle-ci est préalablement stérilisée à 105°C pendant 30 minutes. Le milieu est éventuellement gélosé (RCG) à l'aide de Bacto Agar (Difco) à la concentration de 15 g/l.

II - 3 Milieu TY (Tryptone-yeast)

Bactotryptone Difco	5 g
Extrait de levure Difco	3 g
$CaCl_2, 6 H_2O$	1.3 g
Eau distillée, q.s.p.	1 litre
pH 7.2 à 7.5	

Le milieu est stérilisé à 120°C durant 20 minutes. Le

glucose est additionné après stérilisation à une concentration de 10 g/litre.

Ce milieu est utilisé pour la préculture et culture des souches de *Rhizobium* et *Agrobacterium* en fermenteur.

II - 4 Milieu NT de NICOL et THORNTON

Ce milieu est utilisé pour la culture des légumineuses.

Il est composé de :

K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4$	0.2 g
NaCl	0.1 g
$FePO_4$	1 g
$Ca_3(PO_4)_2$	2 g
$FeCl_3$	1 ml d'une solution mère à 10 g/l
Eau du robinet, q.s.p.	1 litre pH 7

La stérilisation du milieu se fait à 105°C pendant 30 minutes après avoir été réparti en tubes.

II - 5 Milieu riche de LURIA

La composition est la suivante :

NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Extrait de levure Difco	5 g
Eau distillée, q.s.p.	1 litre pH 7.3 - 7.4

Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes. Ce milieu éventuellement gélosé à 15 g/litre de Bacto Agar (Difco) est utilisé pour la culture de *Escherichia coli* HB101.

II - 6 Milieu 63B1

KH_2PO_4	1.35 g
K_2HPO_4	12.25 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
$\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	0.2 g
CaCl_2	0.01 g
$\text{FeSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	0.05 g
Glucose	10 g
Extrait de levure	1 g
Hydrolysate de caséine	0.3 g
Eau distillée, q.s.p.	1 litre pH 7.4

La stérilisation se fait à 120°C pendant 20 minutes. Ce milieu est utilisé pour la culture en fermenteur de *Escherichia coli* souche W3350.

III - CULTURE EN MASSE DES BACTERIES

Les biomasses de bactéries : *Rhizobium*, *Agrobacterium* et *Escherichia coli* souche W3350 sont effectuées en fermenteur Biolafitte de 20 litres (volume utile 14 litres) dans les conditions décrites ci-dessous.

III - 1 Biomasse de *Rhizobium* et *Agrobacterium*

Milieu de fermentation : milieu de TY glucosé

Paramètres de la fermentation :

Agitation : 300 tours/minute

Aération : 3 l/minute

$K_1 a^*$: 100 mM O₂/h.l

pH : régulation à 7.2 avec KOH 3N ou H₃PO₄ 3N

Température : 30°C

Durée de la fermentation : la croissance est suivie par mesure de la densité optique à 600 nm. La culture est arrêtée en fin de phase exponentielle et les cellules sont récupérées par centrifugation en continu.

III - 2 Biomasse de *Escherichia coli* souche W3350

Milieu de fermentation : milieu 63B1

Paramètres de la fermentation :

Agitation : 400 à 800 tours/minute

Aération : 4 à 7 l/minute

$K_1 a^*$: 450 à 2500 mM O₂/h.l

Température : 37°C

Le pH n'est pas stabilisé et varie de 7.4 à 6.5

Durée de la fermentation : après 8 heures de croissance en fin de phase exponentielle, les cellules sont récupérées par centrifugation en continu.

$K_1 a^*$ = coefficient d'absorption volumétrique de l'oxygène.

IV - TESTS DE NODULATION IN VITRO (INFECTIVITE)

L'infectivité représente la capacité des bactéries du genre *Rhizobium* d'infecter les racines de certaines légumineuses et d'y provoquer l'apparition des nodules. Ce caractère se note Nod⁺ ; il se différencie difficilement de la spécificité d'hôte.

