

N° d'ordre : 1238

50376
1984
237

50376.
1984.
237.

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE 3ème CYCLE

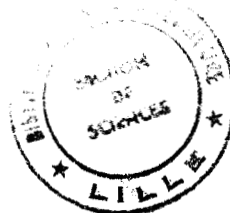
BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES

Spécialité :

MICROBIOLOGIE

par

Christian MROZ



LE PLEIOMORPHISME DE RHIZOBIUM A L'ETAT LIBRE : CONDITIONS D'EXPRESSION ET PHYSIOLOGIE

Présentée le 19 Décembre 1984 devant la Commission d'Examen

Président
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

M. J.B.
M. B.
M. C.
M. J.C.
M. J.C.

GUILLAUME
COURTOIS
BONNIER
DERIEUX
WISSOCQ

REMERCIEMENTS

- o o o -

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Lille I, sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur GUILLAUME. Je tiens, aujourd'hui, à lui exprimer ma gratitude pour son accueil et ses conseils judicieux.

Monsieur le Professeur DERIEUX a bien voulu m'intégrer dans l'équipe de Microbiologie I et plus particulièrement sous la direction efficace de Monsieur COURTOIS. Je les remercie aussi d'avoir consenti à juger ce travail.

Je suis reconnaissant à Messieurs les Professeurs BONNIER et WISSOCQ d'avoir très aimablement accepté de siéger dans ce Jury.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble du Laboratoire pour l'aide précieuse que chacun m'a apporté. En particulier, Monsieur DEFIVES pour sa participation aux travaux de Microscopie électronique ; Takis T. et Marie-José N. pour leur concours actif.

Merci à Mademoiselle DELECOURT pour sa gentillesse lors de la dactylographie de ce Mémoire.

Je dédie cet ouvrage à
THERESE et à toute ma famille.

TABLE DES MATIERES

- o o o -

PAGES

GLOSSAIRE

INTRODUCTION 1

I. - HISTORIQUE

1. - LES ENVELOPPES BACTÉRIENNES 3

1.1 - LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE 4

1.1.1 - Mise en évidence 4

1.1.2 - Structure, composition 4

1.1.3 - Fonctions 5

1.1.4 - Protoplastes et sphéroplastes 6

1.1.5 - Les Formes L et les *Mycoplasmataceae* 7

1.2 - LA PAROI 7

1.2.1 - Généralités 7

1.2.2 - Les peptidoglycannes 9

1.2.3 - Les acides (uro) teichoïques 11

1.2.3.1 - Composition des acides teichoïques ... 11

1.2.3.2 - Composition des acides uroteichoïques. 12

1.2.3.3 - Rôle des acides (uro) teichoïques 13

1.2.4 - Les lipopolysaccharides	14
1.2.5 - Les autres constituants pariétaux	16
1.3 - LES STRUCTURES EXOCELLULAIRES	17
2. - EFFETS DE L'ENVIRONNEMENT SUR LES ENVELOPPES BACTÉRIENNES	18
2.1 - ORIGINES DES MORPHOLOGIES BACTERIENNES ANORMALES	18
2.2 - NECESSITE DU CONTROLE DE L'ENVIRONNEMENT	20
2.3 - MODIFICATIONS AU NIVEAU DES ACIDES TEICHOÏQUES	21
2.3.1 - Effets d'éléments limitants de la croissance ...	21
2.3.2 - Effets du pH	21
2.3.2 - Effets de l'état physiologique des bactéries ...	22
2.4 - MODIFICATIONS DES PEPTIDOGLYCANNES	22
2.4.1 - Effets de facteurs limitants de la croissance ..	22
2.4.2 - Effets des agents antibactériens	23
2.5 - MODIFICATIONS DES LIPOPOLYSACCHARIDES	24
2.6 - INFLUENCES SUR LES COMPOSES LIPIDIQUES	25
2.7 - MODIFICATIONS DES STRUCTURES EXOCELLULAIRES	25
2.8 - EFFETS DES CONTRAINTES SPATIALES	26
2.9 - CONCLUSIONS	26

II. - MATERIEL ET METHODES

1. - SOUCHES ET NOMENCLATURE	43
2. - MILIEUX DE CULTURE ET TAMPONS	43
2.1 - MILIEU D'ISWARAN	43
2.2 - MILIEU RC MODIFIE PAR DELATTRE	44
2.3 - MILIEU N	44
2.4 - MILIEU RHB ₁	44
2.5 - MILIEU DE O'GARA ET DE SHANMUGAN	45
2.6 - TAMPON DE NON PROLIFERATION	45
3. - TECHNIQUE DE LA RÉDUCTION DE L'ACÉTYLÈNE	46
3.1 - PRINCIPE	46
3.2 - CONDITIONS EXPERIMENTALES	46
3.3 - ANALYSE EN CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE	47
4. - TECHNIQUE DE PERMÉATION	47
4.1 - PREPARATION DES CELLULES	47
4.2 - CONSTITUTION DU MILIEU REACTIONNEL	48
4.3 - MODE OPERATOIRE	48

5. - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE	49
5.1 - COLORATION NEGATIVE DE BACTERIES NON FIXEES	49
5.2 - COLORATION TOTALE APRES FIXATION DES CELLULES	49
5.3 - COUPES ULTRAFINES	50
6. - IDENTIFICATION DE L'ACIDE 2 CÉTO-GLUCONIQUE	51

III. - RESULTATS

1. - EXPRESSION DU PLÉIOMORPHISME CHEZ LES SOUCHES SAUVAGES SUR MILIEU GÉLOSÉ	52
1.1 - RECHERCHE D'UN MILIEU INDUCTEUR	52
1.1.1 - Résumé des travaux antérieurs	52
1.1.2 - Mise en évidence du pléiomorphisme sur le milieu N gélosé	53
1.1.2.1 - <i>Comportement de la souche M5N1</i>	53
1.1.2.2 - <i>Comportement des souches à croissance rapide de Rhizobium et des souches d'Agrobacterium</i>	53
1.1.3 - Conclusions	56
1.2 - EFFET DU PLEIOMORPHISME SUR LA VIABILITE DES CELLULES ..	57

1.3 - RECHERCHE DES ELEMENTS PROVOQUANT L'APPARITION DU PLEIOMORPHISME	59
1.3.1 - Influence de la nature du milieu de culture	59
1.3.1.1 - <i>Dispositifs</i>	59
1.3.1.2 - <i>Résultats</i>	60
1.3.2 - Influence du gluconate	61
1.3.3 - Effets de la source azotée	61
1.3.3.1 - <i>Constitution des milieux</i>	61
1.3.3.2 - <i>Résultats</i>	62
1.4 - DISCUSSION	64
2. - EXPRESSION DU PLÉIOMORPHISME EN MILIEU LIQUIDE	67
2.1 - INFLUENCE DU MAGNESIUM	67
2.1.1 - Mise en évidence de l'importance du magnésium ..	67
2.1.2 - Etude chez les souches M5N1, Ar16, 2004 et F1 ..	70
2.1.2.1 - <i>Protocoles expérimentaux</i>	70
2.1.2.2 - <i>Résultats</i>	70
2.1.2.3 - <i>Discussion</i>	73
2.1.3 - Généralisation de l'étude à l'espèce <i>R. meliloti</i> et au genre <i>Agrobacterium</i>	74
2.1.3.1 - <i>Milieux à base d'extrait de levures</i> ..	74
2.1.3.2 - <i>Milieux à base de nitrate d'ammonium</i> .	77
2.1.3.3 - <i>Résultats</i>	78
2.1.4 - Discussion	80

2.2 - ETUDE DE LA CROISSANCE EN MILIEU MINIMUM, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE SULFATE DE MAGNESIUM	83
2.2.1 - Etude de la souche M5N1	83
2.2.1.1 - <i>Pléiomorphisme et viabilité</i>	83
2.2.1.2 - <i>Croissance</i>	85
2.2.1.3 - <i>pH</i>	87
2.2.1.4 - <i>Discussion</i>	88
2.2.2 - Etude des souches M1-5 et B6	89
2.2.2.1 - <i>Viabilité des cellules</i>	89
2.2.2.2 - <i>Croissance</i>	90
2.2.2.3 - <i>pH</i>	93
2.2.2.4 - <i>Conclusion</i>	94
2.3 - ETUDE DE LA CROISSANCE EN MILIEU COMPLET, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE SULFATE DE MAGNESIUM	95
2.3.1 - <i>Viabilité</i>	95
2.3.2 - <i>pH</i>	95
2.3.3 - <i>Conclusion</i>	97
2.4 - EFFET DE LA COMPOSITION IONIQUE DU MILIEU	97
2.4.1 - Influence des ions Ca^{2+}	97
2.4.1.1 - <i>Milieux liquides</i>	97
2.4.1.2 - <i>Milieux gélifiés</i>	99
2.4.1.3 - <i>Discussion</i>	99
2.4.2 - Influence des sels de magnésium employés à concentrations élevées	99
2.4.3 - Effets de divers sels utilisés en concentrations fortes	101
2.4.4 - <i>Conclusion</i>	101

3. - ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES PLÉIOMORPHIQUES ...	102
3.1 - MISE EN EVIDENCE DE LA FRAGILISATION DES ENVELOPPES	102
3.1.1 - Résistance aux températures élevées	102
3.1.1.1 - <i>Mode opératoire</i>	102
3.1.1.2 - <i>Résultats</i>	102
3.1.1.3 - <i>Discussion</i>	104
3.1.2 - Conservation à + 4°C	104
3.1.3 - Action du lysozyme	105
3.1.3.1 - <i>Principe</i>	105
3.1.3.2 - <i>Mode opératoire</i>	106
3.1.3.3 - <i>Résultats</i>	106
3.1.4 - Conclusion	108
3.2 - ETUDE ULTRASTRUCTURALE	108
3.2.1 - Colorations négatives	108
3.2.2 - Coupes ultrafines	109
3.2.3 - Discussion	110
3.3 - ETUDE DE LA PERMEATION DE SUBSTRATS CARBONES CHEZ LES CELLULES DEFICIENTES EN MAGNESIUM	110
3.3.1 - Effet de la source d'azote	110
3.3.2 - Incorporation du glucose et du fructose	112
3.3.3 - Spécificité de la glucose perméase pour divers hydrates de carbone	113
3.3.4 - Discussion	115
3.4 - ESSAI DE REDUCTION DE L'ACETYLENE	116

IV. - CONCLUSION GENERALE 119

V. - BIBLIOGRAPHIE I à XXIII

G L O S S A I R E

- o 0 o -

- CV : viabilité cellulaire calculée après estimation du nombre de cellules viables par ml de suspension bactérienne dont la densité optique est égale à 1,00.
- P% : pourcentage de pléiomorphisme moyen d'une population bactérienne déterminé au microscope optique.
- Cowpea group : groupe d'inoculation croisée de souches du genre *Rhizobium* qui nodulent les légumineuses tropicales.
- Milieu complet : milieu de culture empirique utilisant de l'extrait de levures ou des tryptones.
- Milieu minimal : milieu synthétique minéral.
- YE : extrait de levures.
- Mg²⁺ : ion magnésium.
- Ca²⁺ : ion calcium.
- P : phosphore.
- Å : Angström (10^{-10} m).
- M : Mole.
- MEq : milliéquivalent.
- μCi : microcurie.
- cpm : coup par minute.
- LPS : lipopolysaccharides.
- EPS : exopolysaccharides solubles.
- DNA : acide désoxyribonucléique.
- RNA : acide ribonucléique.
- Cn : nombre d'atome de carbones dans une molécule.

SDS	: sodium dodécyl sulfate.
EDTA	: éthylène diamino tétraacétate.
P.P.L.O.	: type de bactérie ressemblant aux <i>Pleuropneumoniae</i> (<i>Pleuro-pneumonia</i> Like Organisms).
MurNAc	: acide N acétyl muramique.
GlcNAc	: N acétyl glucosamine.
DAP	: acide 2,6-diaminopimélique.
Ala	: alanine.
Glu	: acide glutamique.
Lys	: lysine.
LAA	: acide aminé de la série L.
DAA	: acide aminé de la série D.
Glc	: glucose.
AG	: acide gras.
GlcN	: glucosamine.
KDO	: acide 2 céto, 3-désoxyoctonique.
EtN	: éthanolamine.
Gal	: galactose.
Rha	: rhamnose.
Man	: mannitol.
Abe	: abequose.
μ	: taux de croissance.
D	: taux de dilution.
PHB	: acide poly- β -hydroxybutyrique.
Hg	: mercure.
SLS	: sodium lauryl sulfate.
nod ⁻	: souche de <i>Rhizobium</i> qui n'a plus l'aptitude de noduler.
pRme 41b	: plasmide géant de la souche 41 de <i>R. meliloti</i> .

Sym : nom donné au plasmide symbiotique de *Rhizobium*.
E.D. : eau distillée.
TNP : tampon de non prolifération.
D.O. : densité optique.
NTG : N-Méthyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine.

I N T R O D U C T I O N

Le Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I oriente ses recherches vers l'étude du genre *Rhizobium*.

Ce genre bactérien a un intérêt agronomique indéniable. En effet, *Rhizobium* a la particularité d'entrer en symbiose avec la famille des Légumineuses. Les nodosités radiculaires, témoignant de l'infection par *Rhizobium*, sont le siège de la fixation de l'azote atmosphérique. Les cellules bactériennes y transforment, grâce à la nitrogénase, l'azote gazeux (N_2) en azote minéral (NH_4^+) directement assimilable par les cellules végétales hôtes.

Ces cellules bactériennes fixant l'azote sont appelées bactéroïdes et ressemblent peu aux cellules en culture. Leur morphologie est très variable, allant des formes branchées jusqu'à la forme sphérique des protoplastes.

Cette partie du cycle de *Rhizobium* est la plus intéressante mais la plus difficile à étudier. Il est effectivement très ardu de recréer *in vitro* l'environnement de la cellule végétale. De ce fait, le processus de différenciation de la bactérie en bactéroïde et la mise en place du système nitrogénasique sont encore mal compris.

Par contre, dans la littérature, on cite régulièrement l'obtention de cellules polymorphiques de *Rhizobium* ou "pseudobactéroïdes" soit :

- dans des cultures vieillissantes,
- après action d'inhibiteurs de la synthèse pariétale,
- après modification du milieu de croissance.

Ces formes ont de fortes analogies avec le bactéroïde intranodulaire et sont même parfois capables de fixer l'azote asymbiotiquement.

C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressé aux cellules atypiques de *Rhizobium* obtenues en culture. Leur étude peut constituer une approche plus facile de l'état bactéroïde car on s'affranchit de la cellule végétale.

Nous nous sommes attaché à comprendre le signal déclenchant le pléiomorphisme et la signification physiologique de celui-ci.

Mais pour cela, il était nécessaire de procéder à une mise au point bibliographique concernant :

- les enveloppes bactériennes et leur complexité structurale,
- les effets de l'environnement sur celles-ci,
- les enveloppes de *Rhizobium* et leur variabilité.

H I S T O R I Q U E

1. - LES ENVELOPPES BACTÉRIENNES

Les bactéries sont des organismes unicellulaires où le matériel chromosomique est diffus dans le cytoplasme. Il est, de part l'absence d'enveloppes nucléaires, associé aux RNA messagers, aux peptides en cours de synthèse et aux ribosomes.

Le cytoplasme est limité par la membrane cytoplasmique, elle-même recouverte par une paroi plus ou moins complexe.

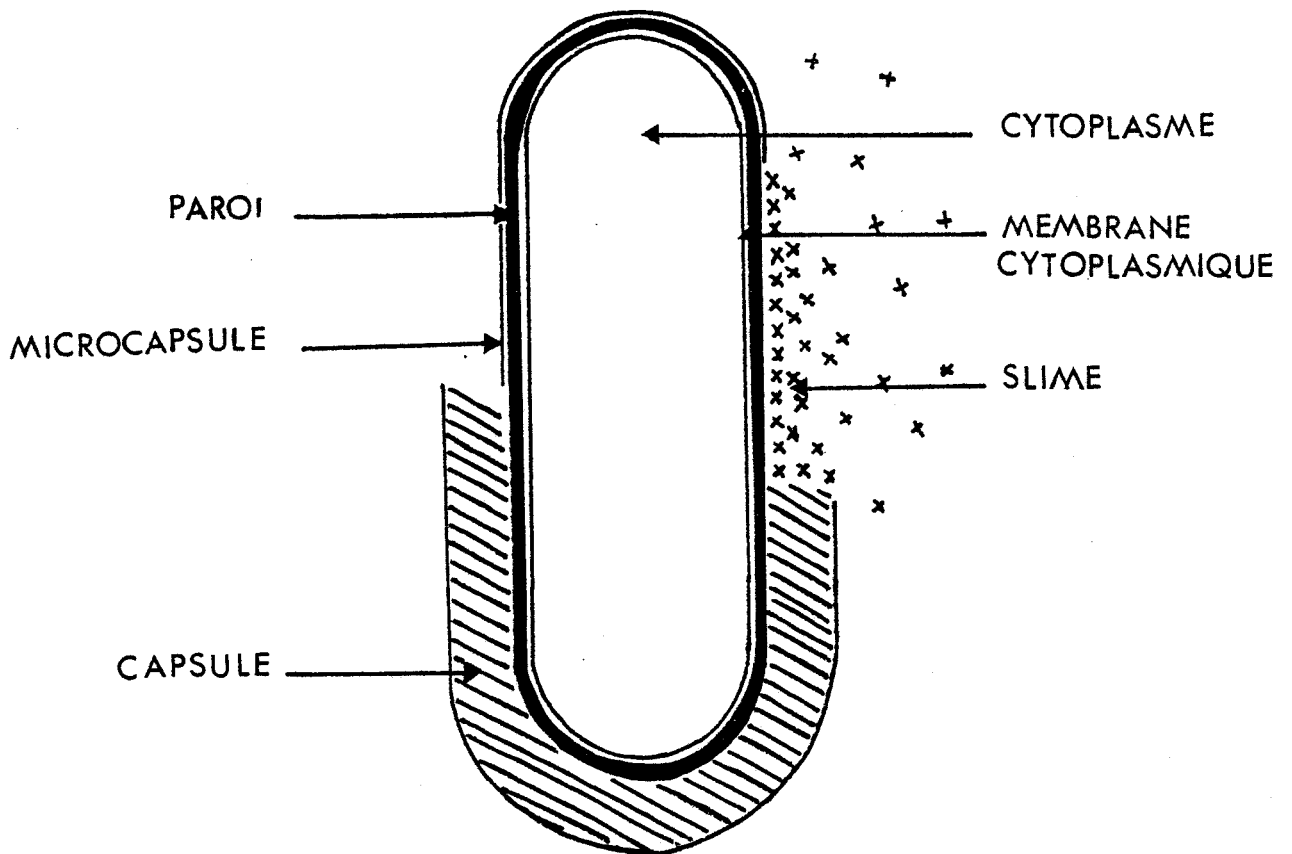


FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE BACTERIE ET DE SES ENVELOPPES. D'après SALTON (155).

Les bactéries peuvent sécréter du polysaccharide : ces macromolécules se solubilisent dans le milieu sous forme de "slime", ou se lient étroitement à la paroi constituant ainsi la (micro) capsule.

Certaines espèces bactériennes sont pourvues d'une ciliature.

1.1 - LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE

Synonymes : membrane plasmique membrane protoplastique, plasmalemma.

1.1.1 - Mise en évidence

FISCHER, en 1891, rend compte pour la première fois de l'existence d'une membrane autour du cytoplasme bactérien, visible lors des plasmolyses. Seuls les progrès en microscopie électronique de coupes fines permettront une approche plus détaillée.

En général, les bactéries à Gram négatif sont plus facilement plasmolysables (125). L'étude des cellules d'*Escherichia coli* plasmolisées (11) montrent que la membrane cytoplasmique est reliée à la face interne de la paroi en des points spécifiques.

Habituellement, la membrane plasmique est en étroite connexion avec la paroi dont elle participe à la biosynthèse (152). Les parois des bactéries à Gram négatif, obtenues après action mécanique, sont d'ailleurs souvent associées à des morceaux de membrane.

1.1.2 - Structure, composition

En coupes fines, la membrane cytoplasmique paraît avoir la structure trilamellaire, caractéristique aux membranes vivantes (104). Le profil de la coupe dépend de la phase de croissance et peut être symétrique ou assymétrique.

L'évaluation de l'épaisseur de la membrane varie suivant la technique d'investigation. Par exemple, elle est estimée entre 65 et 70 Å chez *Bacillus licheniformis* (Gram positif) en microscopie électronique de coupes fines (80, 18). Mais cette valeur augmente jusqu'à 105 Å par mesure de diffraction des rayons X (146).

La membrane cytoplasmique bactérienne est presque entièrement constituée de protéines et de lipides. Le rapport avec ces deux types de molécules varie quelque peu suivant la souche et l'état physiologique. La composition de la membrane plasmique de *Staphylococcus aureus* H (Gram positif) en phase exponentielle de croissance (190) est de :

- 62 à 71 % de protéines
- 22 à 25 % de lipides dont
 - 18 % de lipides neutres
 - 10 % de glycolipides
 - 68 % de phospholipides tels que le phosphatidylglycérol ou le diphosphatidylglycérol

Les principaux acides gras sont en C₁₅.

Les préparations membranaires peuvent être contaminées par des vésicules mésosomales et des ribosomes.

Une grande partie de la membrane cytoplasmique est solubilisée par les détergents anioniques (Sodium Dodecyl Sulfate ou SDS) ou non ioniques (Nonidet 40). Les détergents cationiques sont sans effet (157).

1.1.3 - Fonctions

La membrane plasmique permet de conserver l'intégrité du cytoplasme. Elle permet aussi de contrôler le milieu intracellulaire par la diffusion et le transport des solutés d'un côté de la membrane vers l'autre.

Les bactéries n'ont pas d'organites, mais leurs fonctions principales sont remplies par la membrane cytoplasmique. C'est ainsi qu'elle se substitue parfaitement à la membrane interne des mitochondries.

La membrane et l'espace périplasmique sont donc les sièges d'un nombre important d'enzymes : enzymes respiratoires, transporteurs d'électrons, enzymes de phosphorylations oxydatives (ATPase, phosphatase, ...) (105), enzymes responsables de la biosynthèse de la paroi (152), perméases (95) et d'autres protéines non enzymatiques telles que les "Binding Proteins", intervenant dans le transport des substrats carbonés (1, 2, 16, 170).

1.1.4 - Protoplastes et sphéroplastes

Lorsque l'on traite les bactéries à Gram positif par le lysozyme en milieu hypertonique, on obtient des protoplastes. Dans ce cas, le cytoplasme est seulement entouré par la membrane cytoplasmique (73, 191). Celle-ci montre une forte extensibilité car les protoplastes peuvent accroître leur volume et prendre l'allure de sphères lors des déplasmolyses progressives.

La membrane cytoplasmique agit comme une membrane de dialyse où la taille des pores grandit avec le gonflement des protoplastes, atteint un seuil critique et cause la déchirure de la membrane (32).

Les protoplastes ne peuvent ni réverser vers la forme normale, ni se diviser (118).

Par action de la pénicilline ou du lysozyme il est possible d'obtenir, avec les bactéries à Gram négatif, des cellules sphériques sensibles aux chocs osmotiques (118). Celles-ci possèdent encore sur la membrane cytoplasmique des résidus de paroi dépourvus de muréine (156) : on parle alors de sphéroplastes.