IV - 1 Stérilisation des graines (luzerne, petit pois, soja)

Les graines sont triées et réparties dans une boîte de Petri contenant une goutte de détergent (Teepol). On recouvre les graines de 20 ml de chlorure mercurique à 2.5 g/litre. Après 5 minutes d'agitation, le désinfectant est éliminé par plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile.

IV - 2 Germination des graines

La technique de mise en culture varie en fonction de la taille des graines.

Pour les graines de luzerne on dépose stérilement une vingtaine de graines par boîte sur un milieu riche (RCG glucosé, voir II - 2) afin de contrôler la stérilité et la germination. La prégermination dure 2 à 4 jours à 30°C. La racine atteint alors 1 à 2 cm de longueur.



Pour les graines de petit pois et de soja, des boîtes de Petri en verre (diamètre 140 mm) sont tapissées d'une couche de coton hydrophile de 5 mm d'épaisseur environ, elle-même recouverte d'un disque de papier filtre. L'ensemble est imbibé de 100 ml d'eau du robinet. Après emballage dans un papier kraft et d'aluminium, les boîtes sont autoclavées à 120°C pendant 20 minutes. Sept graines désinfectées sont alors déposées stérilement dans ces boîtes et placées pendant des périodes variant de 48 heures à 72 heures dans une étuve dont la température est réglée à 30°C.

IV - 3 Inoculation et culture des plantules

Pour les petites graines (luzerne) les plantules dont les racines ont atteint 1 à 2 cm sont immergées pendant 3 heures dans une suspension bactérienne concentrée préalablement centrifugée et lavée dans le tampon RN⁻ (voir partie technique II - 1) (culture en phase exponentielle de croissance).

Les plantules sont placées stérilement sur le support dans le tube à raison d'une plantule par tube. L'incubation s'effectue dans les conditions suivantes : 16 heures d'éclairage, 8 heures d'obscurité à la température de 26°C.

Pour les grosses graines (petit pois, soja) la culture bactérienne est centrifugée, lavée par du tampon RN⁻ et remise en suspension dans le même tampon. Cette suspension bactérienne est ajoutée directement au milieu de NICOL et THORNTON dans les récipients de culture décrits ci-après.

Les plantules sont mises en culture dans un pot en matière plastique stérile de 200 ml rempli stérilement de milieu de NICOL et THORNTON. Le couvercle est alors placé à l'aide d'un emporte-pièce stérilisé à la flamme. La plantule est déposée sur le couvercle, la racine plongeant dans le milieu. Un second récipient en plastique transparent est placé sur le premier. La culture s'effectue dans les mêmes conditions que précédemment.

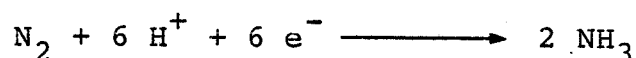
V - EFFICIENCE

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

V - 1 Principe de la méthode

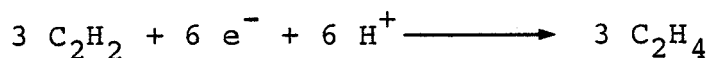
DILWORTH (1966) et SCHOLLHORN et coll. (1967) ont montré que l'acétylène était réduit en éthylène par le système de la nitrogénase chez *Clostridium pasteurianum*.

La nitrogénase est l'enzyme qui catalyse la fixation d'azote ou la réduction assimilatrice d'azote. La réaction peut être schématisée de la façon suivante :



Cet enzyme est peu spécifique : il peut transférer des électrons aux substrats homologues au N_2 comme la C_2H_2 , N_2O , HCN etc....

La réduction de l'acétylène est réalisée suivant la réaction :



Elle correspond au transfert de deux électrons par molécule d'éthylène formée, alors qu'il faut six électrons pour réduire une molécule d'azote.

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

V - 2 Conditions expérimentales

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

Gaz vecteur	: N_2
Température du four	: $50^\circ C$
Température d'injection	: $70^\circ C$
Température du détecteur	: $115^\circ C$
Détecteur	: à ionisation de flamme

La colonne en acier inoxydable, de 2 mètres de longueur, et de 0.31 cm de diamètre, est remplie de sphérosil XoBo 75.

V - 3 Technique de dosage

Quand les plantules sont bien développées (2 à 3 mois), elles sont lavées avec de l'eau distillée, sont mises dans un flacon de 150 ml fermé hermétiquement. On prélève d'abord à l'aide d'une seringue à travers le bouchon de caoutchouc, 17 ml d'air du flacon que l'on remplace par 15 ml d'acétylène soit 10 p.100 (v/v) et 2 ml de propane dilué 100 fois par l'air (témoin interne) de façon à avoir approximativement 1.27 μ moles. Le flacon est ensuite homogénéisé par agitation manuelle. L'incubation se fait à l'étuve à 30°C. La mesure d'acétylène réduit est effectuée à différents temps (0,3,6,24 heures) par injection de 50 μ l dans le chromatographe en phase gazeuse, jusqu'à ce que la courbe de la formation d'éthylène atteigne un plateau.

V - 4 Calcul de la quantité d'éthylène produite (ΔQ)

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

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

Tels que : Q = Nombre de moles de C_2H_4 produites

C = Nombre de moles de C_3H_8 injectées

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

(Dans notre expérience :

$$K = \frac{\text{Hauteur de pic } C_3H_8}{\text{Hauteur de pic } C_2H_4} = 1.5)$$

H_1 = Hauteur de pic de C_2H_4

H_2 = Hauteur de pic de C_3H_8

$$\Delta Q = Q_6 - Q_0$$

où Q_6 = Nombre de moles de C_2H_4 produites au temps
T 6 heures

Q_0 = Nombre de moles de C_3H_8 produites au temps
T 0 heure

V - 5 Détermination du poids sec de la plantule

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

VI EXTRACTION ET PURIFICATION DU DNA BACTERIEN

Le DNA de *R.meliloti* et de *E.coli* a été préparé par la méthode de KIN ICHIRO MIURA (1967). Cette méthode permet l'extraction de DNA sur des culots bactériens de 3 à 100 grammes ; elle a été légèrement modifiée par nous-mêmes. Toutes les valeurs sont données pour 6 grammes de cellules.

Les cultures effectuées en milieu TY pour *R.meliloti* ou milieu 63B1 pour *E.coli* sont centrifugées à 1630 g pendant 15 minutes à 4°C. Pour le lavage le culot est remis en suspension dans du tampon (NaCl 0.15 M, EDTA 0.1 M, pH 8) puis à nouveau soumis à une centrifugation. Le culot final est repris dans 10 fois son poids du même tampon.

Pour 6 grammes de cellules, on dissout 12 mg de lysozyme (Sigma) dans 6 ml de tampon EDTA 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 8 ; le mélange cellules-lysozyme est homogénéisé à 37°C pendant 30 minutes dans une fiole à col rodé (on prolonge le temps si la lyse est incomplète). Cette lyse est complétée par des congélations-décongélations successives : le lysat placé dans un pot en acier inoxydable est congelé rapidement dans un bain d'azote liquide, il est décongelé jusqu'à liquéfaction totale dans un bain-marie à 60°C. Cette opération est répétée trois fois.

Après la dernière décongélation, le mélange est complété par 50 ml de tampon "Tris-SDS" (Tris-hydroxyméthyl-aminométhane 0.1 M, SDS 1 p.100, NaCl 0.1 M, pH 9). Après homogénéisation

(avec une baguette de verre), le lysat est placé 30 minutes à 60°C, si la lyse est incomplète une nouvelle congélation-décongélation est pratiquée.