Grâce aux fragments pariétaux, ces cellules peuvent retrouver leur forme habituelle et se diviser.

Les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes au lysozyme et doivent être pré-traitées par :

- chauffage des cellules,
- congélations et décongélations successives,
- l'E.D.T.A.

1.1.5 - Les Formes L et les *Mycoplasmataceae*

Certaines cellules bactériennes ont spontanément pour seule enveloppe la membrane cytoplasmique.

KLIENEBERGER (97), en séparant successivement les formes protoplastiques apparaissant dans les colonies bacillaires de *Streptobacillus moniliformis*, a su réaliser la culture pure de ces formes totalement dépourvues de paroi. Elles furent appelées Formes L en hommage à l'Institut LISTER.

Contrairement aux protoplastes, ces cellules peuvent se diviser et, contrairement aux sphéroplastes, n'ont pas besoin pour cela de retourner vers la forme bacillaire.

Ces Formes L apparaissent spontanément en milieu gélosé mais leur production est stimulée par la présence de pénicilline (49) et de certains acides aminés comme la glycine, la méthionine et la phénylalanine (45 , 122). Des solutions salines très concentrées furent aussi utilisées. Un certain nombre de passages sur milieu inducteur gélosé est nécessaire pour que les "L Forms" deviennent stables.

Des Formes L ont pu être ainsi obtenues avec diverses espèces bactériennes telles que *Salmonella typhimurium* ou *Proteus vulgaris*.

D'autres microorganismes sont naturellement dépourvus de paroi. Les cellules sont alors très pléiomorphiques. Ils sont regroupés dans la famille des *Mycoplasmataceae*, encore appelées P.P.L.O. (*Pleuropneumonia Like Organisms*).

1.2 - LA PAROI

1.2.1 - Généralités

La paroi des bactéries à Gram positif sont principalement constituées d'un polymère insoluble : le peptidoglycane. Ce polymère, qui dans certains cas, peut compter pour plus de 90 % du poids sec de la paroi

de ces bactéries, est associé à plusieurs autres macromolécules : quelques protéines et lipides mais surtout des polysaccharides et des acides teichoïques (8). L'épaisseur de la paroi est généralement comprise entre 150 et 500 Å (156, 70) mais elle peut atteindre 800 Å chez *Lactobacillus acidophilus*.

Les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus complexe, contenant moins de muréine (5 à 20 % du poids sec de la paroi) mais de grandes quantités de protéines, de lipides et de lipopolysaccharides (156, 152). GLAUERT et THORNLEY (70) décrivent la paroi des bactéries à Gram négatif comme étant :

- une couche externe trilamellaire de 60 à 100 Å d'épaisseur,
- une couche mince (20 à 80 Å) mais très dense, séparant cette couche externe de la membrane trilamellaire plasmique.

Les procédés d'extraction des divers constituants pariétaux ont été mis au point, permettant leurs analyses quantitatives, qualitatives et structurales, ainsi que la détermination de leurs rôles. Une technique souvent employée chez les bactéries à Gram négatif est l'extraction à l'eau phénolée, mise au point par WESTPHAL et coll. (193). Ainsi, CLARKE et coll. (29, 30, 31) ont pu analyser la composition de la paroi de *Pseudomonas aeruginosa*. Les fragments pariétaux soumis à l'action du phénol aqueux (45 % poids/volume) à 65-68°C se séparent de la manière suivante :

- les lipopolysaccharides (31 % du poids sec de la paroi) sont dans la phase aqueuse,
- les protéines (36 %) et les lipides (17 %) se trouvent dans la phase phénolée,
- il reste un résidu insoluble, essentiellement du peptidoglycane (15 %).

De part leur diversité de structure, de composition et de rôle, les différentes macromolécules présentes dans la paroi seront décrites successivement.

1.2.2 - Les peptidoglycannes

Synonymes : muréine, mucopeptide, glycosaminopeptide.

Ce type de macromolécule a été le plus souvent étudié chez les bactéries à Gram positif, car plus facile à purifier et présent en plus grande quantité.

Après le départ, dans des conditions hydrolytiques douces, des polysaccharides, des protéines et des acides teichoïques, les peptidoglycannes restent les seules structures pariétales. L'épaisseur de la couche muréique est d'environ 100 Å (69).

Il existe une structure commune à tous les peptidoglycannes (67, 69, 136), c'est-à-dire :

- des chaînes glycaniques ;
- des chaînes peptidiques courtes, reliées aux structures précédentes ;
- des ponts d'acides aminés unissant les chaînes peptidiques (fig. 2, p. 10).

1°) Les chaînes glycaniques, qui sont composées en alternance de N-Acétyleglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-Acétylemuramique (MurNAc). Cette chaîne a été très étudiée chez *S. aureus*, souche Copenhague (177, 178). La longueur des chaînes glycaniques varie suivant la souche et des chaînes de longueurs très différentes sont présentes chez le même organisme. La moyenne, chez *S. aureus*, est de 24 hexosamines mais il y a possibilité de trouver des chaînes de 12 à 90 hexosamines (178). Il n'y a pas de relation entre la longueur des chaînes et la morphologie des cellules.

2°) Les chaînes peptidiques courtes, liées au groupement carboxylique de l'acide muramique par une liaison amide. Cette chaîne chez *S. aureus*, ainsi que chez de nombreuses espèces de bactéries à Gram positif, est formée par la séquence L alanine - acide D glutamique - un acide diaminé - D alanine (67). La L alanine se trouve du côté N terminal : c'est donc cet acide aminé qui contractera une liaison avec la chaîne glycanique. L'acide diaminé est très souvent la L lysine ou l'acide 2,6-diaminopimélique (DAP).

Lors de la synthèse de la muréine, les nouvelles unités peptidiques s'assemblent à la molécule géante par la séquence tétrapeptide - D alanine supplémentaire (136).

3°) Les ponts, reliant les chaînes peptidiques adjacentes, après coupure de la D alanine supplémentaire par une transpeptidase membranaire. Ces ponts semblent très spécifiques (163) et sont donc sujets à de grandes variations.

Il existe 4 types principaux de ponts (67). Par exemple, chez *S. aureus*, souche Copenhague, c'est un pont de 5 molécules de glycolle qui relie la D alanine terminale d'une chaîne avec la L lysine de la chaîne voisine. Dans 6 % des cas, le cinquième glycolle est remplacé par de la sérine.

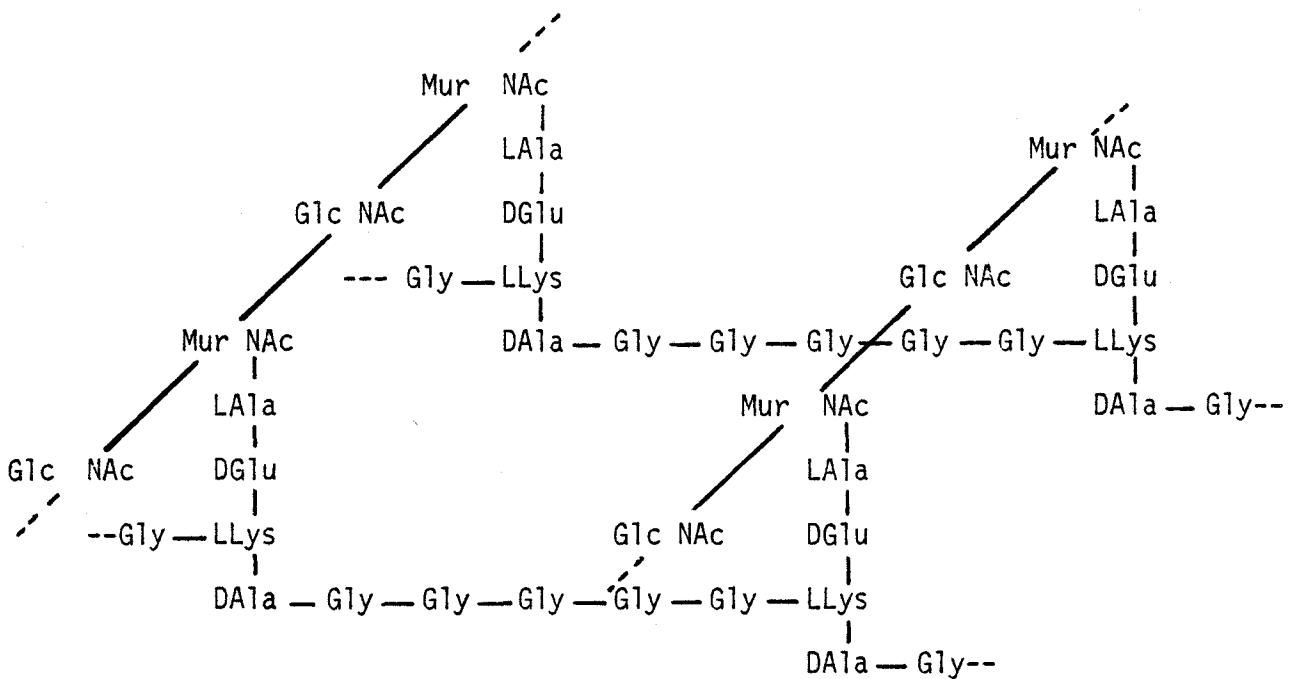


FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PEPTIDOGLYCANNE DE *S. AUREUS*, SELON TIPPER et BERGMAN (179).

Chez les bactéries à Gram négatif, les peptidoglycannes ont une composition à peu près équivalente (75, 31, 103, 189) : c'est-à-dire de l'acide muramique, de la glucosamine, de l'alanine, de l'acide pimélique et de l'acide glutamique dont les rapports molaires sont respectivement 1/1/2/1/1.

Le peptidoglycane, après extraction au phénol aqueux, garde l'aspect de la cellule (8 , 31) et on lui donne le nom de sacculus. La muréine serait donc responsable de la rigidité structurale. Le sacculus peut être digéré par le lysozyme (192, 31) qui est une β 1,4 N Acétyl-hexosaminidase et qui agit donc au niveau de la liaison β 1,4 entre la N Acétylglucosamine et l'acide N Acétyl muramique.

Les polymères muréiques sont mécaniquement très solides et peuvent résister aux hautes pressions générées dans la cellule bactérienne.

La muréine est le support des autres constituants pariétaux et protège la membrane plasmique.

1.2.3 - Les acides (uro)teichoïques

1.2.3.1 - Composition des acides teichoïques

Les acides teichoïques sont présents chez de nombreuses espèces bactériennes à Gram positif (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*) mais seraient apparemment absents chez les bactéries à Gram négatif. Ils peuvent participer pour 20 à 50 % du poids sec de la paroi.

On distingue deux types d'acides teichoïques (78) :

- ceux faisant partie de la paroi (acides teichoïques pariétaux),
- ceux localisés dans l'espace périplasmique et liés à la membrane cytoplasmique (acides teichoïques membranaires).

Les acides teichoïques sont hydrosolubles et on peut les extraire de la paroi ou de la cellule par des acides dilués. L'étude structurale se fait après hydrolyse acide ou après hydrolyse alcaline combinée à la déphosphorylation des produits par une phosphatase.

Dans leur forme la plus simple, les acides teichoïques sont des polymères anioniques de ribitolphosphate (fig. 3) ou de glycérolphosphate (fig. 4), contractant des liaisons glycosidiques avec le glucose ou le galactose (8). Des liaisons esters alcali-labiles s'établissent entre la D alanine et les groupements hydroxyls du squelette polyholosidique. Des ponts phosphodiester sont liés au glycérol en position 1 et 3 ou au ribitol en position 1 et 5.

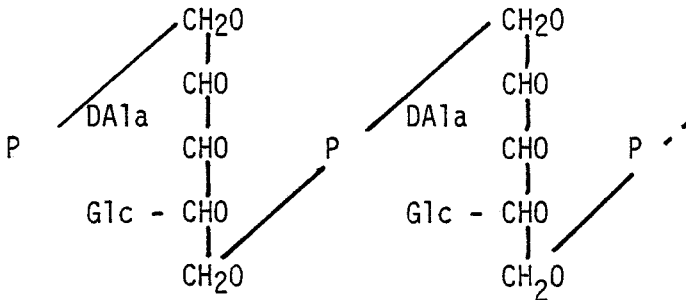


FIGURE 3 : ACIDE RIBITOTEICHOÏQUE

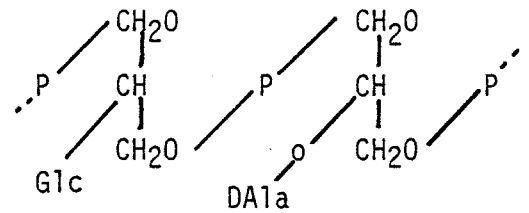


FIGURE 4 : ACIDE GLYCEROTEICHOÏQUE

Les acides teichoïques varient grandement dans leur longueur, leur nature et dans la régularité des sucres substitués (68, 5).

Certaines souches peuvent avoir plusieurs types d'acides teichoïques. Les acides ribitoteichoïques ont (17) entre 5 et 12 unités répétitives ; les acides glycéroteichoïques en ont 30 à 32 lorsqu'ils sont synthétisés *in vitro* et 20 quand ils sont formés dans la paroi cellulaire.

1.2.3.2 - Composition des acides uroteichoïques

Les acides uroteichoïques, comme les acides teichoïques, sont des polymères anioniques. Mais ceux-ci ne contiennent pas de phosphate et doivent leur nature anionique à la présence de sucres acides dans la molécule.

L'acide uroteichoïque de *B. licheniformis* 6346 est composé par de l'acide glucuronique et de la N Acétylgalactosamine. La chaîne est longue de 35 à 40 unités disaccharidiques (84).

1.2.3.3 - Rôle des acides (uro)teichoïques

Les propriétés des acides (uro)teichoïques sont principalement dues à leur nature anionique. De ce fait, la liaison avec les cations, et surtout les cations bivalents, semble être une de leurs principales fonctions (36).

La plus grande quantité d'acides teichoïques est trouvée dans les parois des organismes limités dans leur croissance par l'ion magnésium (53). HEPTINSTALL et coll. (78) ont démontré que la paroi de *S. aureus* fixe un plus grand nombre d'ions magnésium par molécule de phosphate lorsqu'il y a du chlorure de sodium (7,5 %) dans le milieu de culture. Cette augmentation de la fixation de magnésium est en relation avec une baisse de pourcentage de D alanine fixée aux acides teichoïques pariétaux.

Le maintien d'une forte concentration en ions bivalents au voisinage de la paroi et de la membrane est la première étape de leur assimilation par la bactérie. BADDILEY (8, 9) suggère que cet environnement fortement chargé influence directement le flux des électrolytes.

Les acides teichoïques membranaires, grâce au magnésium fixé, interviennent dans l'intégrité de la membrane et dans l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans la synthèse pariétale et dans la phosphorylation oxydative.

Les acides teichoïques membranaires sont toujours du type glycérolphosphate. Ils ont une structure similaire aux acides glycéroteichoïques pariétaux. Lorsque les cellules sont déficientes en phosphate, ce type d'acide teichoïque conserve sa nature glycérolphosphate (54) alors que les acides teichoïques pariétaux se transforment en acide uroteichoïque. On peut en conclure que si les acides teichoïques de la paroi peuvent être remplacés dans leur fonction par d'autres polymères anioniques, la présence dans la cellule d'acides teichoïques liés à la membrane est essentielle à son fonctionnement. Ces deux types d'acides teichoïques auraient donc des systèmes de contrôle de biosynthèse différents.

Les acides teichoïques, combinés au peptidoglycane, seraient impliqués dans l'adsorption des phages (121). Des mutants de *B. subtilis* 168, résistants à un type de phage, diffèrent de la souche sauvage par l'absence de glucose dans les acides teichoïques pariétaux (199).

1.2.4 - Les lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) sont seulement présents dans les régions externes des enveloppes cellulaires des bactéries à Gram négatif. Ils sont équivalents aux acides (uro)teichoïques des bactéries à Gram positif. Ce sont des polymères anioniques qui contiennent des sucres phosphorylés.

Les LPS des enveloppes cellulaires de *Salmonella* spp. ont été étudiés par WESTPHALL, LUDERITZ et leurs collaborateurs. Ils sont formés par 3 régions (fig. 5) :

1°) Le core, formé par 5 sucres, présents chez tous les LPS, de l'éthanolamine (EtN) et du phosphate. Cette région est commune à toutes les Salmonelles.

2°) La chaîne d'antigénicité spécifique O, responsable, comme son nom l'indique, de la spécificité sérologique. Elle est de nature polysaccharidique.

3°) Le lipide A, constitué par de la glucosamine substituée par des acides gras (AG) et des molécules de phosphates.

L'étude de la structure des lipopolysaccharides de *Salmonella* spp. a été réalisée grâce à l'obtention de mutants R, déficients dans l'aptitude à synthétiser ou à attacher la chaîne antigénique au core (47, 111).

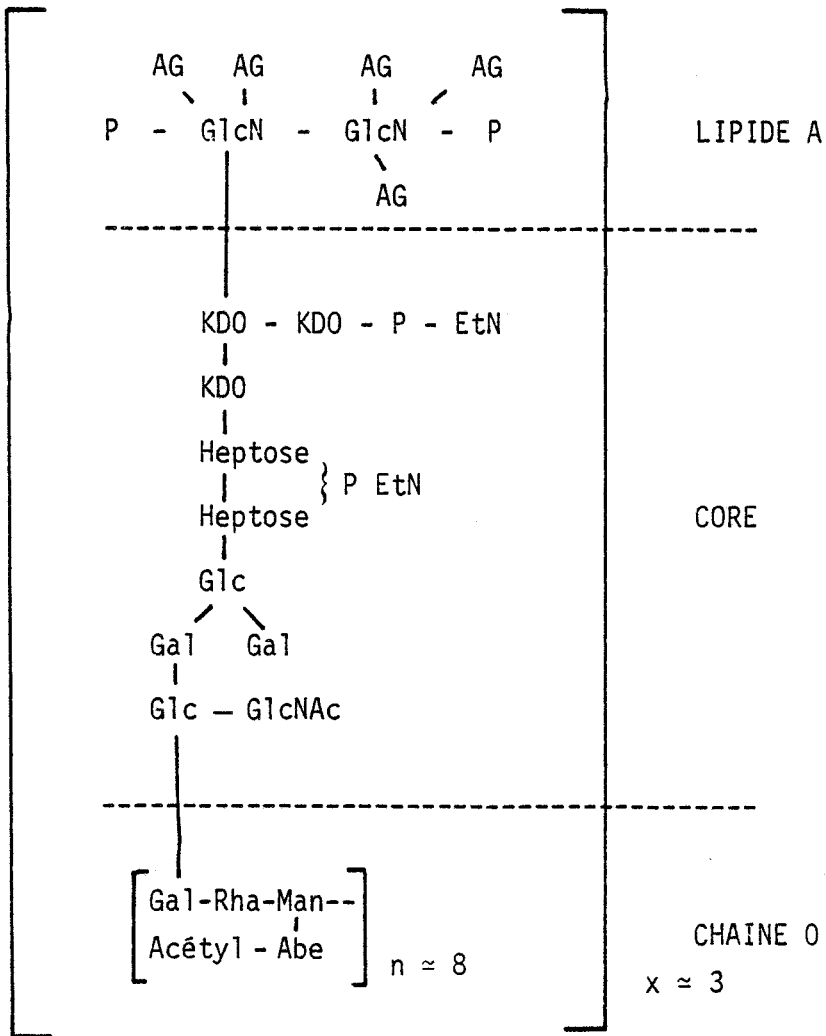


FIGURE 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DES LPS DE *S. TYPHIMURIUM* d'après LUDERITZ (111), GMEINER et coll. (72), DRÖGE et coll. (47) et ROMEO et coll. (153).

Deux composants chimiques sont caractéristiques du core et n'apparaissent nulle part ailleurs dans la paroi bactérienne. Ce sont l'acide 2-ceto-3-déoxyoctonique (52) et les heptoses (112). En conséquence, il est possible de déterminer la quantité de LPS des parois bactériennes en dosant un de ces constituants.

Les lipopolysaccharides, lors de l'extraction au phénol aqueux, se retrouvent dans la phase aqueuse (193, 29, 31).

La partie la plus variable de cette macromolécule est la chaîne O, différente pour chaque espèce bactérienne et même pour chaque souche de la même espèce. Elle est à l'origine du typage sérologique.

L'hydrolyse par les acides faibles rompt les liaisons entre la partie polysaccharidique et le lipide A. Ce dernier, libéré, se comporte comme un précipité insoluble dans l'eau.

Les lipides A de nombreuses espèces à Gram positif se ressemblent. Ils sont essentiellement formés de deux N Acétyl glucosamine, estérifiées par du phosphate, des acides gras et une petite quantité d'éthanolamine. L'acide β -OH myristique constitue plus de 50 % des acides gras. Les acides palmitique et laurique sont eux aussi fréquents.

Les LPS contiennent des régions hydrophiles et hydrophobes et constituent des structures micellaires.

De part leur structure anionique, on peut supposer que les lipopolysaccharides jouent un rôle comparable à celui des acides (uro)teichoïques.

En plus du rôle antigénique, les LPS, tout comme les acides teichoïques, interviendraient avec les peptidoglycannes dans l'adsorption des phages.

1.2.5 - Les autres constituants pariétaux

On trouve, dans la paroi, des protéines et des lipides. Ces molécules sont d'ailleurs souvent associés en lipoprotéines, attachées par des liaisons covalentes au peptidoglycanne.

Les bactéries à Gram positif ont peu de lipides (moins de 5 % du poids sec de la paroi).

Après extraction au phénol aqueux, l'étude de la phase phénolée montre que les parois de *P. aeruginosa* (Gram négatif) (30) sont constituées de :

- 17 % de lipides représentés par des acides gras (acide palmitique) et des phospholipides,
- 36 % de protéines riches en acides aspartique et glutamique.

1.3 - LES STRUCTURES EXOCELLULAIRES

Des substances polysaccharidiques sont très souvent excrétées par les bactéries. Celles-ci peuvent recouvrir la paroi, réalisant ainsi une gangue. Lorsque cette dernière a des contours francs et bien délimités, DUGUID (50) lui donne le nom de capsule. Dans d'autres cas, ces polysaccharides ont peu d'affinité avec la paroi et se solubilisent dans le milieu sous forme de matériel amorphe : on parle alors de "slime".

Du fait de leur forte hydratation (99 %), les polysaccharides exocellulaires sont difficilement observables en microscopie électronique. En effet, leur structure subit de grandes déformations pendant les déshydratations nécessaires à ce type d'observation. Les polysaccharides sont peu opaques aux électrons. On distingue des formes linéaires et ramifiées.

Il est vraisemblable que la capsule soit associée aux acides teichoïques chez les bactéries à Gram positif, ou aux LPS, chez les microorganismes à Gram négatif (132).

Les exopolysaccharides sont souvent constitués d'hexoses neutres tels que le D-glucose, le D-galactose, le D-mannose, le L-fucose et le L-rhamnose. Les hydrates de carbone en C₅, C₇ ou C₈ entrent rarement dans leur composition (172). On trouve également des groupements acétate, formiate (171), succinate (77) et pyruvate (169).

Les polysaccharides exocellulaires ne sont pas essentiels à la vie de la bactérie et leur production dépend des conditions de culture (34). WOLD (196) leur donne un rôle biologique plutôt passif.

La capsule constituerait la première barrière bactérienne, permettant un préfiltrage des molécules avant la paroi et la membrane cytoplasmique. Elle jouerait aussi un rôle protecteur face à la phagocytose et à la dessiccation. Les polysaccharides permettraient enfin aux bactéries de se fixer sur un support, inerte ou biologique, pour une croissance meilleure.

2. - EFFETS DE L'ENVIRONNEMENT SUR LES ENVELOPPES BACTÉRIENNES

Le facteur de base déterminant la structure pariétale d'une bactérie est son génôme. Suivant son pool enzymatique et le milieu extérieur, la bactérie synthétisera les différentes enveloppes qui lui sont propres. De même, face à des contraintes externes, la bactérie réagira selon ses capacités intrinsèques et orientera son métabolisme pariétal vers une voie bien définie.

De part la diversité des bactéries, chaque souche serait un cas d'étude en elle-même. C'est pour cela que nous avons voulu savoir s'il existait des règles générales au monde bactérien et quelles sont le plus souvent les stratégies adoptées par les bactéries face à des contraintes exercées au niveau de leurs enveloppes.

2.1 - ORIGINES DES MORPHOLOGIES BACTÉRIENNES ANORMALES

DUGUID et WILKINSON (51) résumant ainsi les changements morphologiques des bactéries, dûs aux conditions environnementales. La plupart des modifications morphologiques sont produites par des cultures en croissance ou vieillissantes. Elles seraient le résultat de conditions d'environnement influençant le métabolisme cellulaire. Ceci aurait pour conséquence l'accroissement ou la diminution d'un composé indispensable à la croissance. Ainsi, la synthèse d'un composé particulier, relatif à la paroi, peut être inhibée (par exemple, par la pénicilline) alors que la croissance du protoplasme est toujours réalisée. Inversement, la croissance protoplasmique peut être stoppée alors que des composés pariétaux (par exemple, des substances capsulaires) sont toujours synthétisés.

Donc, l'obtention d'une cellule de forme anormale est très souvent le résultat d'un déséquilibre de la croissance. Une rare exception est l'effet plasmolysant (60) où les changements morphologiques interviennent indépendamment de la croissance.

Les conditions environnementales peuvent aussi provoquer l'apparition de bactéries morphologiquement différentes par la sélection de variants génétiques mieux adaptés au milieu extérieur (38 , 7). Ces mutants sont tout d'abord en petit nombre dans la culture. Ils peuvent être alors isolés et recultivés en absence des conditions sélectives sans pour cela avoir une réversion rapide. Par contre, lorsqu'il y a pressions d'environnement, directement appliquées sur la morphologie cellulaire, la totalité de la population est touchée, et ceci en quelques générations seulement. Dans ce cas, la réversion vers la forme normale s'effectue aussitôt que l'on retire l'agent inducteur.

Il y aurait, toujours d'après DUGUID et WILKINSON (51), quatre causes principales des malformations pariétales :

- une plasmolyse rapide donnant des cellules à forme variable mais laissant apparaître des protubérances protoplasmiques ;
- des défauts au niveau de la division cellulaire ou dans la séparation des cellules filles. Les bactéries sont dans ce cas, soit branchées, soit filamenteuses avec présence ou non de septum ;
- des interférences avec la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (DNA). Lorsque dans le milieu de croissance il manque un élément indispensable à la duplication du DNA, par exemple la thymine, la synthèse de l'acide nucléique est inhibée. Parallèlement, la croissance cytoplasmique continue par accumulation de protéines et la croissance pariétale a toujours lieu (88, 201). On a alors des bactéries filamenteuses ;
- des défauts au niveau de la synthèse pariétale. Les bactéries ne peuvent plus réagir aux pressions d'osmose et de croissance. Elles connaissent un élargissement tridimensionnel et prennent un aspect globulaire. Dans cette classe, on range les protoplastes, les sphéroplastes et les "Formes L".

Les agents inducteurs de ces phénomènes sont des sels inorganiques (chlorure de sodium, chlorure de lithium, ...), les acides, les bases, certains acides aminés (glycocolle, méthionine, phényl-alanine, ...), des agents antibactériens (détergents, antibiotiques, phénol, violet de méthyl, ...), l'absence de certains éléments nutritifs essentiels (thymine, dérivés d'hexosamines, acide 2,6-diaminopimelique, ...).

PARK (142) suggère que tous les agents interférant avec la paroi agissent de manière comparable : en gênant l'activité des enzymes justement responsables de la synthèse pariétale. Celles-ci, se trouvant généralement à la surface de la membrane cytoplasmique, sont particulièrement exposées à l'influence d'inhibiteurs externes.

2.2 - NECESSITE DU CONTROLE DE L'ENVIRONNEMENT

A part quelques exceptions, les études sur les enveloppes bactériennes ont été faites sur des organismes en croissance dans des environnements non contrôlés. Les résultats ainsi obtenus doivent être considérés avec prudence car la composition des polymères pariétaux peut varier fortement (53).

On cultive habituellement les bactéries en "batch culture", constituant un système fermé. Et parce que les microorganismes interfèrent chimiquement avec leur environnement (utilisation d'éléments nutritifs, excrétion de métabolites), le milieu change continuellement avec la croissance. C'est pour cette raison que les résultats sont très variables.

Cette difficulté peut être contournée en travaillant avec des bactéries en croissance dans un système ouvert où l'environnement et les propriétés physiologiques de la bactérie ne fluctuent pas. Un de ces types de culture en continu est le chemostat. C'est un appareil qui se régule biologiquement. Un élément nutritif est utilisé à concentration limite ; après avoir fixé un taux de dilution (D), on laisse le système évoluer. Le taux de croissance (μ) va s'ajuster à D quand le nutriment va manquer. On obtient ainsi des bactéries qui sont toujours dans le même état physiologique, avec un taux de croissance et un environnement constants. Grâce à ce système, il est possible d'étudier la composition de la paroi en fonction du taux de croissance et du facteur nutritif limitant (57). En outre, l'adaptation sur le chemostat d'un système automatique de régulation de pH est réalisable. On pourra alors contrôler au fur et à mesure le pH d'une culture mais aussi le faire varier à volonté sans pour cela affecter d'autres paramètres tel que le taux de croissance.

2.3 - MODIFICATIONS AU NIVEAU DES ACIDES TEICHOÏQUES

2.3.1 - Effets d'éléments limitants de la croissance

ELLWOOD et TEMPEST (55, 57), utilisant des cultures en chemostat de *B. subtilis*, variété *niger*, étudièrent les effets de différents éléments nutritifs utilisés en concentration limitante sur le contenu en acide teichoïque. Lorsque les cellules sont en culture dans un milieu où les ions magnésium, potassium, sulfate ou encore ammonium sont en concentration limitante, le principal acide teichoïque présent est du type polyglucosylglycérolphosphate (65 à 75 % de la fraction acides teichoïques). Ce polymère, associé à une petite quantité de polygalactosylglycérolphosphate (10 %), peut compter jusqu'à 90 % des acides teichoïques extractibles lorsque le facteur limitant est le glucose. Par contre, dans les cultures déficientes en phosphate, ce polymère est totalement remplacé dans les parois par un autre polymère anionique mais non phosphorylé : l'acide uroteichoïque, formé essentiellement de N acétyl galactosamine et d'acide glucuronique. Par contre, les acides teichoïques membranaires ne sont pas modifiés. Ce phénomène a été étudié chez diverses souches à Gram positif contenant de l'acide teichoïque : *B. subtilis* W23 ou 168, *B. megaterium*, *M. lysodeikticus*, *S. aureus* H (56). Toutes ces souches répondent de manière analogue. *S. aureus* H, en culture dans un milieu déficient en magnésium, contient de l'acide ribitolteichoïque où le rapport glucosamine/phosphate est voisin de 1 et avec très peu d'alanine branché. Lorsque le phosphate est limitant, il y a synthèse d'un polymère anionique à base de N acétylglucosamine et de N acétylaminoglucuronique.

Ce passage de l'acide teichoïque en acide uroteichoïque est réversible. Il suffit de réintroduire du phosphate dans le milieu de culture.

2.3.2 - Effets du pH

Les cultures de *B. subtilis* W23 (57) dans un milieu où le magnésium est le facteur limitant de la croissance, sont soumises à des variations de pH. Un abaissement progressif du pH (7,5 à 5,5) provoque une

diminution du taux d'acides teichoïques de la paroi et une augmentation en acide uronique. La quantité d'alanines branchés est aussi supérieure.

Les parois d'organismes, limités dans leur croissance par l'ion phosphate, ne contiennent pas d'acide teichoïque mais de l'acide uroteichoïque. Par contre, de telles cultures de *Bacillus* (57), dont le pH passe progressivement de 8 à 5, voient leur taux d'acide uroteichoïque baisser au profit d'acides teichoïques riches en alanine. Inversement, le retour vers un pH légèrement basique provoque la disparition des acides teichoïques en faveur des acides uroteichoïques.

2.3.3 - Effets de l'état physiologique des bactéries

YOUNG (200), CHIN et coll. (26) ont observé des variations quantitatives d'acides teichoïques durant le cycle cellulaire. Ceux-ci sont en concentration plus importante en phase exponentielle de croissance qu'en phase stationnaire.

ELLWOOD (53), cultivant des cellules de *B. subtilis*, variété *niger*, en chémostat, s'aperçut que le taux d'acide teichoïque augmentait avec le taux de croissance. Cet effet n'est pas général car l'inverse est obtenu avec *B. subtilis* W23 et *M. lysodeikticus*.

2.4 - MODIFICATIONS DES PEPTIDOGLYCANNES

2.4.1 - Effets de facteurs limitants de la croissance

Les chaînes peptidiques de la muréine de *S. aureus*, variété Copenhague, sont normalement reliées par des ponts de cinq acides aminés. Dans 94 % des cas ces ponts sont uniquement constitués de glycolle ; dans 6 % des cas, un glycolle est remplacé par de la sérine. Ce pentapeptide relie la D alanine d'une chaîne avec la L lysine de la chaîne voisine (fig. 2, p. 10). Quand cette souche de *Streptococcus* est cultivée

dans un milieu où le rapport glycoColle/alanine est défavorable (161, 162), seul un tiers de la L lysine est substitué avec le pentapeptide. Le reste est soit substitué avec de la L alanine, soit libre. Malgré cette forte baisse du pontage, la morphologie de la cellule reste la même.

Le pontage du peptidoglycane d'*E. coli* est plus important en phase stationnaire qu'en phase exponentielle (164).

Lorsque *S. epidermis* 24 est cultivé dans un milieu déficient en glycoColle, le contenu de cet acide aminé baisse de 40 % alors que la quantité de L alanine augmente.

YOUNG (200), faisant croître *B. subtilis* 168 sur différents milieux en "batch culture", rapporta que la composition du mucopeptide ne variait que très peu.

HUGUES et coll. (85) ont déterminé la composition de la paroi de *B. subtilis* W23 en fin de phase exponentielle et établi les rapports molaires de l'acide muramique, de la glucosamine, de l'acide glutamique, de la D alanine et de l'acide 2,6-diaminopimélique. Or, en chemostat (57), ces valeurs changent fortement en fonction du facteur limitant (magnésium, potassium, glucose, ammonium, sulfate et phosphate), du taux de croissance, du pH et de la température d'incubation.

GARRET (63, 64) a remarqué que la déficience en magnésium chez *B. subtilis* W23 inhibait 30 à 50 % de la synthèse de la muréine, provoquant l'accumulation de précurseurs (uridine diphosphate - acide N acétyl muramique - pentapeptide). Cet auteur suggère que la déficience en ions bivalents interfère avec l'activité des enzymes liés à la membrane et impliqués dans la biosynthèse du peptidoglycane.

2.4.2 - Effets des agents antibactériens

La pénicilline est un analogue du dipeptide D alanine - D alanine et interfère par cela dans le phénomène d'assemblage des chaînes muréiques. En effet, une transpeptidase membranaire coupe entre les 2 D alanines terminant les chaînes peptidiques et permet ainsi la polymérisation des sous-

unités peptidoglycanniques. Ainsi, l'action de la pénicilline sur le *Staphylocoque doré* (142) entraîne l'accumulation de précurseurs pariétaux du type uridinepyrophosphate - acide muramique - peptide.

MacQUILLEN (118) résume divers travaux sur ce sujet en disant que la pénicilline, la bacitracine, la cycloserine et le glycolle :

- inhibent pareillement la synthèse pariétale de *S. aureus* et causent l'accumulation de précurseurs pariétaux,
- induisent la formation de sphéropastes chez *E. coli*,
- n'inhibent pas la synthèse protéique.

Enfin, l'obtention de "Formes L" stables, c'est-à-dire totalement dépourvues de muréine, est rendue possible par l'action de la pénicilline (44 , 109, 98).

2.5 - MODIFICATIONS DES LIPOPOLYSACCHARIDES

ELLWOOD et TEMPEST (57) ont étudié l'influence du milieu de culture sur les LPS de *Aerobacter aerogenes*. Lorsque dans le chemostat, le facteur nutritif limitant est le glycérol, les concentrations de l'acide 2-céto-3 déoxyoctonique et des heptoses (constituants caractéristiques des LPS) augmentent en fonction du taux de croissance. Il en est de même pour les sucres pariétaux. Par contre, lorsque le magnésium est en concentration limitante, ces 2 substances voient leur concentration diminuer en fonction de μ , alors que la concentration en sucres pariétaux augmente encore dans ce cas. La structure du core des LPS semble modifiée par ces conditions de culture car le rapport heptose/acide octonique varie de 6 à 10.

LACEY (107), quant à lui, a montré que les conditions de culture affectaient fortement l'antigénicité des bactéries à Gram négatif. Il y aurait donc modification de la chaîne O lipopolysaccharidique.

2.6 - INFLUENCES SUR LES COMPOSES LIPIDIQUES

De nombreux travaux ont porté sur les effets de la température et d'autres paramètres de croissance sur les lipides totaux d'*E. coli* (119, 99, 166, 100, 76, 135). Ces lipides, membranaires ou pariétaux sont affectés en quantité et en qualité par les variations de température. Plus la température d'incubation est basse, plus il y a d'acides gras insaturés. En chemostat, le taux de lipides augmente quand les facteurs limitants sont les ions phosphates ou ammonium.

Chez les bactéries à Gram positif, de tels effets ont été peu étudiés à cause de la faible teneur en lipide dans les parois (moins de 5 % du poids sec des parois). Par contre, SHOCKMAN et coll. (167), ainsi qu'HIGGINS et SHOCKMAN (79) ont observé des modifications importantes de la membrane cytoplasmique de *S. faecalis* en fonction de la phase de croissance. Celle-ci contenait 28 % de lipide chez les cellules en phase exponentielle de croissance et 40 % en phase stationnaire.

Le taux de phospholipides dépend de la phase de croissance (22, 102, 108), de la composition du milieu de culture et des conditions de croissance (62, 21).

2.7 - MODIFICATIONS DES STRUCTURES EXOCELLULAIRES

La taille de la capsule serait sensible aux modifications des conditions de culture (194). Les variations d'épaisseur seraient dues à des différences dans le nombre de molécules polymérisées et (ou) du réarrangement des chaînes dans les polysaccharides exocellulaires (172).

Les ions pourraient intervenir dans la structure tertiaire de ces polymères (147).

L'adsorption du magnésium par *A. aerogenes* stimule la synthèse des polysaccharides (175).

2.8 - EFFETS DES CONTRAINTES SPATIALES

REYROLLE et LETELLIER (149) ont obtenu des formes anormales de *S. aureus*, d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* en croissance sur des membranes filtrantes de cellulose. Les cellules se développent et se multiplient en fonction de l'espace et de l'aspect des pores de la membrane. Ceci impliquerait que la cellule possède une plasticité pariétale durant la croissance. Le concept de la paroi cellulaire comme étant une structure rigide devrait être revu. Ces auteurs pensent que ces phénomènes peuvent apparaître naturellement dans les sols ou sédiments à faible granulométrie. Ils pourraient en outre s'accompagner de modifications métaboliques.

2.9 - CONCLUSIONS

Il est maintenant clair que les enveloppes bactériennes sont des structures très variables, capables de subir des changements radicaux même en réponse à de légères modifications du milieu extérieur.

La bactérie peut faire face à de nombreuses contraintes externes. Ce sont le plus souvent l'absence de certains facteurs de croissance dans le milieu, ou l'inactivation d'enzymes participant à la synthèse pariétale par la température, le pH, l'oxygénation ou encore par des substances toxiques ou inhibitrices. La cellule réagit en transformant certains de ses composants pariétaux par d'autres pouvant être synthétisés et actifs dans les nouvelles conditions de croissance. Un des exemples que nous avons cité est la transformation totale de l'acide teichoïque en acide uroteichoïque, moins actif mais pouvant assurer le même rôle dans des milieux non phosphatés.

Dans certains cas extrêmes, la bactérie ne pourra pas réagir aux mauvaises conditions environnementales et sera incapable de synthétiser une paroi (par exemple, lors de l'application de pénicilline). Protégée par sa seule membrane, elle est alors en constant danger de mort. Mais lorsqu'elle se trouve dans un milieu protecteur, hypertonique ou gélosé, la bactérie peut survivre facilement et avoir un métabolisme important. Dans le cas des "Formes L", elle peut même se diviser.

3. - LES ENVELOPPES CELLULAIRES DU GENRE RHIZOBIUM

3.1 - PRESENTATION DU GENRE

Le genre *Rhizobium* est un cas particulier dans l'étude des structures pariétales. En effet, les cellules rhizobiales du sol, infectant les cellules végétales des Légumineuses au niveau des racines, se différencient en cellules polymorphiques fixatrices de l'azote atmosphérique. Celles-ci sont appelées bactéroïdes.

De plus, l'obtention de cellules à morphologie anormale dans les cultures de *Rhizobium* est régulièrement décrite dans la bibliographie.

Ce genre bactérien est donc sujet à de grandes variabilités au niveau de ses enveloppes. Il constitue un bon matériel pour l'étude de tels phénomènes.

Les travaux sur les structures pariétales du genre *Rhizobium* sont assez récents et ont deux motivations principales :

- 1°) l'étude physiologique et biochimique de la nitrogénase. Celle-ci a conduit à l'étude des enveloppes des formes libres et symbiotiques. Il est nécessaire de comprendre comment elles évoluent chez le bactéroïde et quelles sont les conditions impératives à la mise en place du système nitrogénasique ;
- 2°) l'étude de la reconnaissance entre les deux symbiontes. En effet, les structures externes de la bactérie interviendraient dans les premières étapes de la symbiose. La spécificité de ce phénomène a amené à comparer les divers constituants pariétaux (lipopolysaccharides - glycannes pariétaux) et exocellulaires (polysaccharides capsulaires et solubles) de diverses souches des différentes espèces de *Rhizobium*. Des travaux ont aussi porté sur des souches du genre voisin *Agrobacterium*, capables elles-aussi de pénétrer dans les cellules végétales mais pour y provoquer des tumeurs.

L'ensemble des résultats, rassemblé dans ce chapitre, conserve ces aspects comparatifs.

3.2 - ULTRASTRUCTURE DES CELLULES

3.2.1 - Les bactéries en culture

3.2.1.1 - Etude intracellulaire

Les coupes fines des cellules de *Rhizobium* observées en microscopie électronique (188b, 59) présentent les caractéristiques communes à toutes les bactéries à Gram négatif : une paroi revêtant extérieurement une membrane plasmique qui limite le contenu cellulaire formé par les ribosomes périphériques et le nucléotide à DNA fibreux et en position centrale.

La paroi comprend :

- une couche trilamellaire (3 fois 30 Å) externe et lipopolysaccharidique,
- une mince couche de mucopeptide se trouvant dans l'espace périplasmique et qui sépare la couche externe de la membrane cytoplasmique épaisse de 80 Å (61).

Les variations par rapport au schéma classique des bactéries à Gram négatif sont la résultante complexe des caractères systématiques du genre *Rhizobium*, des techniques de fixation, de l'état physiologique ou du stade de développement. Ceci se traduit par :

- une membrane cytoplasmique qui, chez *R. trifolii* (59), présente des invaginations ;
- un nucléoïde ayant quelques fois des granulations denses aux électrons. En général, l'aspect du DNA varie avec la technique de fixation ;
- des grains de poly-β-hydroxybutyrate représentés par des plages claires, arrondies et non limitées par une membrane ;
- la présence de flagelles dans les milieux liquides ;
- des variations morphologiques hétérogènes chez les bactéries récoltées dans les colonies âgées et sénescents. La disposition relative de la paroi et de la membrane cytoplasmique est modifiée, de même que se trouvent

perturbées la structure du nucléoïde et la densité des ribosomes. Un gonflement de l'espace périplasmique est assez fréquent avec apparition de formes cellulaires sphériques ou pseudosphéroplastiques.

3.2.1.2 - Etude extracellulaire

MUTAFTSCHIEV et coll. (130), par diverses techniques de coloration, ont étudié les structures externes de *R. meliloti*. Les colorations négatives au phosphotungstate de potassium ne mettent en évidence que l'aspect général de la bactérie et la présence de flagelles en culture liquide. Par contre, les colorations associant la glutaraldéhyde, le cacodylate, le rouge de ruthénium et l'acétate d'uranyle permettent de meilleures observations : les cellules ne sont ni centrifugées, ni déshydratées et apparaissent telles qu'elles étaient dans le milieu de culture.

C'est ainsi qu'une pseudocapsule polysaccharidique, à structure fibrillaire, a été révélée sur toute la surface de la bactérie. Cette gangue adhère à la paroi en certains points. Elle est épaisse de 0,4 μm et les fibres qui la constituent ont 8 à 12 nm de diamètre. La bactérie est entourée d'un réseau dense de fibres de 10 à 40 nm de diamètre, elles-mêmes composées de plusieurs fibrilles de 3 à 5 nm de diamètre. Ces fibres sont secrétées polairement par la bactérie. Dans les cultures âgées, ce réseau est si dense que les bactéries sédimentent très mal lors des centrifugations à vitesse moyenne.

La fonction de ces fibres polaires exocellulaires est encore inconnue, mais on les soupçonne d'intervenir dans les phénomènes de fixation sur des surfaces inertes (120) ou biologiques (40). Ce mécanisme pourrait être important dans l'initiation du processus de nodulation des légumineuses par le genre *Rhizobium*. On sait qu'interviennent déjà dans la reconnaissance des symbiontes d'une part les lectines végétales (15, (42, 138) et d'autre part des polysaccharides bactériens localisés dans la capsule (39, 10, 20), des lipopolysaccharides (197, 91, 13) ou encore des glycannes pariétaux (144).

3.2.2 - Les bactéroïdes

3.2.2.1 - La différenciation bactérie - bactéroïde

De nombreux travaux ultrastructuraux ont porté soit sur les bactéroïdes nodulaires (89 , 37b, 90, 12 , 117, 82, 27, 137, 101, 183), soit sur les bactéroïdes artificiels (90, 168, 187, 140, 93). Les techniques de coupes fines, de balayages ou encore de cryodécapages ont été utilisées pour les observations en microscopie électronique.