Le mélange, après addition d'un volume de phénol saturé de tampon Tris-SDS (400 ml de Tris-SDS dans 1 litre de phénol liquéfié) est déprotéinisé par agitation dans un erlenmeyer, fermé par un bouchon rodé, pendant 20 minutes dans un bain de glace. Après une centrifugation de 15 minutes à 1800 g trois phases sont observées :

- phase supérieure aqueuse
- phase intermédiaire
- phase inférieure organique

La phase aqueuse est récupérée et débarrassée des débris restants par centrifugation à 16300 g 20 minutes à 4°C. Le DNA du surnageant est précipité par deux volumes d'alcool éthylique pur (-20°C). Les fibres de DNA récupérées autour d'une tige de verre sont redissoutes dans du tampon SSC dilué au 1/10e (20 à 40 ml pour 6 g de cellules) durant une douzaine d'heures à 45°C. Cette solution est traitée à 37°C par la ribonucléase A (30 µg/ml dissoute dans NaCl 0.15M pH 5) pendant 30 minutes. Une nouvelle déprotéinisation dans un volume de phénol est effectuée et, comme précédemment, le surnageant est récupéré après centrifugation. Le DNA est précipité par deux volumes d'alcool éthylique pur (-20°C) et redissous dans du SSC dilué au 1/10e (20 ml pour 6 g de cellules) pendant 12 heures à 45°C.

La solution finale est jugée d'une pureté satisfaisante si les rapports d'absorbance $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ et $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ sont égaux ou supérieurs à 1.8. L'échantillon peut être conservé plusieurs mois à 4°C en présence de quelques gouttes de chloroforme.

VII - PREPARATION DU PLASMIDE

Cette méthode de préparation a été décrite par BETLACH et coll. (1976). Elle est utilisée pour préparer des plasmides de petite taille (< 25 k.b.) amplifiables chez *E. coli* (PBR322).

La souche HB101 de *E. coli* contenant le plasmide PBR322 à préparer est cultivée durant 15 heures dans 5 ml de milieu de LURIA avec 1' (ou les) antibiotique (s) correspondant à la (aux) résistance (s) conférée(s) par le plasmide.

1 ml de cette préculture sert à inoculer 200 ml de milieu de 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 p.100) est ajouté jusqu'à la concentration finale de 170 à 200 µg/ml. L'incubation dure 12 (ou 15) heures à 30°C sous agitation lente. Le chloramphénicol est un antibiotique qui bloque les synthèses protéiques nécessaires à la division de la bactérie et à l'initiation de la replication du chromosome (CLEWELL, 1972).

Les bactéries sont récupérées par centrifugation (4°C, 8000 t/15 min) et remises en suspension dans 3 ml de tampon ST (Tris-HCl 50 mM - Saccharose 25 p.100, pH 8). Pour la lyse 1 ml d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml dans du Tris-HCl 50 mM, pH 8 est ajouté ; une agitation lente durant 5 minutes dans la glace provoque l'hydrolyse de la paroi bactérienne. La lyse complète est obtenue en ajoutant 5 ml d'une solution de Triton X 100 contenant pour 100 ml, 1 ml de Triton X 100 à 10 p.100, 12,5 ml d'EDTA 200 mM, 5 ml de Tris-HCl 1M, pH 8. Lorsque le liquide devient visqueux l'opération est terminée.

On centrifuge ensuite (Rotor Beckman SW50-1, 4°C, 25000 t/min 1 heure ou rotor SW27, tubes de polycarbonate 4°C, 22000 t/min 1 heure). Pour 0.95 ml de surnageant, on ajoute 1 g de CsCl et 50 µl d'une solution de bromure d'éthidium à 1 mg/ml dans l'eau. Après centrifugation durant 48 heures (rotor 50Ti, 10°C, 38000 t/min) la bande inférieure de nature plasmidique 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). Après dialyse durant 12 heures contre du tampon TES (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 5 mM, pH 7.4 à 4°C) on mesure la densité optique à 260 nm et 280 nm pour évaluer la pureté et la concentration de l'ADN plasmidique obtenu.

VIII - ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE

L'électrophorèse est réalisée horizontalement (l/L/e : 10cm/21cm/0.8cm - Biorad electrophoresis cell 1415) ou verticalement (14cm/16cm/0.3cm - Biorad protean cell).