La différenciation des bactéries en bactéroïdes correspond à des changements de taille, de forme et de structure. Certains éléments structuraux notés en culture subissent dans les nodosités une hypertrophie qui accompagnent l'accroissement du volume des bactéroïdes : augmentation de la quantité de PHB (27), prolifération des invaginations de la membrane cytoplasmique (37b, 82),

CHING et HEDTKE (27) ont observé et résumé l'évolution de la différenciation en bactéroïde en étudiant comparativement différentes populations cellulaires de *R. japonicum* provenant de nodules de soja. Celles-ci sont séparées après ultracentrifugation en gradient de saccharose en 3 bandes de cellules :

- des cellules ayant conservées l'allure des bactéries en culture,
- des bactéries en cours de différenciation,
- des bactéroïdes matures.

Chaque population est caractérisée par des propriétés structurales et enzymatiques. Au cours de la différenciation en bactéroïde, il y a accumulation de PHB (au point que la β -hydroxybutyrate déshydrogenase soit considérée comme un marqueur enzymatique bactéroïdien), réduction ou perte de la paroi, dégradation des ribosomes et des fibres DNAsiques. L'activité nitrogénasique est caractéristique du bactéroïde, tandis que l'activité cytochrome C oxydasique et la présence des cytochromes a et a₃ sont propres à la forme bactérienne.

Les cultures obtenues après broyage des nodules sur un milieu riche sont toujours formées de bactéries en bâtonnet. Il y a donc redifférenciation des bactéroïdes en bactéries.

3.2.2.2 - Relations avec la plante hôte

Certains auteurs (96, 37, 174) ont prouvé que la structure du bactéroïde est fortement influencée par la plante hôte. En effet, l'inoculation par une même souche bactérienne de plusieurs plantes hôtes de genres voisins donnait plusieurs phénotypes de bactéroïdes. Par contre, l'inoculation par plusieurs souches bactériennes d'une seule plante hôte commune ne se traduisait que par un type unique de bactéroïde.

La légumineuse intervient dans l'efficacité du bactéroïde, lui apportant certains éléments indispensables à la fixation de l'azote atmosphérique (148). Malgré tout, il existe des exceptions : certaines souches de *Rhizobium* sont capables d'efficacité avec des non légumineuses (182, 3) ou en culture (94, 106, 116, 139, 180, 187, 92, 131, 140, 46, 93).

3.2.2.3 - Les "pseudobactéroïdes"

La structure des bactéroïdes artificiels ressemble fortement à celle des bactéroïdes naturels. JORDAN et COULTER (90) décrivent les bactéroïdes de *R. leguminosarum* obtenus en culture comme étant un peu plus petits que leurs vis à vis intranodulaires (3,5 à 5,0 μm au lieu de 5,0 à 6,2 μm) mais d'aspect beaucoup plus hétérogène. La longueur des cellules en bâtonnet ne dépasse jamais 3,5 μm .

SKINNER et coll. (168) ont constaté que l'agrandissement des cellules et leur diversité morphologique s'accompagnent par l'apparition de nombreuses granulations de PHB, de membranes intracytoplasmiques et d'invaginations de la membrane plasmique.

Ce type de bactéroïde est parfois capable de fixer l'azote atmosphérique en culture (141, 187, 93)

3.3 - ETUDE DES ENVELOPPES ET DE LEUR VARIABILITE

3.3.1 - La membrane cytoplasmique

MILLER et TREMBLAY (124) ont étudié comparativement la membrane cytoplasmique de *R. meliloti* à l'état libre et à l'état symbiotique. Ces chercheurs voulaient définir qu'elles étaient les modifications des propriétés physiques et fonctionnelles de la membrane nécessaires à l'adaptation des bactéries à l'environnement du nodule (et donc à la fixation de l'azote).

Ils relevèrent des modifications dans la composition lipidique : si les lipides neutres et les acides gras comptent toujours pour 30 % des lipides totaux, la composition en acides gras et en phospholipides est différente. Les lipides de la membrane cytoplasmique bactéroïdienne sont plus fluides et répondent de façon spécifique à la présence d'ions calcium par une disposition ordonnée des chaînes latérales des acides gras.

Le bactéroïde possède 10 fois plus de cytochromes b et c, 10 fois moins de cytochromes a et a₃ et la nature de l'oxydase terminale est différente. Ces modifications structurales et fonctionnelles sont sans doute nécessaires au symbionte bactérien pour l'utilisation des substrats carbonés et la création d'un pouvoir réducteur indispensable au système nitrogénasique exprimé dans le nodule.

Des modifications au niveau des phospholipides et des acides gras totaux avaient déjà été observées dans les cellules bactéroïdiennes de *R. japonicum* (65).

Il semble que la présence de P450 et la faible teneur en cytochrome oxydase ainsi que des cytochromes a et a₃, habituellement associés à cette dernière, soient caractéristiques de la membrane bactéroïdienne. (4, 58, 89, 12, 27).

L'utilisation de substrats carbonés est modifiée chez le bactéroïde. Alors que l'incorporation du glucose par les cellules aériennes est facilement inductible (43, 176), les bactéroïdes de *R. leguminosarum* semblent incapables d'utiliser ce substrat, quelque soit la pression partielle

d'oxygène (86, 43). Le glucose n'aurait donc pas d'effet stimulant sur la fixation de l'azote. Par contre, le transport de succinate est important, même à une très faible concentration d'oxygène (1 μ Mole).

GLENN et DILWORTH (71) n'ont pu mettre en évidence le transport de disaccharides chez les bactéroïdes de *R. leguminosarum*.

RIGAUD et coll. (150, 151) et TRINCHANT et coll. (181) affirment que le glucose et le saccharose, tout comme les acides organiques, sont très énergétiques pour la fixation de l'azote à une pression d'oxygène égale à 20 mm de mercure. Par contre, à une pression de 60 mm Hg, seuls les acides organiques (succinate ou fumarate) sont utilisables par les bactéroïdes.

KIDBY et PARKER (96b) expliquent l'altération des systèmes de perméation pour le glucose comme étant consécutive au processus d'extraction et de préparation des bactéroïdes.

3.3.2 - La paroi

3.3.2.1 - La lyse de la paroi et l'obtention de sphéroplastés

La plupart des bactéries à Gram négatif sont résistantes à l'action du lysozyme. De part la production d'exopolysaccharides en quantité importante, la muréine est encore plus difficilement accessible par cette enzyme lytique. Les cellules doivent subir un prétraitement. Le plus souvent, il s'agit d'un lavage par un détergent.

CHILD et SIETSMA (25) ont utilisé du SLS 0,1 % (Sodium Lauryl Sulfate) avant de faire agir le lysozyme dans du tampon Tris-EDTA avec une autre enzyme lytique provenant de *Cytophaga* sp. Les sphéroplastés ainsi obtenus étaient stabilisés dans une solution de sorbitol 0,4 M. Les sphéroplastés pouvaient être aussi réalisés par l'association de lysozyme et d'enzymes lytiques exocellulaires de *Streptomyces* sp. Ce type de cellules bactériennes est utilisable pour les essais d'incorporation du génome bactérien par les protoplastés végétaux.

SCHWINGHAMER (165) a montré que les souches d'*Agrobacterium* et les souches de *Rhizobium*, surtout à croissance rapide, sont sensibles à un prétraitement au sarkosyl (0,1 %). Celui-ci prédispose la cellule à la pénétration du lysozyme. Les fortes concentrations en Tris-EDTA déstabilisent les lipopolysaccharides pariétaux masquant la couche muréique.

Le bactéroïde est beaucoup plus sensible à l'action du lysozyme du fait de sa paroi plus mince et plus perméable. Il est aussi moins résistant à la trypsine, au SDS, au désoxycholate de sodium, au Triton X 100 ou à l'EDTA (185, 186, 173, 174). La sensibilité aux détergents est en relation avec la sensibilité au choc osmotique et à la non viabilité des bactéroïdes, elles-mêmes déterminées par la plante hôte.

3.3.2.2 - Variations génotypiques de la paroi

Les constituants pariétaux ont fait l'objet de comparaisons entre différentes souches et différentes espèces de *Rhizobium* ou d'*Agrobacterium* ainsi qu'entre forme libre et forme symbiotique.

C'est ainsi que GRAHAM et O'BRIEN (74) ont étudié la composition des lipopolysaccharides de *Rhizobium* (16 espèces) et d'*Agrobacterium* (9 espèces). Le glucose et le rhamnose sont les seuls constituants présents dans toutes les préparations. On trouve souvent de l'acide 4-O-méthyl-glucuronique, de la glucosamine, du mannose et en quantité moindre du fucose, du galactose, du xylose et de l'arabinose. Ces auteurs n'ont pas détecté d'heptoses. A part le xylose et l'arabinose, tous les composants apparaissent chez les deux genres bactériens. Mais il existe de grandes différences entre plusieurs souches d'une même espèce, leur conférant ainsi des spécificités sérologiques. De ce fait, GRAHAM et O'BRIEN pensent qu'il est peu probable que les LPS seuls gouvernent l'aptitude d'une souche à noduler une légumineuse particulière.

PLANQUE et coll. en 1979 (145) ont dirigé leurs travaux sur les LPS des bactéries et des bactéroïdes de *R. leguminosarum*. L'étude de la paroi bactéroïdienne a été très limitée car les constituants pariétaux, suivis par dosage des heptoses, disparaissent rapidement lors des purifications. Seuls les sucres neutres et les acides gras purent être

analysés et comparés à ceux des bactéries libres. Il n'y avait d'ailleurs que peu de différences.

Les sucres neutres sont le fucose, le mannitol, le galactose, le glucose, le 2-O-méthylfucose, le L-glycéro-manno-heptose. Le rapport heptose/fucose/2-O-méthylfucose est identique chez la bactérie et chez le bactéroïde (3/2/2). Les composés pariétaux acides de la bactérie sont le KDO et les acides uroniques (3 acides galacturoniques pour un acide glucuronique). Le contenu en phosphore est faible. Les composés aminés sont la L-alanine, la D-glucosamine et la quinovosamine. Les acides gras sont l'acide β OH palmitique, l'acide β OH myristique et l'acide β OH stéarique. Ils forment avec la glucosamine le lipide A.

Le résidu de la phase aqueuse, obtenu après extraction au phénol aqueux, est hydrolysé en présence d'acide. L'électrophorèse sur gel de cet hydrolysate montre 3 bandes : l'une est riche en glucose et ne migre pas (PSI), les deux autres (PSII et PSIII) ont les constituants caractéristiques des LPS. PSIII a un poids moléculaire très bas. L'origine et le rôle du composé polyglucosé sont encore ignorés.

CARLSON et coll., en 1978 (24), avaient déjà réussi à purifier les LPS de *Rhizobium* en éliminant ce polysaccharide glucosylé par gel filtration sur Sephadex. Après avoir étudié la composition des LPS (24, 23) de différentes souches de plusieurs espèces (*R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. trifolii*), CARLSON en arrive aux mêmes conclusions que GRAHAM et O'BRIEN (74) : malgré l'existence de sucres communs (mannose, galactose, glucose, glucosamine, KDO, acide uronique, fucose), les LPS de chaque souche varient qualitativement et quantitativement. Les LPS des souches de la même espèce peuvent varier autant qu'entre souches d'espèces différentes. Les réactions sérologiques ou de lyses phagiques croisées renforcent l'idée de l'existence de nombreuses variations structurales des LPS.

Si ces résultats ne déniaient pas l'intervention des lipopolysaccharides dans la reconnaissance symbiotique, ils ne montrent pas de corrélation entre structure des LPS et groupes d'inoculation. ZEVENHUISEN et coll. (203) proposent l'existence de récepteurs spécifiques et non spécifiques chez *Rhizobium*.

RUSSA et coll. (154) en étudiant les souches nodulantes et anodulantes de *R. trifolii* ont permis de mieux voir l'impact des LPS dans le processus de la reconnaissance bactérie-hôte. Comme les exopolysaccharides et les LPS ont des affinités avec les lectines végétales (13), ils ont comparé la structure de ces macromolécules chez les deux types de souches.

Si les EPS ont à peu près la même composition (c'est-à-dire surtout du glucose et du galactose), il n'en est pas de même pour les LPS. Chez la souche nodulante on trouve principalement du glucose et du rhamnose. Par contre, les LPS de la souche anodulante sont surtout constitués de rhamnose et de galactose. Ces auteurs en conclurent que c'est cette altération dans la composition des LPS qui entraînait la non nodulation.

Comme la souche nod⁻ a perdu le plasmide de symbiose par effet thermique, celui-ci serait sans doute porteur des gènes responsables de la modification de la synthèse des LPS.

Des réponses nous seraient apportées en étudiant les modifications pariétales éventuellement engendrées par l'acquisition de ce plasmide "sym" chez les souches réceptrices. En effet, la nodulation de la luzerne a pu être réalisée par des souches du "cowpea group" ou d'*Agrobacterium* ayant acquis le pRme41b de *R. meliloti* (198), ou seulement certaines régions du mégaplasmide (81). Cette nodulation a été, logiquement, initiée par la reconnaissance des transconjugants par la légumineuse. Ces bactéries, maintenant reconnues comme étant d'espèce *R. meliloti*, ont dû subir des modifications de leurs structures externes (LPS, EPS, ...) nécessairement complémentaires aux lectines de la luzerne.

3.3.2.3 - Modifications des structures pariétales dues aux conditions de culture

Van BRUSSEL et coll. (186) ont remarqué des changements dans la composition des parois de *R. leguminosarum*, suivant la source azotée du milieu de croissance. Ils ont observé des modifications quantitatives du matériel des phases insoluble, phénolée et surtout aqueuse, lors des extractions à l'eau phénolée. Les LPS des bactéries, quantifiés par dosage des heptoses en phase aqueuse, seraient particulièrement sensibles à la

nature de la source azotée. Ce sont les cultures en présence d'ammonium qui ont le moins de LPS dans les parois. Chez les bactéroïdes, cette valeur est encore plus faible.

L'abaissement de la concentration en LPS se traduit par un changement morphologique des bactéries. Van BRUSSEL suggère que ces formes aberrantes seraient causées par une fragmentation de la couche mu-
réique permettant le gonflement des cellules par osmose. Cette fragmentation réduirait la rétention des composants pariétaux tels que les LPS et augmenterait la perméabilité de molécules comme le lysozyme.

Certains auteurs ont obtenu des formes pléiomorphiques en culture mais leurs travaux se sont limités à l'observation de ces formes et à leur inductibilité. La composition de leur paroi n'a pas été étudiée mais de part la morphologie inhabituelle des bactéries, elle a sans doute été modifiée (186). Il était donc intéressant de relever tous ces éléments influençant l'aspect des cellules rhizobiales.

- JORDAN et COULTER (90) ainsi que SKINNER et coll. (168) ont mis l'accent sur l'effet déformant de l'extrait de levure (3,5 %) sur les cellules de *Rhizobium* en culture et particulièrement chez *R. leguminosarum*.
- URBAN (184), en enrichissant le milieu de culture en casaminoacids, extrait de levure, succinate de sodium et glucose, a obtenu des formes pseudobactéroïdiennes de *R. trifolii*.
- Enfin, l'absence de cobalt dans le milieu de culture se traduit par un allongement des cellules de *R. meliloti* (35). Cet ion est un composant de la vitamine B12 qui a un rôle important dans la multiplication cellulaire (158). SATO et coll. (159) ont montré que des enzymes B12 dépendantes (par exemple la méthionine synthase) et le taux de composés folates (par exemple le tétrahydrofolate) étaient à l'origine de ces changements morphologiques.

Une autre série d'auteurs ont essayé de faire la liaison entre la fixation d'azote asymbiotique et le pléiomorphisme des cellules en culture. Ainsi, chez certaines souches, l'induction de ces formes polymorphiques est accompagnée d'activité nitrogénasique.

L'inductibilité est le plus souvent réalisée dans ou sur milieu gélosé. La source d'azote la plus favorable est le glutamate et les sources carbonées le succinate et l'arabinose (141, 187, 140). La perte de l'activité nitrogénasique et la disparition des formes atypiques étaient provoquées par :

- l'augmentation du pourcentage d'oxygène dans l'atmosphère recouvrant les couches d'agar,
- l'augmentation de la température d'incubation (33°C),
- l'augmentation de la concentration de la source azotée dans le milieu de croissance (20 μ Moles d'azote au lieu de 2 μ Moles). Il est à noter que l'ammonium en concentration faible, mais pas l'ion nitrate, se comporte comme le glutamate.

Pour KANESHIRO et coll. (93), l'activité nitrogénasique n'est pas toujours la traduction du pléiomorphisme. Un milieu gélosé à base de glutamate, de mannitol et de gluconate provoque l'apparition de cellules pléiomorphiques chez plusieurs souches mais toutes ne sont pas capables de fixer l'azote. De plus, l'emploi d'inhibiteurs de la division cellulaire, tels que l'acide nalidixique ou la novobiocine, augmente le taux de pléiomorphisme mais diminue l'activité nitrogénasique.

3.3.2.4 - Action d'agents mutagènes

Après mutagenèse à la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, le mutant IN8-25 de la souche MSN1 de *R. meliloti* a été isolé (127). Celui-ci montrait un nombre important de cellules pléiomorphiques lorsqu'il était cultivé sur le milieu d'Iswaran fructosé gélosé. Dans les mêmes conditions de culture, la souche sauvage d'origine ne donne pas de cellules déformées.

Le mutant IN8-25 a été testé par nodulation de la luzerne et lyse par un phage spécifique et son contenu plasmidique a été étudié. Il a été conclu que ce mutant était bien issu de la souche MSN1 de *R. meliloti*.

Le polymorphisme de cette souche ne s'exprime que sous certaines conditions de culture (128, 129) :

- le pléiomorphisme du mutant (80 à 100 % de cellules déformées) apparaît sur le milieu d'Iswaran gélosé et non sur ce même milieu liquide,
- le milieu d'Iswaran contient de l'extrait de levure (2 g/l) et du gluconate de potassium (1,5 g/l). Ces deux facteurs nutritifs sont impliqués dans le pléiomorphisme : seul le mutant se déforme en présence de gluconate (tab. 1) et il est nettement plus sensible à l'effet déformant de l'extrait de levure (tab. 2) déjà signalé par SKINNER (168).

MILIEUX	POURCENTAGE DE CELLULES DEFORMEES	
	MUTANT 1N8-25	M5N1
RC	0	0
RC + Gluconate	80-100 %	0
Iswaran	80-100 %	0
Iswaran - Gluconate	< 10 %	0

TABLEAU 1 : EFFET DU GLUCONATE SUR LE PLEIOMORPHISME DES SOUCHES 1N8-25 ET M5N1 DE *R. MELILOTI* EN CROISSANCE SUR DIVERS MILIEUX GELOSES.

CONCENTRATIONS EN EXTRAIT DE LEVURE (g/l)	POURCENTAGE DE CELLULES DEFORMEES			
	MUTANT 1N8-25		M5N1	
	RC	Iswaran	RC	Iswaran
0,5	0	50 à 80 %	0	0
1	0	50 à 80 %	0	0
2	< 10 %	80 à 100 %	0	0
3	80 à 100 %	80 à 100 %	< 10 %	< 10 %
4	80 à 100 %	80 à 100 %	10 à 30 %	10 à 30 %
5	80 à 100 %	80 à 100 %	10 à 30 %	10 à 30 %
10	< 10 %	30 à 50 %	< 10 %	< 10 %

TABLEAU 2 : EFFET DE L'EXTRAIT DE LEVURE SUR LE PLEIOMORPHISME DES SOUCHES 1N8-25 ET M5N1 EN CROISSANCE SUR LES MILIEUX RC ET ISWARAN GELOSES.

3.3.3 - Les polysaccharides exocellulaires

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont très variablement encapsulées, selon la souche et selon l'espèce (48). Cette capsule est par ailleurs peu solidaire de la paroi et se solubilise facilement dans le milieu de culture. On parle plutôt de pseudocapsule.

Cette gangue polysaccharidique est très mince chez *R. meliloti* (48) et elle n'entoure pas entièrement les cellules de *R. japonicum* (126). Chez cette dernière espèce, la composition de la pseudocapsule varie avec l'âge de la culture (126).

En général, le glucose, l'acide glucuronique, le galactose et le mannose sont présents dans les polysaccharides capsulaires de toutes les espèces de *Rhizobium* (28).

COURTOIS et coll. (33) distinguent d'une part les EPS des souches de *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* et *R. trifolii*, constitués de 20 % d'acide glucuronique, et d'autre part les EPS des souches de *R. meliloti*, ayant très peu ou pas d'acide glucuronique.

La présence effective du mannose dans la composition des EPS est très controversée. Selon certains auteurs (87), sa détection serait due en réalité à la présence de mannanes dans les milieux de culture à base d'extrait de levure. COURTOIS et coll. (33), analysant les EPS de *R. meliloti* synthétisés dans un milieu exempt d'azote, donnent une composition générale de 7 glucose pour 1 galactose ; les EPS des mêmes souches synthétisés en présence d'extrait de levure contiennent effectivement du mannose (10 %). Enfin, d'autres auteurs (66) considèrent le mannose comme un ose constitutionnel des EPS de *R. meliloti*.

ZEVENHUISEN (202) montre que les polysaccharides de *R. meliloti* renferment 4 à 9 % de pyruvate et 4 à 10 % d'acétate.

CADMUS et coll. (19) ont étudié le taux de ces substituants dans les EPS de *Rhizobium* à croissance rapide. Le taux de pyruvate augmente avec l'âge des cultures, quelque soit l'espèce de *Rhizobium*. Le pourcentage de groupements acétate diminue chez *R. meliloti*, est constant chez *R. phaseoli* et augmente chez *R. trifolii* et *R. leguminosarum* au cours du vieillissement des cellules.

3.4 - CONCLUSION

Bien que dans l'ensemble, les structures pariétales de *Rhizobium* correspondent à celles des bactéries à Gram négatif, celles-ci sont sujettes à une très grande diversité.

Les principales causes de cette hétérogénéité sont tout d'abord génétiques : elles traduisent les nombreuses variations chromosomiques et extra-chromosomiques (DNA plasmidique) existant entre chaque souche de chaque espèce. Elles sont aussi fonction du cycle de *Rhizobium* (état libre ou symbiotique) mais très souvent consécutives à des pressions environnementales :

- enrichissement ou appauvrissement du milieu de culture,
- modifications des conditions de croissance,
- action de substances inhibitrices de la division.

Ces modifications pariétales importantes se traduisent par des changements de morphologie et de métabolisme. Ces transformations, enfin, sont réversibles.

M A T E R I E L

E T

M E T H O D E S

1. - SOUCHES ET NOMENCLATURE

L'ensemble des souches de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* utilisées sont référencées dans le tableau 3 pages 54-55 des résultats. Les origines des souches sont ainsi abrégées :

- U.S.T. Lille I : Université des Sciences et Techniques de Lille I.
- C.I.A.T. : Centre International d'Agriculture Tropicale, Marseille.
- C.S.I.R.O. : Common Wealth Scientific and Industrial Research Organisation, Camberra (Australie).
- R.I.O. : Research Institute Ontario (Canada).
- R.C.R. : Rothamsted Collection of *Rhizobium*, Harpenden Herfordshire (Angleterre).
- U.W.A. : University of Western Australia, Nedlands (Australie).

La souche 12837 d'*Azotobacter vinelandii* (American Type Culture Collection ou A.T.C.C.) a été choisie pour les essais de réduction de l'acétylène.

2. - MILIEUX DE CULTURE ET TAMPONS

2.1 - MILIEU D'ISWARAN (133b)

K_2HPO_4	0,5	g
$MgSO_4, 7H_2O$	0,2	g
Extrait de levures	2	g
Gluconate de potassium	1,5	g
NaCl	0,1	g
$FeCl_3, 6H_2O$	0,01	g
E.D. QSP	1	l

2.2 - MILIEU RC MODIFIE PAR DELATTRE (41)

MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2	g
K ₂ HPO ₄	1	g
Extrait de levures	1	g
E.D. QSP	1	1

2.3 - MILIEU N

MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2	g
K ₂ HPO ₄	1	g
Gluconate de potassium	1,5	g
NH ₄ NO ₃	1	g
E.D. QSP	1	1

La biotine et la thiamine sont ajoutées aux concentrations respectives de 10 µg/l et 500 µg/l.

2.4 - MILIEU RHB₁ (41)

MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2	g
K ₂ HPO ₄	1	g
NH ₄ NO ₃	1	g
E.D. QSP	1	1

Ajouter la biotine à la concentration de 10 µg/l et la thiamine à la concentration de 500 µg/l.

Les milieux ci-dessus décrits sont additionnés de sucre à raison de 10 g/l.

2.5 - MILIEU DE O'GARA ET DE SHANMUGAN (134)

Mannitol	5	g
Gluconate de sodium	5	g
KH_2PO_4	0,3	g
Na_2HPO_4	0,3	g
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	g
$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0,05	g
H_3BO_3	10	mg
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	1	mg
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,5	mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	0,1	mg
$\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$	1	mg
$\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$	0,5	mg
Biotine	0,2	mg
Glutamate de sodium	1	g
E.D. QSP	1	l

2.6 - TAMPON DE NON PROLIFERATION (33)

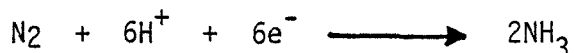
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	g
K_2HPO_4	1	g
E.D. QSP	1	l

3. - TECHNIQUE DE LA RÉDUCTION DE L'ACÉTYLÈNE

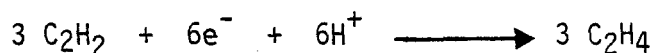
Cette technique a été décrite par KEISTER (94). Elle conduit à la mise en évidence de l'activité nitrogénasique des bactéries en culture libre.

3.1.- PRINCIPE

La réaction de la fixation de l'azote atmosphérique, catalysée par la nitrogénase, est schématisée de la manière suivante :



La nitrogénase est peu spécifique. Ainsi cette réaction peut se réaliser à partir de l'acétylène qui est alors réduit en éthylène :



C'est ce mécanisme qui permet l'emploi de la réduction de l'acétylène pour mesurer une activité nitrogénasique.

3.2 - CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les bactéries sont cultivées sur milieux gélosés dans des flacons cottonnés de 125 ml. Après 5 jours de croissance les cellules sont :

- soit récupérées, lavées par le TNP et placées dans un biberon hermétique de 125 ml, contenant 25 ml du milieu d' O'GARA et SHANMUGAN (134) ;
- soit laissées telles quelles, mais le biberon est fermé hermétiquement.

L'air est chassé des flacons par un flux continu d'argon pendant 10 mn. L'acétylène est alors introduit à raison de 5 %.

Des prélèvements gazeux (0,50 µl) sont effectués après 5 jours d'incubation afin de doser l'éthylène formé.

3.3 - ANALYSE EN CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE

Le dosage de l'éthylène est réalisé sur un chromatographe INTERSMAT IGC 122F avec les paramètres suivants :

- gaz vecteur : l'azote
- détecteur à ionisation de flamme
- température du four : 50°C
- température d'injection : 70°C
- température du détecteur : 115°C

La colonne en acier inoxydable est remplie de sphérosil XOB 075.

4. - TECHNIQUE DE PERMÉATION

Il s'agit de mesurer, en scintillation liquide, la quantité de substrat radiomarqué retenu par les cellules bactériennes au cours du temps.

4.1 - PREPARATION DES CELLULES

Les cellules sont cultivées 72 h dans les conditions de croissance voulues. Elles sont ensuite centrifugées à 12 000 g pendant 10 mn et lavées deux fois dans du TNP. Lors de la dernière centrifugation, le culot n'est repris que par quelques ml de TNP. L'absorbance des purées cellulaires ainsi obtenues est mesurée.

4.2 - CONSTITUTION DU MILIEU REACTIONNEL

Le substrat froid est utilisé à la concentration de 10^{-4} M. Le substrat radiomarqué est déterminé par une activité spécifique. Celle-ci est de :

- | | | |
|--------------------------------------------------------|---|--------------------------------|
| - 4,9 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$ pour le glucose | } | Radiochemical Centre, Amersham |
| - 21,9 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$ pour le succinate | | |
| - 5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$ pour le fructose | | |

Les cellules et le TNP sont ajoutés de manière à obtenir un milieu réactionnel de 1 ml à DO = 1,00.

4.3 - MODE OPERATOIRE

La suspension cellulaire est préincubée à 30°C pendant 15 mn. Le substrat est alors additionné. Les prélèvements de 100 μl sont déposés sur une membrane filtrante humide de 0,45 μm et rincée par 2 ml de TNP et NaCl (5 %) à 4°C . Les membranes sont ensuite séchées sous infrarouge pendant 30 mn et placées dans des pots à scintillation. On met alors 7,5 ml de liquide scintillant (Lipo Fluor de Luma) et le nombre de coups par minute (cpm) est comptabilisé par le compteur à scintillation liquide "LKB 1215 Rackbeta".

Les cpm sont ensuite transcrits en μmole de substrat accumulé par μg de protéines en se servant des activités spécifiques de chaque sucre (1 μCi est équivalente à $2,2 \times 10^6$ cpm).

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de LOWRY et coll. (110). Le sérum albumine de boeuf est employée comme témoin.

5. - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

5.1 - COLORATION NEGATIVE DE BACTERIES NON FIXEES (130)

- Grilles de cuivre recouvertes d'une membrane de Parlodion et carbonées,
- déposer une goutte de suspension bactérienne sur les grilles, laisser sédimenter deux minutes,
- absorber la goutte avec du papier filtre,
- coloration au phosphotungstate de potassium (1 %), pH 7,
- absorber le colorant après une minute de contact.

5.2 - COLORATION TOTALE APRES FIXATION DES CELLULES (130)

- sédimentation de la suspension bactérienne sur les grilles de cuivre,
- absorption de la goutte par du papier filtre,
- coloration au rouge de ruthénium : déposer la grille pendant 2 mn, côté à observer, sur une goutte d'un mélange (volume/volume) d'une solution de glutaraldéhyde (1 %) dans du tampon cacodylate (0,2 M), pH 7, et d'une solution à 1 % de rouge de ruthénium dans de l'eau distillée,
- absorber l'excès de colorant,
- coloration à l'acétate d'uranyle (0,05 %) pendant une minute,
- absorber l'excès de colorant.

5.3 - COUPES ULTRAFINES (114, 115)

Les cellules sont fixées une première fois par addition d'un volume des trois solutions A, B, C :

- solution A : cacodylate (0,2 M) pH 7,4
- solution B : glutaraldéhyde (3,6 %)
- solution C : rouge de ruthénium (0,15 %)

Après une heure à + 4°C, la suspension est centrifugée 5 mn à 10 000 trs/mn, débarrassée du surnageant et rincée par un volume de A et de C. Après centrifugation, les cellules subissent une deuxième fixation par addition d'un volume de A, de C et acide osmique (4 %) et sont placées à l'obscurité. Trois heures après, les cellules sont de nouveau centrifugées. La déshydratation des bactéries est effectuée par :

- deux passages de 15 mn dans l'alcool à 70°,
- deux fois 20 mn dans l'alcool à 96°,
- trois fois 20 mn dans l'alcool absolu,
- trois fois 20 mn dans l'oxyde de propylène.

Entre chaque bain, les cellules sont centrifugées, débarrassées du surnageant et réémulsionnées dans le bain suivant.

Les cellules déshydratées sont incluses suivant la technique de LUFT (113) :

- 12 h à + 4°C dans un mélange (volume/volume) d'oxyde de propylène et de résine (EPON + DDSA + MMA),
- 1 h dans de la résine pure à température ambiante,
- 72 h à 55°C dans la résine finale (EPON + DDSA + MMA + DMP30).

Les coupes sont réalisées sur "Porter Blum Sorvall", recueillies sur grilles nues et contrastées au citrate de plomb selon REYNOLDS (148b). L'observation est faite au microscope électronique JEOL 120 CX.

6. - IDENTIFICATION DE L'ACIDE 2 CÉTO-GLUCONIQUE

Des cultures de 72 h sont centrifugées à 12 000 g pendant 20 mn. Le surnageant est ensuite concentré 10 fois au BÜCHI.

La séparation électrophorétique des oses présents dans le surnageant est effectuée dans un appareil en toit à 400 V et pendant 15 h. On utilise du papier WHATMAN n°3 et le tampon de MICHL (123) à pH 3,9.

La révélation des produits migrés est réalisée par l'oxalate d'aniline à 105°C pendant 10 mn selon la technique de PARTRIDGE (143) : les oses neutres sont colorés en brun tandis que l'acide 2 céto-gluconique prend une coloration rose spécifique.

Tampon de MICHL - pH 3,9

- Pyridine 30 ml
- Acide acétique 100 ml
- E.D.4 000 ml

Réactif de PARTRIDGE

- 2 volumes d'une solution d'aniline à 2 % dans l'éthanol absolu,
- 3 volumes d'une solution aqueuse d'acide oxalique à 2,5 %.

R E S U L T A T S

1. - EXPRESSION DU PLÉIOMORPHISME CHEZ LES SOUCHES SAUVAGES SUR MILIEU GÉLOSÉ

1.1 - RECHERCHE D'UN MILIEU INDUCTEUR

1.1.1 - Résumé des travaux antérieurs

Pour étudier l'influence des conditions de croissance sur la morphologie cellulaire du genre *Rhizobium*, il nous fallait contrôler l'apparition des formes bactériennes anormales donc pouvoir "induire" à volonté le pléiomorphisme.

Ce travail avait déjà été amorcé avec l'étude de la souche mutante IN8-25 pléiomorphique. Celle-ci avait été obtenue après action de la NTG sur la souche sauvage M5N1 de *R. meliloti* (127). Les résultats obtenus avec cette souche IN8-25 (128, 129) et repris pages 38, 39, 40 nous avaient amené aux conclusions suivantes :

- un milieu gélosé est mieux adapté à l'obtention de formes aberrantes qu'un milieu liquide ;
- contrairement à la souche mutante IN8-25, la souche sauvage d'origine M5N1 est moins sensible à l'effet déformant de l'extrait de levure utilisé en forte concentration ;
- par contre, une source azotée minérale telle que le nitrate d'ammonium, associée au gluconate, peut provoquer l'apparition de formes anormales chez la souche M5N1.

C'est en se basant sur ces données que nous avons continué nos travaux.

1.1.2 - Mise en évidence du pléiomorphisme sur le milieu N gélosé

1.1.2.1 - Comportement de la souche M5N1

Le milieu de croissance N est caractérisé par la présence de nitrate d'ammonium (1 g/l) et de gluconate de potassium (1,5 g/l). La réalisation de ce milieu tient donc compte des résultats antérieurs.

La souche M5N1 a été mise en culture sur ce milieu gélosé. L'examen microscopique de nombreux clones rend compte qu'un fort pourcentage de cellules déformées (80 à 100 %) était obtenu sur ce type de milieu.

1.1.2.2 - Comportement des souches à croissance rapide de *Rhizobium* et des souches d'*Agrobacterium*

Il était intéressant de savoir si le phénomène observé avec la souche M5N1 était particulier à cette souche ou général à la famille des *Rhizobiaceae*. Pour cela, nous avons cultivé sur le milieu N gélosé 46 autres souches de *Rhizobium* représentant les espèces *meliloti* (25 souches), *trifolii* (9 souches), *leguminosarum* (7 souches), *phaseoli* (5 souches) et 7 souches du genre *Agrobacterium*.

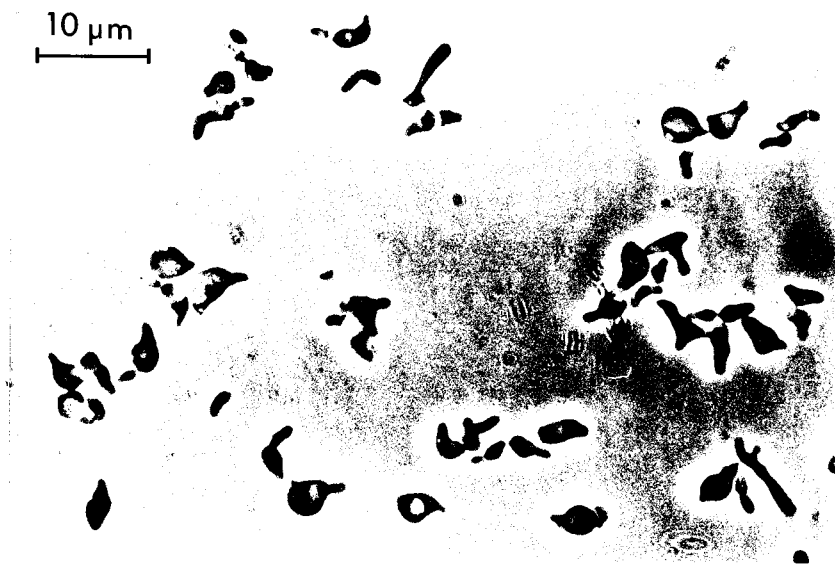
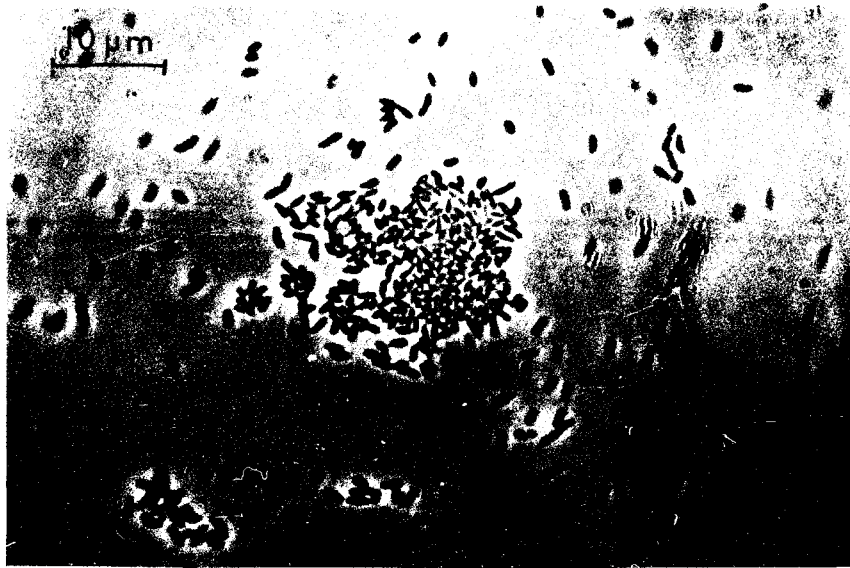
1°) *R. meliloti* : le tableau 3 montre que seules 4 souches (2004, A145, Ve26, M1-5) parmi les 26 souches étudiées (M5N1 comprise) ne se déforment pas après croissance sur le milieu N gélosé. Dans ce cas, les cellules observées se présentent sous la forme de bâtonnets très courts (photo 1) et les clones sont crénelés au lieu d'être lisses et brillants comme chez les souches pléiomorphiques. La différence d'aspect entre clones sensibles et insensibles aux agents "inducteurs" du pléiomorphisme avait déjà été signalée lorsque l'on comparait les clones de la souche IN8-25 sur milieu d'Iswaran et le témoin M5N1.

Le taux de pléiomorphisme (ou P%) des autres souches de *R. meliloti* ayant cultivé sur le milieu N gélosé atteint toujours 80 à 100 %. Les cellules ont alors un aspect très variable (formes branchées, ballonnées...) (photo 2).

PLANCHE 1 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE OPTIQUE DE L'ASPECT CELLULAIRE
DE DIFFERENTES SOUCHES APRES 5 j D'INCUBATION SUR LE
MILIEU N GELOSE.

PHOTO 1 : CELLULES DE LA SOUCHE Ve26 DE R. MELILOTI ; BÂTONNETS TRES COURTS.
(grossissement x 1 440).

PHOTO 2 : CELLULES DE LA SOUCHE Ar16 DE R. MELILOTI ; ASPECT HETEROGENE.
(grossissement x 1 440).



ESPECE	SOUCHE	ORIGINE	P% APRES CULTURE SUR N GELOSE
<i>R. meliloti</i>	M5N1	UST (Lille I)	80 à 100 %
"	M5S	"	"
"	M11S	"	"
"	M13S	"	"
"	M14S	"	"
"	M20S	"	"
"	21	F. PICHINOTY CIAT	"
"	44	F. PICHINOTY CIAT	"
"	444	F. PICHINOTY (TRUCHET)	"
"	2001	F. PICHINOTY RCR	"
"	2009	F. PICHINOTY RCR	"
"	2011	F. PICHINOTY RCR	"
"	Su47	CSIRO	"
"	M17	RIO (Canada)	"
"	Wu498	UWA	"
"	Wu499	UWA	"
"	A161	Hollande (Kampen)	"
"	Ar16	Tunisie	"
"	Tu20	Tunisie	"
"	FM1	France (Dijon)	"
"	12	RFA (Bielefeld)	"
"	MVII-I	RFA (Bielefeld)	"

<i>R. trifolii</i>	T1	RIO (Canada)	< 20 %
"	T15S	UST (Lille I)	< 20 %
<i>R. leguminosarum</i>	L1S	UST (Lille I)	< 20 %
"	L2S	"	"
"	L3S	"	"
"	L11S	"	"
"	L25S	"	"
<i>R. phaseoli</i>	P2S	UST (Lille I)	< 20 %
"	P7S	"	"

<i>R. meliloti</i>	2004	F. PICHINOTY RCR	0 %
"	A145	Hollande (Kampen)	"
"	Ve26	M. OBATON (Dijon)	"
"	M1-5	Belgique (Gembloux)	"
<i>R. trifolii</i>	T5S	UST (Lille I)	0 %
"	T7S	"	"
"	T8S	"	"
"	T25S	"	"
"	T27S	"	"
"	T35S	"	"
"	T41S	"	"
<i>R. leguminosarum</i>	L4S	UST (Lille I)	0 %
"	L17	Belgique (Gembloux)	"
<i>R. phaseoli</i>	P8S	UST (Lille I)	0 %
"	P11S	"	"
"	P9S	RIO (Canada)	"
<i>A. tumefaciens</i>	B6	J. DE LEY (Gand)	0 %
"	F1	"	"
"	TT111	"	"
"	B37	"	"
<i>A. rubi</i>	TR2	"	"
<i>Agrobacterium</i> spp.	0362	"	"
<i>A. rhizogenes</i>	RHIZO	R. BLONDEAU (Lille)	"

TABLEAU 3 : POURCENTAGE DE PLEIOMORPHISME (P%) DE DIFFERENTES SOUCHES DU GENRE *RHIZOBIUM* (ESPECES A CROISSANCE RAPIDE) ET DU GENRE *AGROBACTERIUM*, EN CROISSANCE SUR LE MILIEU N GELOSE.

- 2°) Autres espèces de *Rhizobium* à croissance rapide : les résultats obtenus avec les souches de *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, montrent que ces souches ne sont pas ou très peu sensibles à l'effet déformant d'une culture sur milieu N gélosé. Dans aucun cas, le pourcentage de pléiomorphisme n'excède 20 %. Les bactéries considérées comme atypiques présentent un développement anormal du volume cellulaire dû à un allongement du corps bactérien. Elles n'ont pas l'aspect hétérogène remarquable chez *R. meliloti*.
- 3°) *Agrobacterium* ssp. : les 7 souches d'*Agrobacterium* testées présentent toujours l'aspect en bâtonnet régulier, caractéristique de ce genre.

1.1.3 - Conclusions

Parmi toutes les souches des genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* testées sur milieu N gélosé, seules les souches de *R. meliloti* (22 souches sur 26) présentent un pourcentage de pléiomorphisme élevé (80 à 100 %). Le type de déformation ressemble beaucoup à celui des bactéroïdes intranodulaires.

Les autres espèces de *Rhizobium* à croissance rapide, ont un taux de pléiomorphisme nettement plus faible (20 % au maximum et chez quelques souches seulement). Les déformations ne sont d'ailleurs pas du même type : elles sont moins marquées et ressemblent à celles obtenues avec des cultures vieillissantes.

Ces résultats sont en accord avec ceux de COURTOIS et coll. (34b) qui distinguent *R. meliloti* des autres espèces de *Rhizobium* à croissance rapide, quant à la production d'exopolysaccharides solubles et des variations de pH en présence de fructose ou de glucose. Il est à remarquer que les souches Ve26 et M1-5 avaient déjà été écartées du reste des autres souches de *R. meliloti* par leur originalité de comportement en présence de fructose.

Enfin, si de nombreux auteurs (125b, 42b, 77b, 34b) rapprochent l'espèce *R. meliloti* du genre *Agrobacterium*, nous montrons par notre étude q'il existe entre ces deux taxons certaines différences physiologiques, tout au moins dans la synthèse de la paroi. Ces variations se traduisent par des comportements dissemblables sur milieu gélosé.

Outre, son intérêt taxonomique, la culture sur milieu N gélosé est particulièrement intéressante : elle permet de déclencher l'apparition du pléiomorphisme de la plupart des souches de *R. meliloti*.

Le fait de posséder des milieux "inducteurs" ou "non inducteurs" du pléiomorphisme ainsi que des souches se déformant ou ne se déformant pas sur le même milieu de culture, est un bon support pour notre étude. Nous utiliserons parallèlement :

- des souches de *R. meliloti* se déformant sur milieu N gélosé. Le plus souvent ce seront les souches M5N1 et Ar16 ;
- des souches de *R. meliloti* ne se déformant pas sur le même milieu gélosé et qui sont les souches M1-5, 2004, Ve26 et A145 ;
- des souches du genre *Agrobacterium* insensibles au pléiomorphisme sur ce milieu. Les plus utilisées seront les souches B6 et Rhizo.

L'étude comparative de ces 3 types de souches peut nous permettre de mieux comprendre le pléiomorphisme et de les situer taxonomiquement les unes par rapport aux autres.

1.2 - EFFET DU PLEIOMORPHISME SUR LA VIABILITE DES CELLULES

On sait que les bactéroïdes, sans précautions de culture, sont peu revivifiables (74b). Les auteurs ayant obtenus des cellules polymorphiques en milieu liquide ont eux aussi remarqué que ces cellules étaient incapables de se diviser (184) et donc de donner des colonies sur milieu gélosé (168).

Afin de confronter ces observations avec le cas qui nous concerne, nous avons réémulsionné dans du TNP des clones en croissance sur le milieu N gélosé. Ces clones sont issus des souches M5N1 (cellules déformées), M1-5 et B6 (cellules non déformées). Les cellules sont lavées dans du TNP, numérotées et les valeurs rapportées à DO = 1,00. Il en a été fait de même avec les cultures de ces 3 souches en croissance sur RC gélosé (cellules non déformées). Toutes ces valeurs sont reprises dans le tableau 4. La viabilité est déterminée sur le milieu gélosé d'origine.