Un gel d'agarose (Sigma, grade 1 - IBF indubiose A37NA) à 0.8 p.100 est préparé dans le tampon d'électrophorèse TBE (Tris 89 mM, EDTA 2.5 mM, Borate 89 mM, pH 8.3). La concentration du gel utilisée par les auteurs varie de 0.7 à 0.9 p.100 en agarose (CASSE et coll.,1979; JOHNSON et coll.,1977; PARKER et coll.,1977). Le 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 coll., 1976). Les gels sont néanmoins réfrigérés à 18°C pendant la durée de l'électrophorèse.

La visualisation des bandes plasmidiques s'effectue par le bromure d'éthidium soit incorporé directement dans le gel d'agarose (q.s.p.0.5 µg/ml), soit placé dans un bain (q.s.p. 0.5 µg/ml) dans lequel est immergé le gel après électrophorèse (45 minutes). Ce colorant est le plus utilisé pour révéler les acides nucléiques en gradient de CsCl (CURRIER et coll.,1976; MEYERS et coll.,1976) ainsi qu'en électrophorèse (CASSE et coll.,1979; JOHNSON et coll.,1977; PARKER et coll.,1977). Le bromure d'éthidium s'intercale entre les paires de bases de l'ADN et donne une fluorescence en ultraviolet à 302 nm.

Les gels placés sur le transilluminateur sont photographiés au moyen d'un appareil muni d'une combinaison de filtres couleur Polaroid MP10.

IX - PREPARATION DES PROTEINES DE TYPE HU

Les protéines de type HU sont préparées à partir d'un extrait bactérien par chromatographie d'affinité sur une colonne de DNA-cellulose.

Nous exposerons successivement la préparation de l'extrait bactérien puis la méthode de chromatographie sur colonne de DNA-cellulose.

IX - 1 Préparation de l'extrait bactérien

Les bactéries (50 g) sont homogénéisées pendant 3 minutes dans 200 ml de tampon T-1700 contenant du 2-mercaptoéthanol 1 mM, à l'aide d'un homogénéiseur Waring Blendor. Le tampon T est un tampon Tris/HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM, NaCl dont la molarité exprimée en mM est indiquée par le chiffre qui suit la lettre T. La paroi bactérienne est éclatée par passage dans une presse de FRENCH avec une pression de 1100 bars (16.000 psi) et le broyat est centrifugé à 8000 g pendant 1 heure pour éliminer les débris membranaires. Le surnageant est alors additionné de polyéthylène glycol 6000 (concentration finale 10 p.100). Après une agitation douce pendant 30 minutes, le mélange est centrifugé à 8000 g pendant 1 heure. Le sédiment renfermant les acides nucléiques est éliminé. Le surnageant est dialysé contre un tampon T-50 contenant du 2-mercaptoéthanol 1 mM pour amener la molarité en NaCl à 50 mM.

IX - 2 Chromatographie sur colonne de DNA-cellulose

IX - 2-1 Préparation de la DNA-cellulose

La DNA-cellulose (DNA bicaténaire) a été préparée par la méthode de REICHART (1972).

IX - 2-1-1 Préparation de la cellulose

La cellulose Whatman CF 11 (100 g) est mise en suspension dans deux litres d'eau distillée. Les particules les plus fines sont éliminées par aspiration du surnageant après décantation de la suspension de cellulose. Cette opération est répétée deux fois après resuspension de la cellulose dans l'eau distillée et deux fois après resuspension dans un mélange éthanol-eau (1:1, v/v). La cellulose est ensuite resuspendue dans l'éthanol absolu que l'on élimine ensuite par filtration sur un Büchner garni de papier Whatman 3MM. La cellulose est lavée deux fois avec un litre d'eau distillée. La cellulose est traitée successivement par de la soude 0.5M et par de l'acide chlorhydrique 0.5M. Après chaque traitement, la cellulose est lavée avec de l'eau distillée et les solvants sont éliminés par filtration sur un Büchner. Après le traitement par la solution acide, le pH de l'eau de lavage doit être supérieur à 5. La cellulose est séchée pendant 18 heures sous courant d'air froid, puis lyophilisée pendant 48 heures.