MILIEUX	NOMBRE DE CELLULES VIABLES $\times 10^9$ /ml A DO = 1,00		
	M5N1	M1-5	B6
N gélosé	0,15	1,83	5,00
RC gélosé	1,8	1,87	4,55

TABLEAU 4 : VIABILITE DES CELLULES NORMALES ET PLEIOMORPHIQUES SUR MILIEUX GELOSES.

Pour les colonies de cellules non déformées (souches M1-5 et B6), le nombre de cellules viables diffère peu selon le milieu de croissance et pour une souche donnée. Par contre, pour la souche M5N1, le nombre de cellules viables récoltées sur le milieu N gélosé (cellules polymorphiques) est 10 fois inférieur à celui obtenu avec les cellules provenant du milieu RC gélosé (cellules normales). Cette grande différence ne peut être imputée uniquement à une modification de la taille des cellules. Il s'agit là, en réalité, d'une non-viabilité des cellules pléiomorphiques.

La méthode de détermination du nombre de cellules viables par ml de suspension bactérienne, ajustée à DO = 1,00 et pour une souche donnée, traduit nettement un pourcentage de pléiomorphisme déterminé au microscope. En effet, pour le cas de la souche M5N1, le nombre de cellules viables dans une population formée par 80 à 100 % de cellules pléiomorphiques est égal à 1/10 du nombre de cellules viables d'une population entièrement constituée de cellules normales. On peut supposer que ces 10 % représentent le nombre de bactéries peu ou pas déformées après culture sur N gélosé.

Cette méthode de calcul viendra donc souvent appuyer un pourcentage de pléiomorphisme déterminé au microscope. Elle se révèlera efficace surtout dans le cas des polymorphismes intermédiaires compris entre 20 et 80 %.

Les 3 souches (M5N1, M1-5, B6) seront par la suite de nombreuses fois réutilisées et les valeurs du tableau 4 prises en référence.

1.3 - RECHERCHE DES ELEMENTS PROVOQUANT L'APPARITION DU PLEIOMORPHISME

Il était nécessaire de répondre aux questions suivantes pour comprendre le déclenchement du pléiomorphisme :

- est-ce que la culture en milieu gélosé, tout comme dans le cas de la souche 1N8-25, est la seule forme possible pour l'obtention de cellules polymorphiques ?
- quels sont les éléments nutritifs réellement impliqués dans le polymorphisme ? Deux substrats, au vu des résultats obtenus avec la souche 1N8-25, se révèlent importants : le gluconate et la source azotée.

1.3.1 - Influence de la nature du milieu de culture

1.3.1.1 - Dispositifs

Le milieu N a été inoculé de plusieurs façons différentes par la souches M5N1 :

- inoculation en surface des milieux gélosés (observations microscopiques des cellules après 7 j de culture) ;
- inoculation en profondeur des milieux gélosés (observation après 7 jours) ;
- inoculation de supports en papier WHATMAN n°3 émergeant d'un milieu liquide (fig. 6). Ce dispositif a l'avantage de permettre la formation

de colonies cellulaires à partir d'un milieu N sans apport d'agar. L'inoculum est faible (environ 10^3 bactéries/ml). Par capillarité, la diffusion des éléments nutritifs se fait au niveau de l'inoculum. L'ensemencement du milieu liquide est inévitable. De ce fait, on peut observer un trouble bactérien dans la phase liquide. L'apparition de colonies sur le support a lieu au bout de 6 jours et l'observation des cellules est réalisée le dixième jour.

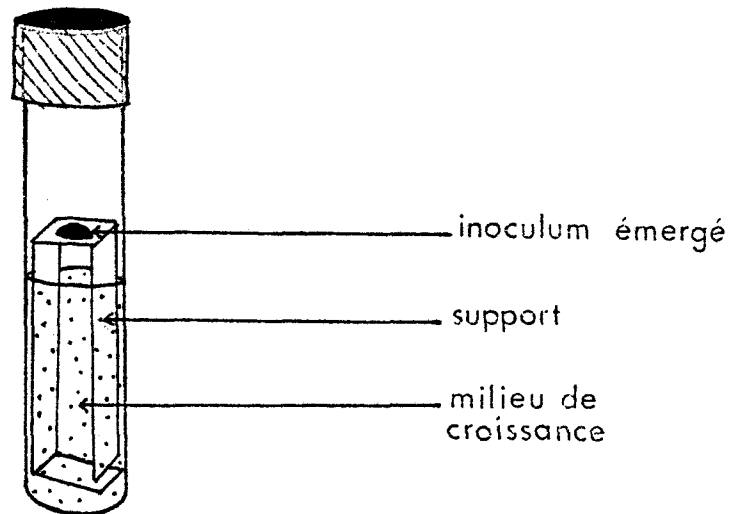


FIGURE 6 : DISPOSITIF DE CULTURE SUR PAPIER WHATMAN.

1.3.1.2 - Résultats

Seule la colonisation de surface (milieux gélosés et support en papier WHATMAN) permet l'obtention de cellules polymorphiques (80 à 100 %). Les inoculations en profondeur et les inoculations de milieux liquides sont sans effet sur la morphologie des cellules.

Ces observations sont identiques à celles obtenues avec la souche mutante IN8-25 (128, 129).

1.3.2 - Influence du gluconate

Pour la souche IN8-25, nous avons observé qu'aux concentrations faibles d'extrait de levure (< 3 g/l) il était nécessaire de fournir du gluconate aux cellules mutantes pour obtenir leurs déformations (tab. 2, p. 40). Par contre aux concentrations plus fortes (> 3 g/l), cet apport était accessoire. On pouvait croire à de telles réactions sur ce milieu N à base de NH_4NO_3 .

Nous avons donc cultivé plusieurs souches de *R. meliloti* sur le milieu N auquel on s'était abstenu de mettre du gluconate de potassium. Dans ce cas, cela revenait à utiliser le milieu minimum RHB₁. Nous avons comparé nos résultats avec les observations antérieures collectées dans le tableau :

- 1°) la plupart des souches ont une moins bonne croissance en absence du gluconate; la taille des clones peut être réduite de plus de la moitié ;
- 2°) dans les cas où la croissance sur boîte est fortement réduite, la qualité du pléiomorphisme est différente. Les bactéries comme celles de la souche M5N1 subissent des variations morphologiques moins importantes et ont allure de bâtonnets irréguliers ;
- 3°) dans les cas où l'effet soustractif du gluconate n'agit pas ou peu sur la croissance, le pléiomorphisme est toujours aussi marqué. Le comportement de la souche Ar16 sur un tel milieu est décrit dans la première colonne du tableau 5, p. 63.

1.3.3 - Effets de la source azotée

1.3.3.1 - Constitution des milieux

Nous avons déjà mis en évidence que la nature de la source azotée était importante dans l'expression du pléiomorphisme. En effet, si l'extrait de levure (1 g/l) ne permet pas la production de cellules anormales chez la souche sauvage M5N1, il n'en est pas de même pour le nitrate d'ammonium.

Ce sel peut agir de plusieurs façons :

- par l'intermédiaire de l'ion ammonium,
- par l'ion nitrate,
- par le couplage de ces 2 ions.

Nous avons cultivé la souche Ar16, qui se distingue par son pléiomorphisme important même sans gluconate, en présence de ces différents ions. Les concentrations utilisées représentent un apport en azote équivalent à celui du milieu N, c'est-à-dire 20 μ Mole/litre.

Le milieu de base (K_2HPO_4 ; $MgSO_4, 7H_2O$; Vitamines H et B_1) est additionné :

de KNO_3	2,525 g/l
ou de NH_4Cl	1,337 g/l
ou de {	KNO_3
	et
	NH_4Cl
	0,669 g/l

Les croissances et les observations microscopiques sont comparées avec celles obtenues avec les milieux à base de NH_4NO_3 (1 g/l) ou d'extrait de levure (1 g/l). Pour les numérations, les cellules des clones sont réémulsionnées dans du TNP et lavées.

1.3.3.2 - Résultats

Les milieux utilisés sont dépourvus de gluconate : l'effet déformant, les croissances, la viabilité des cellules sont donc essentiellement fonction de la source azotée (tab. 5).

Les meilleures croissances sont obtenues en présence de KNO_3 et d'extrait de levure (YE). Celles-ci sont en relation avec le pourcentage de pléiomorphisme (ou P%) : en effet, seuls ces 2 milieux ne présentent pas de cellules anormales.

NATURE DE L'OBSERVATION	COMPORTEMENT DE LA SOUCHE AR16 EN FONCTION DE LA SOURCE AZOTEE EN MILIEU GELOSE				
	NH ₄ NO ₃	NH ₄ Cl + KNO ₃	NH ₄ Cl	KNO ₃	Extrait de levure
Taille des clones	+	+	+	+++	+++
P %	80 à 100 %	80 à 100 %	80 à 100 %	0 %	0 %
Aspect des cellules	pléiomorphisme très marqué	pléiomorphisme moins marqué	pléiomorphisme et allongement des cellules	bâtonnets très courts et gonflés	bâtonnets courts
CV	0,76 x 10 ⁸	1,37 x 10 ⁸	0,46 x 10 ⁸	6,2 x 10 ⁸	5,8 x 10 ⁸

TABLEAU 5 : ETUDE DU COMPORTEMENT DE LA SOUCHE AR16 DE R. MELILOTI EN CROISSANCE SUR DIFFERENTS MILIEUX GELOSES (P % = pourcentage de pléiomorphisme ; CV = nombre de cellules viables par ml d'une suspension à D0 = 1,00).

L'ion NH_4^+ seul, ou associé à l'ion NO_3^- , semble la source azotée la plus favorable à une bonne expression du pléiomorphisme. Les viabilités cellulaires sont alors très faibles.

En supposant que les cellules cultivées sur KNO_3 soient viables à 100 % et en ne tenant pas compte de la différence de taille des cellules, on aurait :

- 93,55 % de viabilité en présence d'extrait de levure,
- 22,10 % en présence de NH_4Cl et de KNO_3 ,
- 12,25 % en présence de NH_4NO_3 ,
- 7,42 % en présence de NH_4Cl .

Le pléiomorphisme le plus spectaculaire est obtenu avec le nitrate d'ammonium.

1.4 - DISCUSSION

Notre étude sur milieu gélosé, portant sur les espèces de *Rhizobium* à croissance rapide et sur le genre *Agrobacterium* nous a permis de faire les remarques suivantes. :

1°) Le genre *Rhizobium*, suivant son comportement sur milieu N gélosé, peut être divisé en deux groupes :

- un groupe formé uniquement par les souches de *R. meliloti* et donnant 80 à 100 % de cellules pléiomorphiques lorsqu'elles sont cultivées sur ce milieu ;
- un groupe constitué par toutes les autres espèces de *Rhizobium* à croissance rapide (*R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*) qui donnent des cellules à morphologie normale sur ce même milieu. Seules 4 souches de *R. meliloti* (M1-5 ; 2004 ; A145 ; Ve26) échappent à cette règle.

2°) Le genre *Agrobacterium* est insensible à l'effet déformant provoqué par la culture sur le milieu N. Il se rapproche donc par cela du 2ème groupe de souches de *Rhizobium*.

3°) Le pourcentage de déformation sur boîte se traduit proportionnellement par une baisse de la viabilité cellulaire.

4°) Les principaux facteurs impliqués dans le pléiomorphisme sont :

- la nécessité de colonisation sur support solide ;
- l'apport de gluconate qui est parfois nécessaire à une croissance plus importante, elle-même essentielle semble-t-il à une meilleure expression du polymorphisme ;
- l'apport de nitrate d'ammonium qui, par la présence de NH_4^+ , entraîne la déformation des cellules en milieu gélosé et leur non viabilité. Les ions NO_3^- et l'extrait de levure n'ont de leur côté aucun effet.

Des auteurs travaillant aussi sur l'apparition de formes anormales en culture eurent des conclusions du même type.

SKINNER et coll. (168) avaient souligné le fait que seul *R. meliloti* (souche Su47) présentait peu de cellules aberrantes en présence de concentration élevée d'extrait de levure. *R. japonicum*, *R. lupini*, *R. trifolii* et une souche du "cowpea group" étaient particulièrement sensibles. La capacité de l'extrait de levure à former des bactéroïdes artificiels avait d'ailleurs déjà été mise en évidence chez *R. leguminosarum* par JORDAN et COULTER en 1965 (90).

Par ailleurs, Van BRUSSEL et coll. (186) qui étudiaient la composition des parois en fonction de la source azotée avaient remarqué que les cultures de *R. leguminosarum* (souche A171) présentaient un grand nombre de formes irrégulières en présence d'ammonium et non de nitrate ou d'extrait de levure en concentration normale.

URBAN (184) a constaté que des milieux enrichis en substrats carbonés, tels que le glucose et le succinate de sodium ainsi qu'en azote (casaminoacids et YE) entraînent l'apparition de formes pléiomorphiques de *R. trifolii* (souche 0403). On peut penser que le gluconate intervient d'une manière identique à celle du glucose et du succinate.

Enfin, PANKHURST et CRAIG (141) cultivant la souche 32H1 (souche du "cowpea group", fixant asymbiotiquement l'azote) dans de la gélose molle obtinrent des formes cellulaires anormales, soupçonnées de fixer l'azote.

La glutamine et l'ion NH_4^+ à raison de 2 μMole d'azote favorisent l'apparition des cellules pléiomorphiques et la fixation de l'azote. L'ion NO_3^- , appliqué à la même dose, a l'effet inverse. Cet anion se substituerait à l'oxygène de l'air, lui-même néfaste à ces deux phénomènes.

2. - EXPRESSION DU PLÉIOMORPHISME EN MILIEU LIQUIDE

La compréhension du pléiomorphisme nécessitait l'étude, une par une, des conditions nécessaires à son expression soit en les supprimant, soit en les modifiant. C'est ce qui a été fait dans les chapitres précédents.

Une méthode d'investigation plus approfondie consistait à "réinduire" la formation de cellules pléiomorphiques en l'absence d'un des paramètres. On pourrait ainsi cerner le mode d'action de celui-ci en découvrant le facteur de substitution.

Nous avons choisi de réaliser "l'induction" du polymorphisme en milieu liquide. Ceci afin de voir l'influence réelle de la croissance en colonie sur les malformations pariétales, mais surtout pour obtenir des conditions de travail plus satisfaisantes. En effet, la colonie bactérienne est un milieu difficile à étudier et à contrôler à cause de sa trop grande hétérogénéité. L'influence de l'évolution de la composition du substrat durant la croissance (épuisement en éléments nutritifs, accumulation de substances toxiques, variations de pH et d'humidité, ...) est différente pour chaque cellule d'un même clone, de part sa localisation dans celui-ci (149).

2.1 - INFLUENCE DU MAGNESIUM

2.1.1 - Mise en évidence de l'importance du magnésium

L'absence de cellules polymorphiques en milieu liquide pouvait s'expliquer de deux façons :

- ces cellules apparaissent brièvement en culture mais du fait de la fragilisation des structures pariétales, elles étaient rapidement lysées ;
- ces cellules n'apparaissent pas du tout.

La première hypothèse était la plus simple à vérifier. Nous avons cultivé la souche M5N1 sur différents milieux hypertoniques :

- milieu N + saccharose (0,5 M)
- milieu N + saccharose (0,5 M) + fructose (1 %)
- milieu N + mannitol (0,25 M) + sorbitol (0,25 M)

Le saccharose (0,5 M) est souvent employé pour stabiliser les sphéroplastes des bactéries à Gram négatif (118) ; le mannitol (0,25 M) et le sorbitol (0,25 M) ont été utilisés par GRESSHOFF et ROLFE (74b) pour maintenir en vie les bactéroïdes nodulaires.

Dans aucun de ces milieux protecteurs, la souche M5N1 ne donne de cellules anormales. Ce résultat était prévisible, car les cellules pléiomorphiques de *Rhizobium*, habituellement obtenues en milieu liquide, résistent plutôt bien aux pressions osmotiques du dit milieu (90, 168, 184).

Nous nous sommes donc tourné vers la deuxième hypothèse qui disait que les cellules anormales n'apparaissent pas. Nous avons recherché l'élément qui pouvait provoquer le pléiomorphisme en milieu liquide.

Là aussi, deux possibilités s'offraient à nous :

- soit ajouter des éléments nutritifs qui entraîneraient de nouveau le polymorphisme. C'est dans la bibliographie, la méthode la plus utilisée ;
- soit retirer des nutriments, présents dans le milieu N, mais non utilisables par les bactéries en milieu gélosé.

Nous nous sommes tout de suite dirigé vers cette deuxième voie car elle était la plus logique. En effet, le milieu N se suffit à lui-même pour "induire" le pléiomorphisme en présence d'agar. Il était donc inutile d'introduire de nouveaux substrats. On prenait, en outre, le risque de provoquer une induction d'une toute autre nature que celle qui nous intéresse et ainsi de s'orienter vers une mauvaise direction.

Ce qui semblait important dans la composition des milieux N et RHB₁ et susceptible d'agir sur les structures pariétales était le MgSO₄ · 7H₂O (0,2 g/l). En effet, le magnésium et d'autres cations bivalents sont indispensables au bon fonctionnement des enveloppes cellulaires (146).

Les cations bivalents habituellement utilisés pour la culture de *Rhizobium* sont le magnésium et le calcium, le plus souvent sous la forme de chlorure ou de sulfate. Il est difficile de trouver pourquoi, à l'origine, on a employé du magnésium dans la composition des milieux nutritifs de *Rhizobium* (133). Par exemple, WILSON en 1917 (195) ajouta 0,2 g/l de sulfate de magnésium simplement parce qu'il avait adopté une modification du milieu de ASHBY (6) pour la culture d'*Azotobacter*. Ce genre bactérien fixe librement l'azote atmosphérique et se rapproche ainsi du genre *Rhizobium*.

Les effets du magnésium et du calcium sur la physiologie de *Rhizobium* ont intéressé quelques équipes de chercheurs dans les années 1960. L'importance exacte du calcium dans l'alimentation de *Rhizobium* a été sujet à controverses (132b, 133, 188, 187b). L'apport de cet ion sous forme de traces, comme celles que l'on retrouve dans l'extrait de levure, apparaît suffisant. Par contre, le magnésium est essentiel à la vie des cellules rizo-biales et doit leurs être fourni en quantité non négligeable.

VINCENT (187b) a montré l'influence de ces deux cations sur la croissance de *Rhizobium* (taux de croissance, populations finales, viabilité des cellules). Il a aussi remarqué que des anomalies cytologiques étaient obtenues avec des cellules de *R. trifolii* déficientes en cations bivalents (188) : la suppression du calcium entraîne un gonflement des cellules ; le manque de magnésium se traduit par un allongement du corps cellulaire et par l'obtention de quelques formes branchées.

Ce sont ces observations qui nous ont poussé à étudier le comportement des cellules de *Rhizobium* en fonction de la concentration en magnésium.

2.1.2 - Etude chez les souches M5N1, Ar16, 2004 et F1

2.1.2.1 - Protocoles expérimentaux

Nous avons réalisé les 2 milieux de croissance suivants :

			K ₂ HPO ₄	1 g/l
K ₂ HPO ₄	1 g/l		NH ₄ NO ₃	1 g/l
Extrait de levure	1 g/l	et	Fructose	10 g/l
Fructose	10 g/l		Vitamine H	10 µg/l
			Vitamine B ₁	500 µg/l

Le sulfate de magnésium (MgSO₄,7H₂O) est soit totalement exempt des milieux, soit ajouté à raison de 5, 10, 20, 30, 40, 50 ou 100 mg/l. La concentration de ce sel, habituellement adoptée dans le laboratoire, est de 200 mg/l. Les souches utilisées sont :

- M5N1 et Ar16 qui sont 2 souches de *R. meliloti* dont les cellules se déforment lorsqu'elles sont cultivées sur le milieu N gélosé,
- la souche 2004 de *R. meliloti* et la souche F1 du genre *Agrobacterium* insensibles à l'effet déformant de ce même milieu.

Les différents milieux (5 ml) sont répartis dans des tubes de 16 x 160 mm, inoculés au 1/100 et placés sous agitation moyenne à 30°C. Les observations microscopiques et les mesures de densité optique à 600 nm sont effectuées en phase stationnaire.

2.1.2.2 - Résultats

Les mesures d'absorbance font état des croissances des souches M5N1, Ar16, 2004 et F1 en fonction de la concentration initiale de magnésium :

- sur les milieux à base d'extrait de levure (fig. 7),
- sur les milieux à base de nitrate d'ammonium (fig. 8).

1°) Souches M5N1 et Ar16 : le profil des courbes de densités optiques de ces souches est similaire pour les deux séries de milieux. Quand la source azotée est l'extrait de levure, on distingue nettement 3 zones :

- une zone en dessous de laquelle la croissance est presque nulle. Elle correspond aux concentrations inférieures à 30 mg/l de sulfate de magnésium ;
- une zone comprise entre 30 et 50 mg/l où la croissance est proportionnelle à la concentration de ce sel ;
- la zone supérieure à 50 mg/l où le magnésium de sulfate n'est plus limitant dans la croissance.

Lorsque le magnésium est limitant dans la croissance, le pourcentage de pléiomorphisme de ces 2 souches est maximum (80 à 100 %). Les cellules sont très polymorphiques (formes branchées et pseudosphéroplastiques).

Pour les milieux à base de NH_4NO_3 , ces trois zones sont moins nettes : tout d'abord parce que la croissance en absence de MgSO_4 est un peu plus forte qu'en présence d'extrait de levure ($\text{DO} = 0,30$ pour M5N1, au lieu de 0,10) ; ensuite parce que la croissance augmente faiblement en fonction de la concentration du sulfate de magnésium. Les observations au microscope montre que le pléiomorphisme est de 80 à 100 % pour la souche M5N1 aux concentrations faibles de MgSO_4 (≤ 20 mg/l) et de 50 à 80 % aux concentrations moyennes (de 20 à 50 mg/l). Les cellules de M5N1 et de Ar16 ont une morphologie anormale mais moins hétérogène qu'en présence d'extrait de levure.

2°) La souche 2004 a un comportement identique à la souche F1 en fonction des concentrations variables de sulfate de magnésium : la croissance et l'aspect des cellules ne sont pratiquement pas touchés par des doses faibles. Les densités optiques de ces 2 souches sont voisines de 1,40 lorsque la source azotée est l'extrait de levure (fig. 7) et de 0,40 en présence de nitrate d'ammonium (fig. 8). Les cellules ont invariablement l'aspect de bâtonnets très courts ou pseudococci. En absence totale de MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, on a parfois quelques cellules plus grosses, sphériques et très sombres.