IX - 2-1-2 Couplage du DNA à la cellulose

200 mg de DNA de *Rhizobium meliloti* 2011 Str3 préparé par la méthode de KIN ICHIRO MIURA (1967), sont dissous dans 100 ml de tampon Tris-HCl 10 mM ajusté à pH 8.0 et contenant de l'EDTA 1 mM. Pour obtenir une bonne solubilisation, la solution de DNA est maintenue sous agitation très douce pendant 18 heures. L'absorbance à 260 nm (A_{260}°) d'une partie aliquote de cette solution diluée au centième est mesurée, ce qui permettra de calculer le rendement du couplage du DNA à la cellulose.

On ajoute la cellulose purifiée par petites quantités et sous agitation (1 g de cellulose pour 3 ml d'une solution de DNA à 2 mg/ml). La "pâte" de DNA-cellulose obtenue est séchée pendant la nuit sous un courant d'air froid, puis est lyophilisée pendant 48 heures.

La DNA-cellulose est traitée dans un mortier afin d'obtenir une poudre fine, puis est resuspendue dans 400 ml d'éthanol absolu. La suspension de DNA-cellulose est placée par fractions de 50 ml dans un cristallisateur dont la base a une surface de 125 cm^2 et est maintenue sous agitation pour être irradiée par une lampe UV avec une énergie par unité de surface de $100.000 \text{ ergs/mm}^2$.

La DNA-cellulose est lavée avec de l'éthanol absolu, puis avec un litre de tampon Tris-HCl 10 mM pH 8.0 contenant de l'EDTA 1 mM. Le solvant est ensuite éliminé sur un Büchner.

L'absorbance à 260 nm (A_{260}^1) du filtrat est mesurée. La quantité de DNA fixé sur la cellulose est calculée à partir de la différence $A_{260}^0 \times 10 - A_{260}^1$, sachant que 1 mg de DNA a une absorbance de 2.10^{-2} unité de densité optique. Nous avons obtenu un rendement de fixation du DNA sur la cellulose de 70 p.100.

IX - 2-1-3 Conditions utilisées pour la chromatographie sur colonne de DNA-cellulose

La chromatographie est effectuée à 4°C. Le dialysat de l'extrait bactérien, clarifié par centrifugation est amené à une concentration de 10 p.100 en glycérol avant d'être déposé sur la colonne de DNA-cellulose. Tous les tampons utilisés pour équilibrer ou éluer la colonne contiennent 10 p.100 de glycérol.

La colonne de DNA-cellulose (2,5 x 20 cm) est équilibrée par le tampon T-50. Après le dépôt de l'extrait bactérien (environ 600 ml), la colonne est lavée par le tampon d'équilibration jusqu'à ce que la densité optique de l'éluat revienne à la ligne de base. La colonne est ensuite éluee par le tampon T dont on augmente la molarité en NaCl comme il est indiqué dans l'exposé des résultats.

X - TECHNIQUE D'IMMUNODIFFUSION D'OUCHTERLONY

X - 1 Préparation de l'immunsérum

L'immunsérum a été préparé en immunisant un Lapin avec 0.5 mg de protéine HRm de *Rhizobium meliloti*. Chaque injection, répétée trois fois à une semaine d'intervalle puis à un mois d'intervalle, contient 0.1 mg d'antigène dissous dans 0.1 ml de NaCl 0.15 M auquel on ajoute 0.1 ml d'adjuvant complet de FREUND (Difco). Le sang est prélevé (10 ml) tous les quinze jours à partir d'un mois après la première injection.