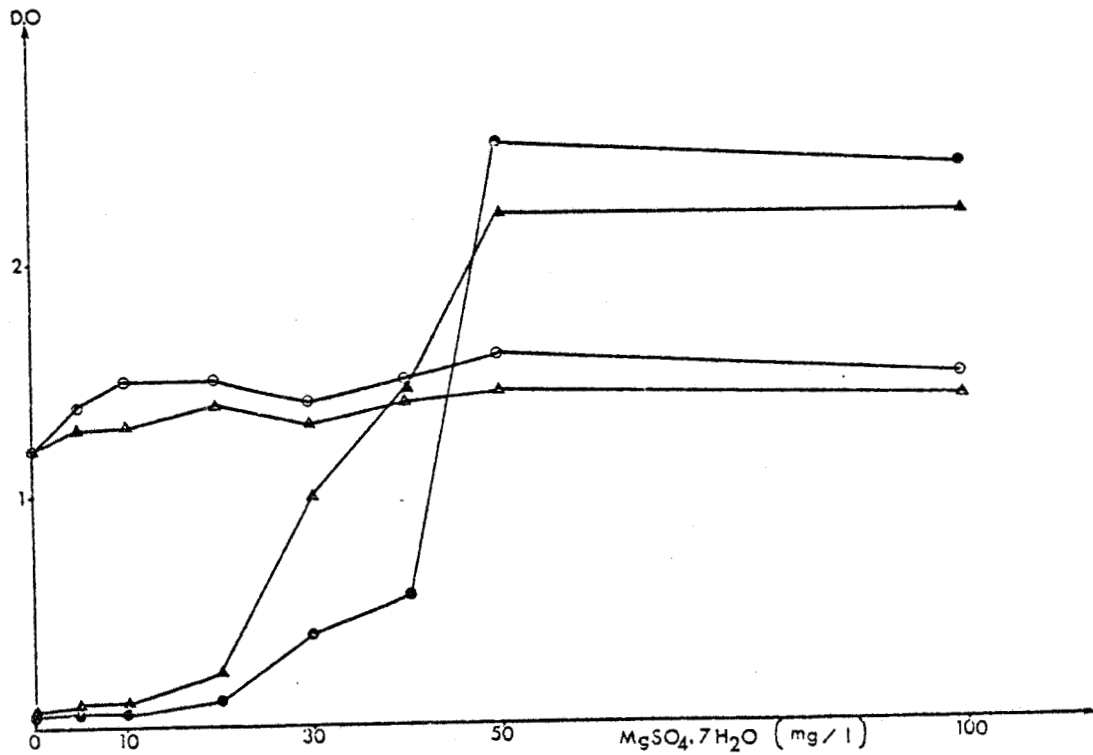


FIGURE 7 : DENSITES OPTIQUES DES SOUCHES M5N1 (▲), Ar16 (●), 2004 (△) ET F1 (○) APRES 72 h DE CULTURE SUR UN MILIEU A BASE D'EXTRAIT DE LEVURE ET EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SULFATE DE MAGNESIUM.

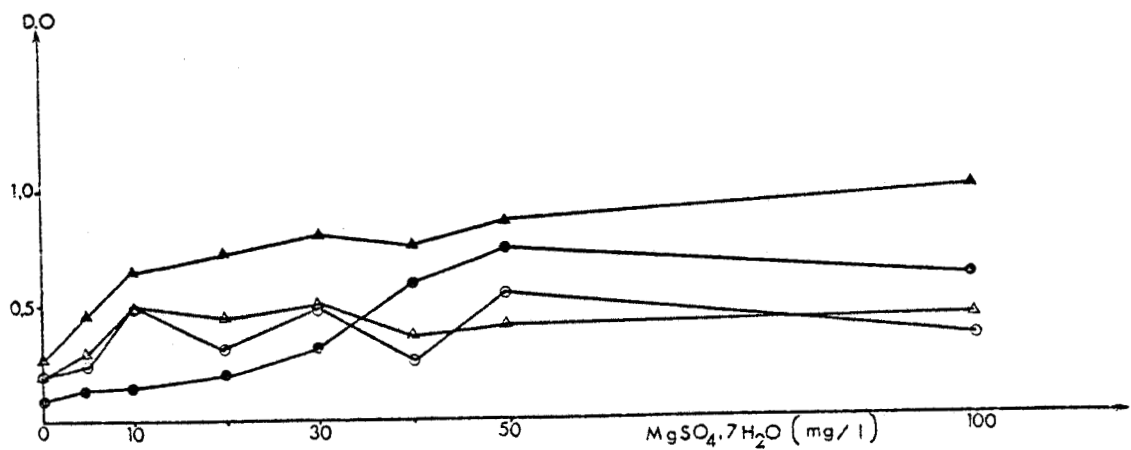


FIGURE 8 : DENSITES OPTIQUES DES SOUCHES M5N1 (▲), Ar16 (●), 2004 (△) ET F1 (○) APRES 72 h DE CULTURE SUR UN MILIEU A BASE DE NITRATE D'AMMONIUM ET EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE SULFATE DE MAGNESIUM.

Il est à noter que ces 2 souches flocculent dans tous les milieux utilisés, causant des fluctuations dans les mesures d'absorbance. L'importance du flocculat diminue avec la concentration en magnésium.

2.1.2.3 - Discussion

Dans cette manipulation, on distingue deux types de souches :

- celles dont la carence en magnésium empêche la croissance et entraîne le pléiomorphisme,
- celles dont le magnésium n'est pas un facteur limitant de la croissance.

Ces 2 classes sont apparemment formées par les mêmes lots de souches, déjà caractérisés par l'obtention ou non de formes aberrantes sur le milieu N gélosé. Cette similitude de regroupement et de comportement est singulière.

A ce stade, il était indispensable de tester toutes les autres souches de *R. meliloti* et du genre *Agrobacterium*. Ceci afin de vérifier l'existence d'une telle analogie entre le comportement sur milieu N gélosé et la carence en magnésium.

2.1.3 - Généralisation de l'étude à l'espèce *R. meliloti* et au genre *Agrobacterium*

2.1.3.1 - Milieux à base d'extrait de levure

L'effet de la carence en magnésium en présence d'YE a été étudié sur :

- les 22 souches de *R. meliloti* de notre soucier qui se déforment sur le milieu N gélosé (fig. 9, 10, 11),
- les 4 souches de *R. meliloti* (fig. 12) et les 7 souches du genre *Agrobacterium* (fig. 13) insensibles à l'effet déformant de ce milieu.

Les densités optiques sont celles des cultures de 5 ml réalisées en tube de 16 x 160 mm après 72 h d'incubation à 30°C et sous agitation.

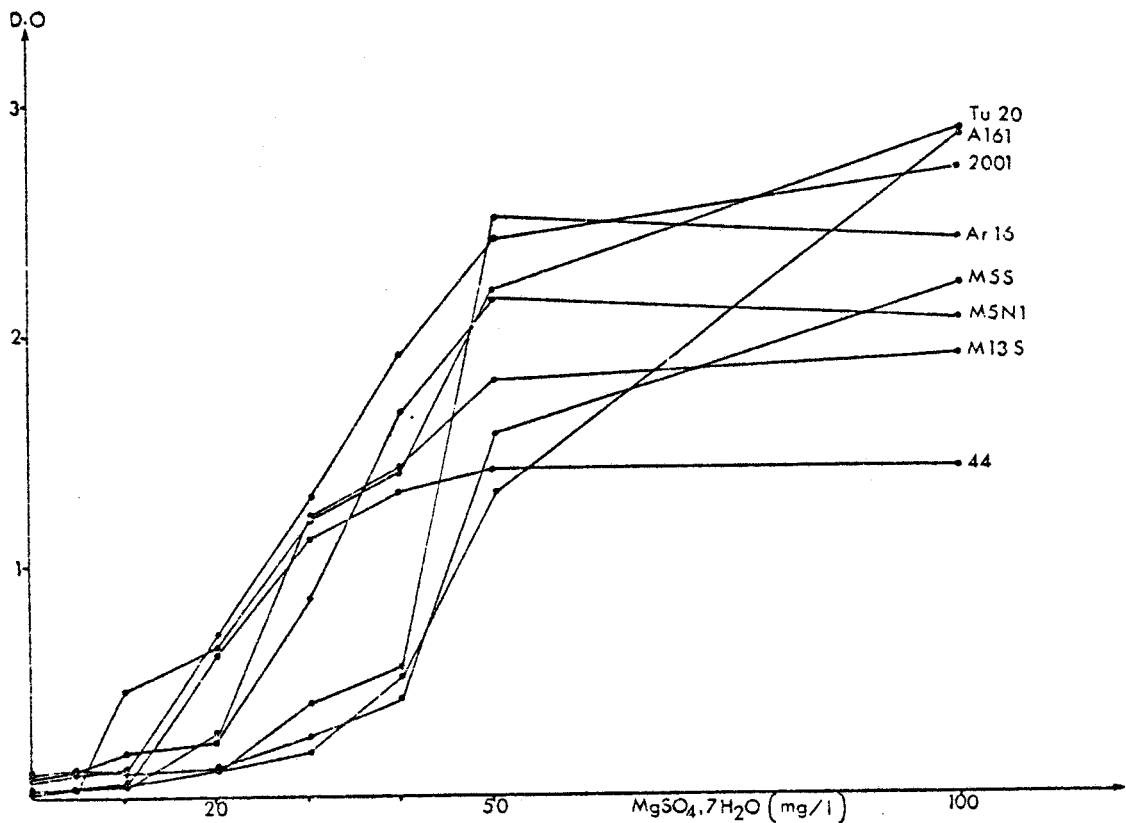


FIGURE 9 : CROISSANCE DE PLUSIEURS SOUCHES DE *R. MELILOTI* EXIGEANTES EN MAGNESIUM APRES 72 h D'INCUBATION DANS UN MILIEU A BASE D'EXTRAIT DE LEVURE ET SUBISSANT DES VARIATIONS DE SULFATE DE MAGNESIUM.

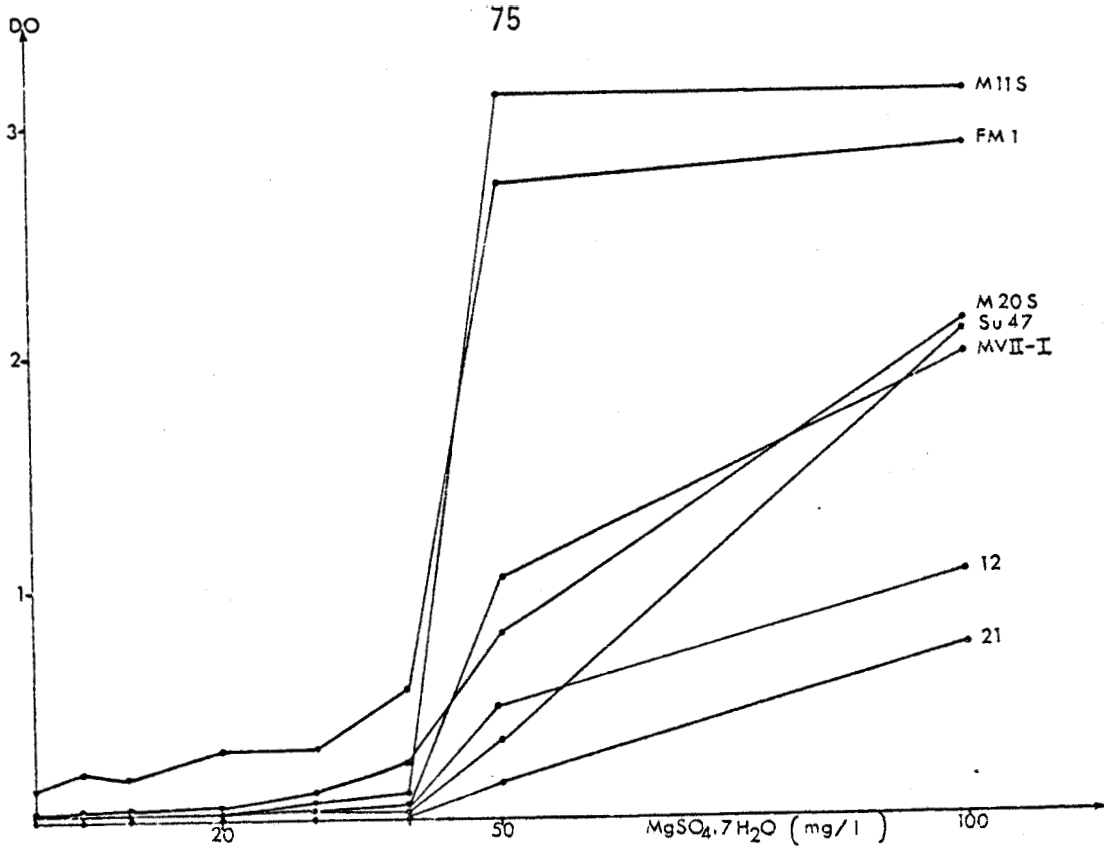


FIGURE 10 : idem Figure 9 .

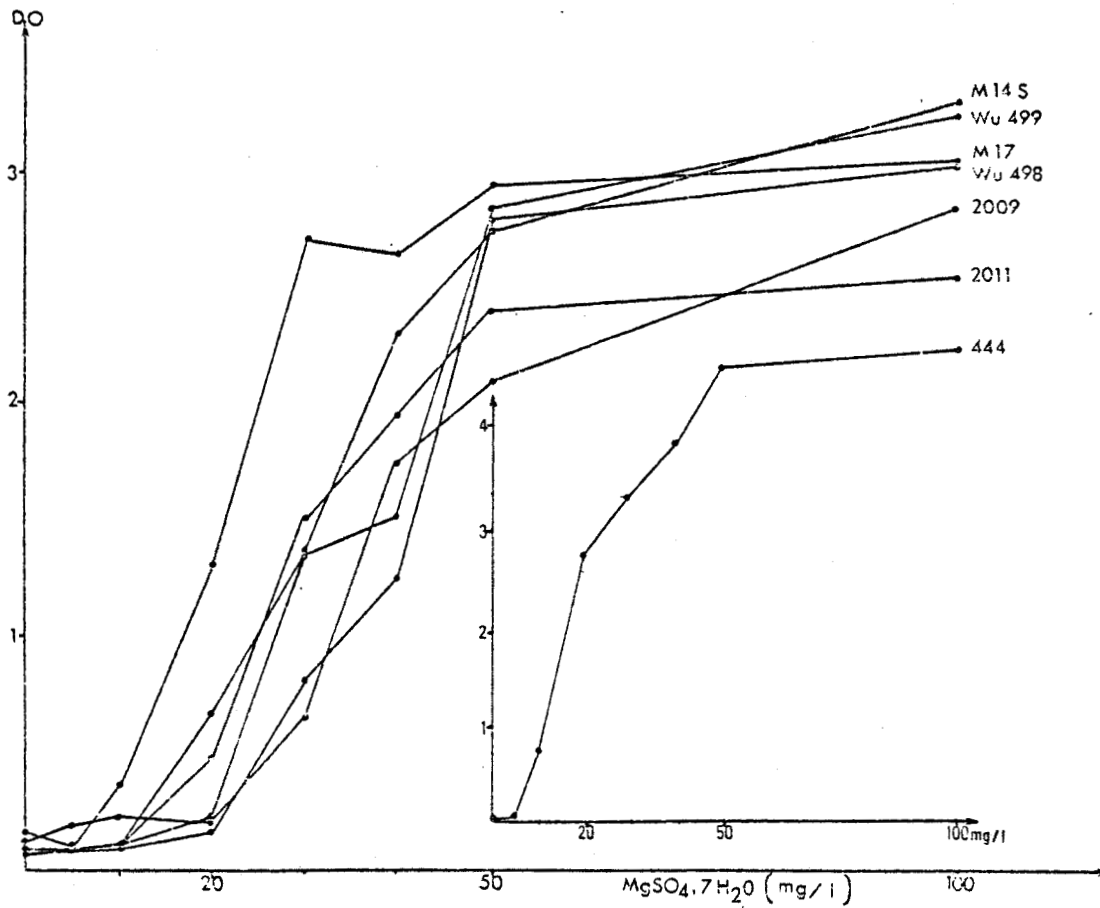


FIGURE 11 : idem Figure 9.

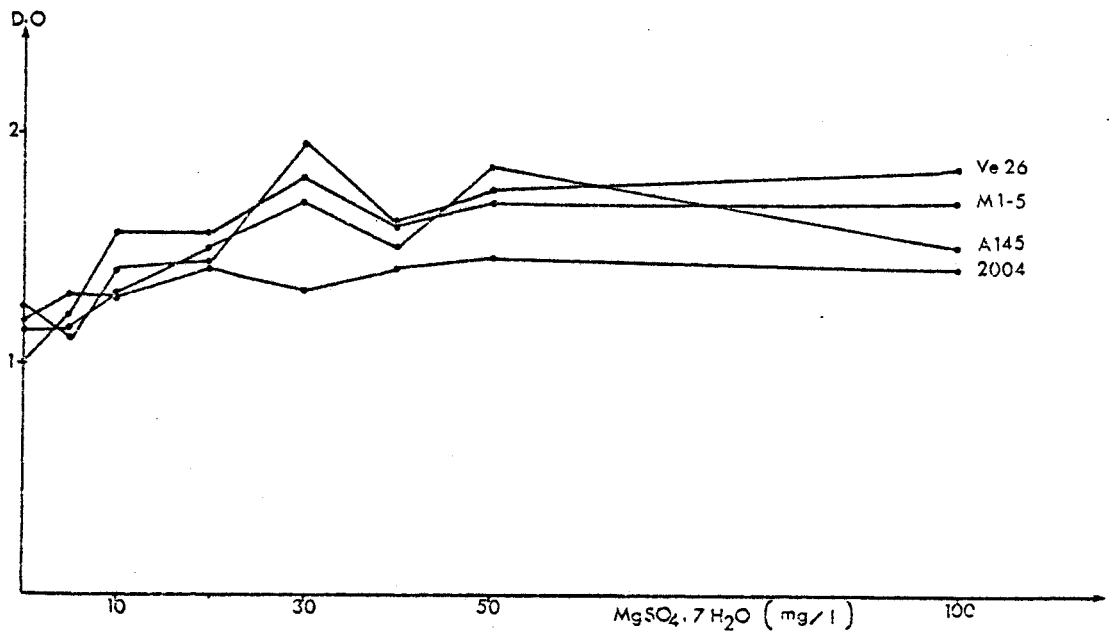


FIGURE 12 : CROISSANCE DE PLUSIEURS SOUCHES DE *R. MELILOTI*, NON EXIGEANTES EN MAGNESIUM. LES CONDITIONS D'INCUBATION SONT IDENTIQUES A CELLES DE LA FIGURE 9.

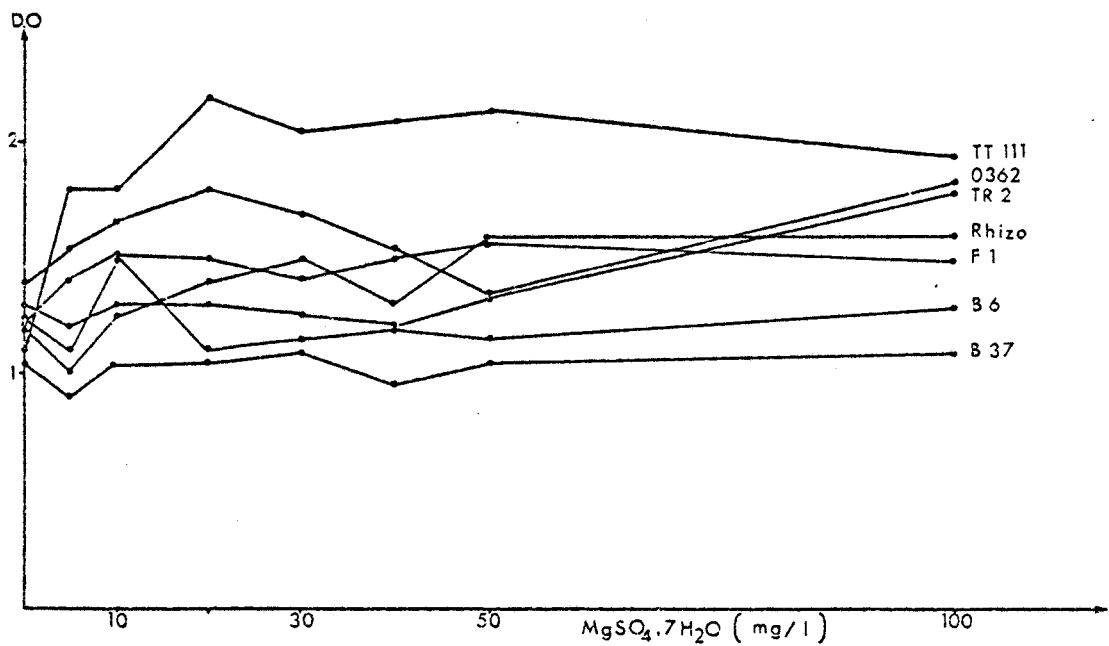


FIGURE 13 : CROISSANCE DE DIFFERENTES SOUCHES DU GENRE *AGROBACTERIUM*. LES CONDITIONS D'INCUBATION SONT IDENTIQUES A CELLES DE LA FIGURE 9.

2.1.3.2 - Milieux à base de nitrate d'ammonium

Seules quelques souches, représentatives de chaque groupe sont utilisées. Les conditions d'incubation sont les mêmes que précédemment, sauf que la source d'azote est constituée par le nitrate d'ammonium (fig. 14, 15).

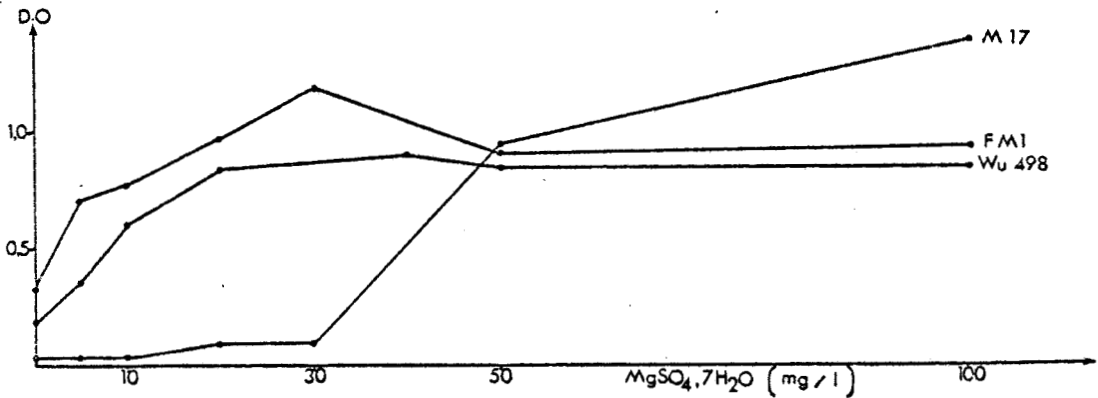


FIGURE 14 : CROISSANCE DE TROIS SOUCHES DE *R. MELILOTI*, EXIGEANTES EN MAGNESIUM, APRES 72 h D'INCUBATION DANS UN MILIEU A BASE DE NITRATE D'AMMONIUM ET SUBISSANT DES VARIATIONS DE SULFATE DE MAGNESIUM.