X - 2 Préparation des immunoglobulines

Les immunoglobulines G ont été préparées à partir de l'immunsérum par la technique de WIDE (1969). A 1 ml d'immunsérum on ajoute 1 ml de Na_2SO_4 1 M. Le mélange est maintenu sous agitation douce pendant 1 heure à 25°C. Les immunoglobulines qui ont précipité sont obtenues par centrifugation à 4000 g pendant 20 minutes. Le culot est lavé par du tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7.4 contenant du Na_2SO_4 0.5 M. Les immunoglobulines sont dissoutes dans l'eau distillée et dialysées 4 jours contre 500 ml d'eau déminéralisée. Les immunoglobulines M qui ont précipité sont éliminées par centrifugation. Les immunoglobulines G sont lyophilisées. Elles sont reprises (25 mg/ml) dans un tampon phosphate de sodium 10 mM de pH 7.4 contenant 20 p.100 de glycérol.

X - 3 Préparation du gel d'agar et immunodiffusion

Le support est un gel d'agar (spécial Agar noble Difco) à 0.9 p.100 en tampon phosphate de sodium 0.01 M de pH 7.4.

La clarification de ce mélange est effectuée au bain-marie bouillant.

3 ml d'agar sont coulés sur une lame de verre de 7,5 x 2,5 cm. Un puits central de 3 mm de diamètre et six puits périphériques de 2 mm de diamètre sont pratiqués dans le gel. 18 μ l d'immunoglobulines sont déposés dans le puits central ; 5 μ l de chacune des protéines dissoutes dans de l'eau distillée sont déposés dans les puits périphériques. La plaque est laissée 24 heures dans une atmosphère saturée d'eau à température ambiante. Elle est ensuite lavée dans du sérum physiologique, séchée à l'air ambiant, puis colorée par le bleu de Coomassie. La composition du bain de coloration est la suivante :

Coomassie Brillant blue R-250	5 g
Ethanol 95 p.100	450 ml
Acide acétique R.P.	100 ml
Eau désionisée	450 ml

La plaque est décolorée par simple diffusion dans un mélange éthanol- acide acétique-eau (45/10/45, v/v/v).

BIBLIOGRAPHIE DE LA PARTIE TECHNIQUE

- BETLACH, M.C., HERSHFIELD, V., CHOW, L., BROWN, W., GOODMAN, H.M. and BOYER, H.W. (1976)
A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the EcoRI restriction and modification of DNA.
Fed.Proc. 35, 2037-2043.
- CASSE, F., BOUCHER, C., JULLIOT, J.S., MICHEL, M. and DENARIE, J. (1979)
Identification and characterization of large plasmid in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis.
J.Gen.Microbiol. 113, 229-242.
- CLEWELL, D.B. (1972)
Nature of COLEI plasmid replication in the presence of chloramphenicol.
J.Bacteriol. 110, 667-676.
- CURRIER, T.C. and NESTER, E.W. (1976)
Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria.
Anal.Biochem. 76, 431-441.
- DILWORTH, M.J. (1966)
Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*.
Biochim.Biophys.Acta 127, 285-294.
- JOHNSON, P.H. and GROSSMAN, L.L. (1977)
Electrophoresis of DNA in agarose gels optimizing separation of conformation isomers of double and single-stranded DNAs.
Biochemistry 16, 4217-4224.
- MEYERS, J.A., SANCHEZ, D., ELWELL, L.P. and FALKOW, S. (1976)
Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid DNA.
J.Bacteriol. 127, 1529-1537.

MIURA, K.I. (1967)

Preparation of bacterial DNA by the phenol pH 9
RNase method.
in "Methods in Enzymology", Eds GROSSMAN, L.,
MOLDAVE, K. (Academic Press, New York), 12, 543-545.

PARKER, R.C., WASTON, R.M. and VINOGRAD, J. (1977)

Mapping of closed circular DNAs by cleavage with res-
triction endonucleases and calibration by agarose gel
electrophoresis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 851-855.

REICHART, L. (1972)

Ph.D. Dissertation, Dept. of Biochemistry, Stanford
University, USA.

SCHOLLHORN, R. and BURRIS, R.H. (1967)

Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 213-216.

WIDE, L. (1969)

Radioimmunoassays employing immunoabsorbents.
in "Ist Karolinska Symposium on Research methods in
Reproductive Endocrinology", p.207.