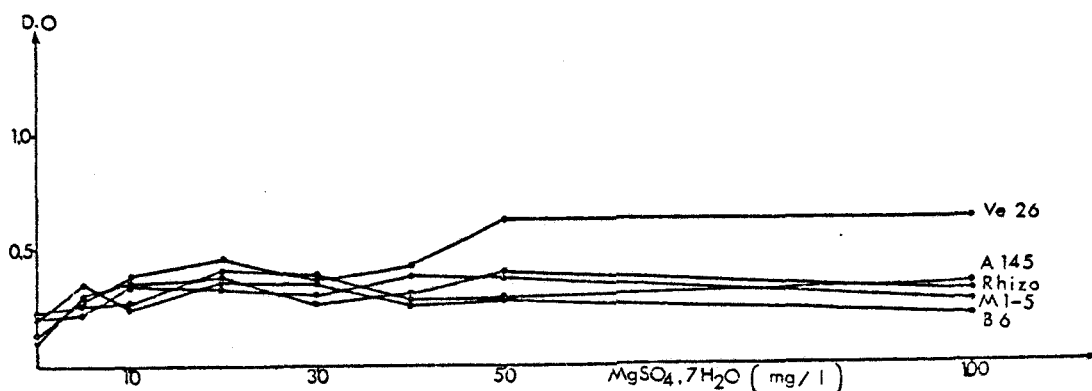


FIGURE 15 : CROISSANCE DE DIFFERENTES SOUCHES DE *R. MELILOTI* ET D'*AGROBACTERIUM*, NON EXIGEANTES EN MAGNESIUM. LES CONDITIONS D'INCUBATION SONT LES MEMES QUE POUR LA FIGURE 14.

2.1.3.3 - Resultats

1°) Sur ces différents milieux, le comportement des souches se déformant sur milieu N gélosé est identique à celui des souches M5N1 et Ar16 précédemment décrites. Le pourcentage de pléiomorphisme de plusieurs de ces souches a été déterminé au microscope en fonction de la concentration en $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et de la source azotée (tab. 6). En général, il n'y a plus ou très peu de pléiomorphisme aux concentrations supérieures à 50 mg/l. Cette valeur limite est à peu près identique lorsque la source azotée est l'extrait de levure ou le nitrate d'ammonium. Dans ce dernier type de milieu, on peut obtenir des pourcentages de pléiomorphisme intermédiaires pour des concentrations de sulfate de magnésium moyennes.

2°) De même, toutes les souches ne se déformant pas sur le milieu N gélosé se comportent pareillement aux souches 2004 et F1.

SOUCHES	SOURCES D'AZOTE	POURCENTAGE DE PLEIOMORPHISME											
		0	5	10	20	30	40	50	100	200			
M5N1	YE	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	< 1	0	0
	NH ₄ NO ₃	80-100	80-100	80-100	80-100	50-80	30-50	< 1	0	0	< 1	0	0
AR16	YE	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	< 5	< 1	0
	NH ₄ NO ₃	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	50-80	< 1	0
M17	YE	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	10-30	< 1	0
	NH ₄ NO ₃	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	50-80	< 10	0
Mu498	YE	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	< 1	< 1	0
	NH ₄ NO ₃	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	30-50	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	0
FM1	YE	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	< 1	< 1	0
	NH ₄ NO ₃	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	80-100	50-80	< 10	0	0	0	0

TABLEAU 6 : EVOLUTION DU POURCENTAGE DE PLEIOMORPHISME DE 5 SOUCHES DE R. MELLLOTTI EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN MgSO₄, 7H₂O ET DE LA SOURCE D'AZOTE UTILISEE.

2.1.4 - Discussion

Il existe effectivement un rapport entre le comportement des souches de *R. meliloti* et d'*Agrobacterium* sur le milieu N gélosé et celui des milieux carencés en magnésium :

- d'une part, une souche qui se déforme sur le milieu N gélosé ne poussera pas sans sulfate de magnésium. Inversement, une souche qui ne se déforme pas sur ce milieu gélosé, semble pouvoir se dispenser de l'apport de ce sel pour sa croissance. Les 34 souches testées suivent cette règle ;
- d'autre part, la déficience en magnésium des cellules en culture liquide se traduit par les mêmes manifestations qu'une croissance sur N gélosé : une organisation interne bouleversée et des structures pariétales modifiées.

Il est donc possible que sur le milieu N gélosé, les bactéries ne puissent plus utiliser le magnésium. Cette déficience serait à l'origine de la désorganisation des structures pariétales, empêchant les cellules de se diviser.

Le blocage de la division cellulaire se voit à 2 occasions :

- les cellules déformées obtenues sur N gélosé ne peuvent redonner de colonies (voir chapitre 1.2) ;
- en milieu liquide, exempt de magnésium, l'apparition de pléiomorphisme est synonyme d'un arrêt de la croissance (DO faible).

La non utilisation du magnésium en milieu gélosé n'est pas dû à l'ion sulfate. La substitution des 0,2 g/l de sulfate de magnésium, représentant 0,81 μ Mole de magnésium, par l'équivalent en chlorure de magnésium (0,165 g/l) ne modifie en rien le comportement de la souche Ar16 en milieu N gélosé (tab. 7).

COMPOTEMENT DE LA SOUCHE Ar16	NATURE DU SEL DE MAGNESIUM ENTRANT DANS LA COMPOSITION DU MILIEU N GELOSE	
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	MgCl ₂ , 6H ₂ O
P%	80 à 100 %	80 à 100 %
CV	0,76 x 10 ⁸	0,27 x 10 ⁸

TABLEAU 7 : INFLUENCE DE LA NATURE DU SEL DE MAGNESIUM SUR LE POURCENTAGE DE PLEIOMORPHISME (P%) ET SUR LA VIABILITE DES CELLULES (CV) DE LA SOUCHE Ar16.

Deux constatations sont importantes.

1°) Un milieu N gélosé et un milieu N liquide, ayant la même concentration initiale de sulfate de magnésium (200 mg/l) entraîne dans un cas le pléiomorphisme et dans l'autre non.

Au sein du clone, il y aurait :

- soit un épuisement local du magnésium dû à la masse cellulaire utilisant simultanément ce nutriment ;
- soit une modification du métabolisme causée par les conditions de croissance spécifiques au milieu N gélosé (accumulation de certains déchets, acidification, anaérobiose, ...) et dont la principale conséquence serait la non assimilation du magnésium par les cellules.

Deux observations tendent à appuyer cette dernière hypothèse :

- un milieu gélosé à base de nitrate d'ammonium contenant 100 fois plus de sulfate de magnésium (81 μMoles de magnésium au lieu de 0,81 μMoles) provoque toujours la déformation de la souche Ar16. Une telle concentration a seulement pour effet de réduire la croissance des clones ;

- un milieu gélosé à base d'extrait de levure auquel on n'a pas ajouté de sulfate de magnésium n'induit pas la formation de cellules polymorphiques chez la souche Ar16. Il n'y a pas de répercussion sur la taille des clones. Les traces de magnésium ou d'autres nutriments de substitution (par exemple d'autres cations bivalents...), fournis par l'extrait de levure, suffisent pour permettre un développement normal des cellules et des colonies.

2°) L'autre remarque importante est que le pléiomorphisme sur milieu gélosé est spécifique à la présence de NH_4NO_3 et surtout de l'ion NH_4^+ . Mais ce n'est pas le cas en milieu liquide, car lorsque la source d'azote est représentée par l'extrait de levure et que les cellules sont carencées en magnésium, il y a aussi apparition du pléiomorphisme. Donc celui-ci est essentiellement la réaction d'une cellule privée de magnésium, quelque soit la source d'azote. Ce manque est d'origine externe dans les milieux exempts de magnésium ou interne dans le milieu N gélosé.

Les conditions d'oxygénation au sein des clones en croissance sur le milieu N sont peut-être à l'origine de ce phénomène.

PANKHURST et CRAIG (141) avaient déjà noté l'influence de l'oxygène sur le pléiomorphisme de la souche 32H1. De plus, dans le nodule, le bactéroïde emprisonné par la membrane de séquestration se trouve lui aussi dans un environnement très appauvri en oxygène. C'est d'ailleurs, grâce à cela qu'il peut fixer l'azote.

Nous avons eu, de notre côté, des résultats dont la signification était similaire.

Des cultures statiques de la souche M5N1 ont été réalisées dans des flacons hermétiques où l'atmosphère et la surface d'échange étaient réduites au maximum. Lorsque le milieu RHB₁ contient du sulfate de magnésium à la concentration de 50 mg/l, il y a apparition, dans de telles conditions d'oxygénation, d'un certain nombre de cellules anormales (10 %) et une baisse de la viabilité ($0,75 \times 10^9$ bactéries/ml de suspensions à DO = 1,00). Il semblerait qu'une oxygénation réduite augmente le seuil limitant de la concentration en magnésium.

2.2 - ETUDE DE LA CROISSANCE EN MILIEU MINIMUM, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE SULFATE DE MAGNESIUM

Les travaux de VINCENT (188, 187b) nous signalaient que des concentrations limitantes en cations bivalents avaient des répercussions sur le taux de croissance, le nombre de cellules en phase stationnaire, la viabilité et la morphologie des cellules de *R. trifolii*.

Nous nous sommes proposé de comparer ces résultats avec :

- 2 souches de *R. meliloti* : la souche M5N1 habituellement utilisée au laboratoire et se déformant sur milieu N gélosé et la souche M1-5 dont la morphologie est invariable ;
- la souche B6 d'*Agrobacterium*, insensible à l'effet déformant du milieu N gélosé.

Le fait de travailler avec ces trois souches peut avoir un intérêt taxonomique.

Les cellules sont cultivées dans 100 ml de milieu à base de NH_4NO_3 , exempt de gluconate et avec des concentrations de 0, 10, 30, 50 ou 100 mg/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Les cultures sont réalisées dans des fioles de 300 ml placées à 30°C et sous agitation rotative moyenne. Des prélèvements sont effectués pendant 4 jours pour les numérations, les examens microscopiques, les mesures d'absorbance et de pH.

2.2.1 - Etude de la souche M5N1

2.2.1.1 - Pléiomorphisme et viabilité

Le tableau 8 permet de suivre l'évolution du pourcentage de pléiomorphisme de la souche M5N1, selon la concentration en sel de magnésium.

Dans le milieu totalement dépourvu de magnésium, le pléiomorphisme atteint déjà 50 à 80 % après 10h de culture et 80 à 100 %

après 20 h. Le maximum de déformation est obtenu après 24 h de culture dans le milieu contenant 10 mg/l de sulfate de magnésium et après 31 h dans le milieu à 30 mg/l. Au-dessus de cette concentration, le sulfate de magnésium n'agit plus sur la morphologie cellulaire.

TEMPS DE CULTURE	POURCENTAGE DE PLEIOMORPHISME				
	CONCENTRATION EN $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (mg/l)				
	0	10	30	50	100
10 h	50-80	< 20	< 5	< 1	0
15 h	50-80	30-50	10-30	< 1	0
20 h	<u>80-100</u>	50-80	30-50	< 1	0
24 h	80-100	<u>80-100</u>	30-50	< 1	0
31 h	80-100	80-100	<u>50-80</u>	< 1	0
47 h	80-100	80-100	50-80	< 1	0

TABLEAU 8 : EVOLUTION DU POURCENTAGE DE PLEIOMORPHISME DES CELLULES DE M5N1 EN CROISSANCE SUR NH_4NO_3 ET EN PRESENCE DE CONCENTRATIONS VARIABLES DE $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Lorsque l'on compare le tableau 8 et le tableau 9, on s'aperçoit que la viabilité des cellules est directement en rapport avec le pléiomorphisme de celles-ci. Pour la souche M5N1, un pléiomorphisme nul se traduit par un nombre de bactéries supérieur à 10^9 /ml ; un pléiomorphisme intermédiaire par un nombre compris entre 0,4 et $0,7 \times 10^9$ /ml, un pléiomorphisme de 80 à 100 % pour une valeur inférieure à $0,3 \times 10^9$ bactéries/ml.

Il est à remarquer que lorsqu'une population atteint le pourcentage de pléiomorphisme maximum, la chute de la viabilité a lieu 12 à 24 h après.

TEMPS DE CULTURE	NOMBRE DE CELLULES VIABLES $\times 10^9$ /ml A DO = 1,00				
	CONCENTRATION EN $MgSO_4, 7H_2O$ (mg/l)				
	0	10	30	50	100
10 h	0,67	0,59	0,57	1,04	1,22
15 h	0,41	0,60	0,57	1,43	2,16
20 h	0,36	0,48	0,54	1,72	2,18
24 h	0,28	0,46	0,55	1,68	2,56
31 h	0,24	0,41	0,60	1,98	2,77
47 h	0,16	0,31	<u>0,39</u>	<u>1,96</u>	<u>2,95</u>
71 h	0,16	0,23	0,30	1,84	2,69
94 h	0,15	0,21	0,28	1,66	2,23

TABLEAU 9 : VIABILITE DES CELLULES DE M5N1 EN CROISSANCE SUR NH_4NO_3 ET EN PRESENCE DE CONCENTRATIONS VARIABLES DE $MgSO_4, 7H_2O$.

Pour les concentrations de 50 et 100 mg/l, il n'y a pas ou très peu de pléiomorphisme. Pourtant le rapport cellules viables/DO du tableau 9 baisse après 3 j de culture. Ceci est imputable à l'agrandissement du corps bactérien et à la synthèse d'exopolysaccharides des cellules en phase stationnaire de croissance (33).

2.2.1.2 - Croissance

Lorsque les populations atteignent le pourcentage de pléiomorphisme maximum (20 h, 24 h et 31 h pour les concentrations respectives de 0, 10 et 30 mg/l de $MgSO_4, 7H_2O$) les courbes de densités optiques (fig. 16) amorcent un début de rupture de pente et les cultures sont en fin de phase exponentielle de croissance (fig. 17).

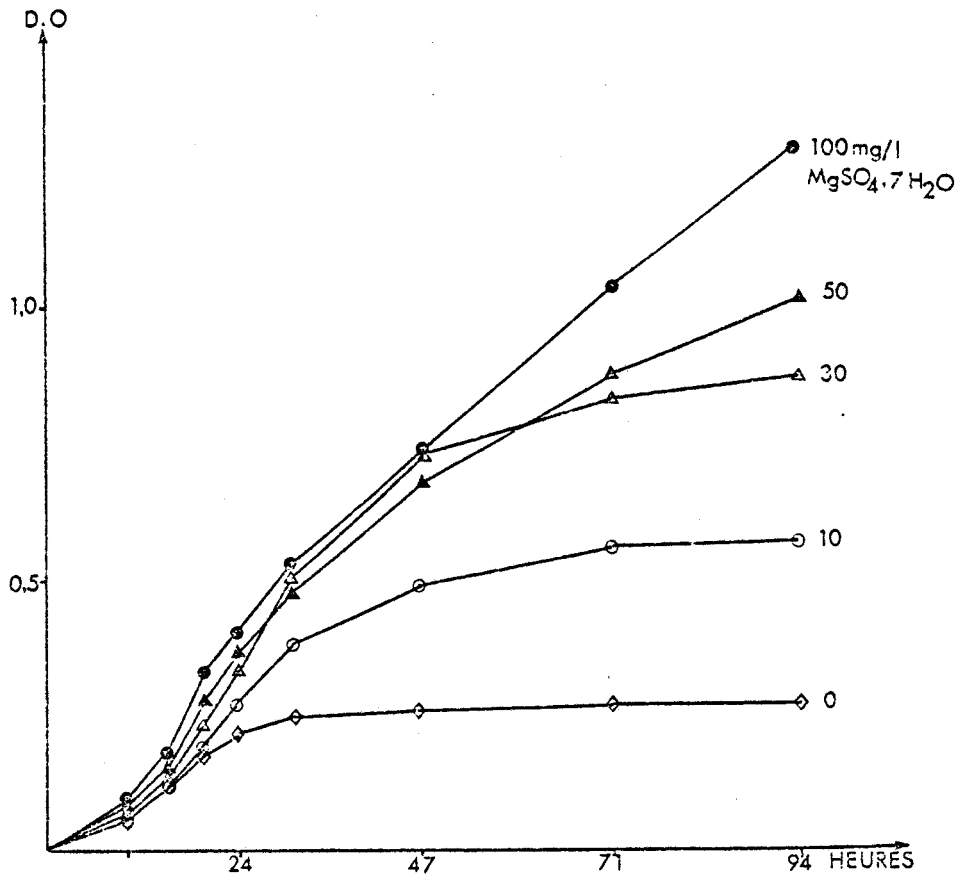


FIGURE 16 : EVOLUTION DES DENSITES OPTIQUES (D.O) DES CULTURES DE M5N1 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. LA SOURCE AZOTEE EST NH_4NO_3 .

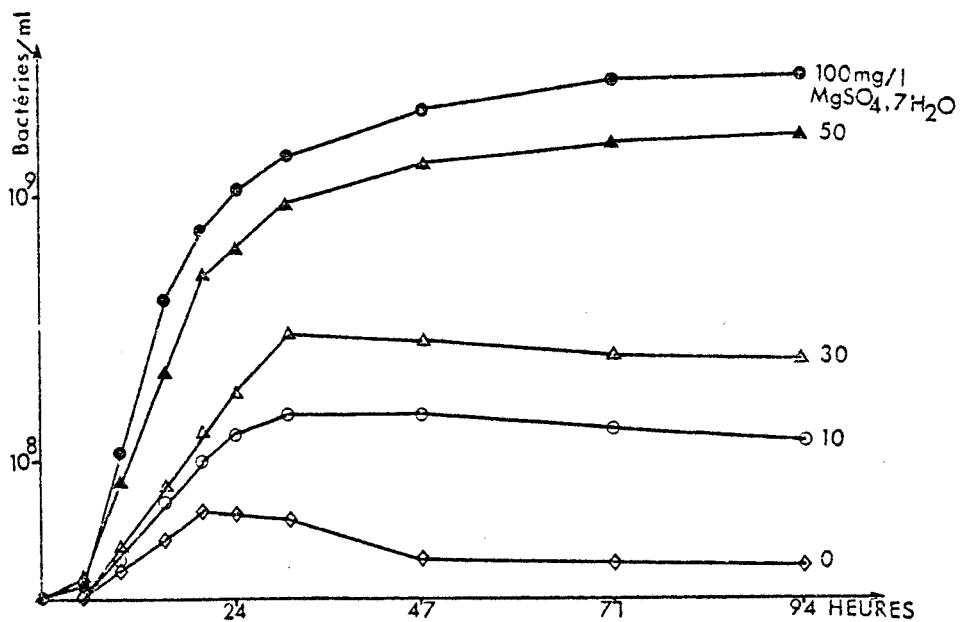


FIGURE 17 : EVOLUTION DU NOMBRE DE GERMES VIABLES DE LA SOUCHE M5N1 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. LA SOURCE AZOTEE EST NH_4NO_3 .

Le nombre de cellules viables (déduit par numération) et le nombre total de cellules (estimé par absorbance) sont proportionnels à la concentration initiale en sel de magnésium.

Dans les milieux à concentration faible de MgSO_4 (10 et 30 mg/l), les populations sont hétérogènes et formées par des cellules potentiellement viables (bactéries en bâtonnet) et par des cellules non revivifiables (bactéries déformées). On a tout de même une phase exponentielle de croissance d'où l'on peut extraire un taux de croissance. Le tableau 10 nous montre que μ augmente avec la concentration en magnésium.

PARAMETRES DE CROISSANCE	CONCENTRATION EN $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (mg/l)			
	10	30	50	100
μ	0,13	0,16	0,26	0,37
Temps de génération	461 mn	375 mn	230 mn	162 mn

TABLEAU 10 : EVOLUTION DES PARAMETRES DE CROISSANCE DE LA SOUCHE M5N1 SUR NH_4NO_3 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$.

2.2.1.3 - pH

La croissance de la souche M5N1 en présence de fructose se traduit par une acidification du milieu minimum (tab. 11). Lorsque la croissance est faible (0 et 10 mg/l de MgSO_4), l'acidification est elle aussi faible.

L'électrophorèse sur papier ne permet pas de révéler la production d'acide 2 céto-gluconique qui est généralement à l'origine de la diminution du pH (83).

TEMPS DE CULTURE	pH DES CULTURES DE M5N1 SUR NH ₄ NO ₃				
	CONCENTRATION EN MgSO ₄ , 7H ₂ O (mg/l)				
	0	10	30	50	100
0	7,10	7,00	6,95	7,30	7,25
71 h	7,00	6,50	6,00	6,15	6,20

TABLEAU 11 : EVOLUTION DES pH DES CULTURES DE M5N1 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN MgSO₄, 7H₂O. LA SOURCE AZOTEE EST NH₄NO₃.

2.2.1.4 - Discussion

Dans l'ensemble, les résultats obtenus avec la souche M5N1 correspondent à ceux de VINCENT (188, 187b) A savoir :

- un seuil de magnésium en dessous duquel on n'a qu'une très faible croissance et des répercussions sur la morphologie cellulaire. Dans le cas de la souche M5N1, les anomalies morphologiques sont beaucoup plus importantes que chez les souches de *R. trifolii* utilisées par VINCENT ;
- une croissance finale et un pourcentage de cellules viables proportionnels à la concentration de magnésium.

Par contre, VINCENT affirmait que le taux de croissance était indépendant de la concentration en Mg²⁺. Ceci tient au fait qu'il les déterminait par densités optiques. En effet, dans ce cas, les courbes de D₀ (fig. 16) se recouvrent jusqu'à 47 h pour les concentrations de 30, 50 et 100 mg/l de MgSO₄. On aurait donc pour ces 3 concentrations une vitesse de croissance identique. Par contre, si l'on se fie aux taux de croissance déterminés par numérations, de nettes différences apparaissent. Au point que, après 2 j de culture, il y a en présence de 30 mg/l de sulfate de magnésium 5 fois moins de bactéries viables qu'en présence de 50 mg/l et 7 fois moins qu'en présence de 100 mg/l (tab. 9).

De nos résultats, il se dégage quelque chose de nouveau : il existe un temps de latence (environ 24 h) entre la réalisation du pléiomorphisme d'une cellule et sa non revivification.

2.2.2 - Etudes des souches M1-5 et B6

Ces deux souches, pourtant d'origine différente, montre une grande similitude de comportement dans les milieux à concentration variable de MgSO_4 .

Le fait que ces 2 souches floquent en fin de phase exponentielle (après 15 h de culture) rend difficilement interprétable l'ensemble des résultats.

2.2.2.1 - Viabilité des cellules

Le pourcentage de pléiomorphisme des souches M1-5 et B6 est nul quelque soit la concentration de sulfate de magnésium, ce qui se traduit par une forte viabilité des cellules (tab. 12) :

- 2×10^9 bactéries $\text{ml}^{-1}/\text{DO} = 1,00$ pour la souche M1-5, ce qui équivaut à la souche M5N1 cultivée en présence de 100 mg/l de MgSO_4 ;
- 3×10^9 bactéries $\text{ml}^{-1}/\text{DO} = 1,00$ pour la souche B6.

Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus en milieux gélosés (tab. 4 , p.58).

NOMBRE DE CELLULES VIABLES x 10 ⁹ /ml A DO = 1,00					
SOUCHES	CONCENTRATION EN MgSO ₄ , 7H ₂ O (mg/l)				
	0	10	30	50	100
M1-5	1,59	3,87	2,25	1,13	2
B6	2,76	3,03	3,19	3,85	2,8

TABLEAU 12 : VIABILITE DES CELLULES DE M1-5 ET B6 APRES 72 h DE CROISSANCE EN PRESENCE DE CONCENTRATIONS VARIABLES DE MgSO₄, 7H₂O ; LA SOURCE AZOTEE EST NH₄NO₃.

2.2.2.2 - Croissance

Le bombement des courbes de DO (fig. 18 et 20) et des courbes de numérations (fig. 19 et 21) est consécutif à l'agrégation des cellules.

En général, les souches M1-5 et B6 ont un développement faible dans ce type de milieu (DO = 0,50 pour 1 à 1,5 x 10⁹ bactéries/ml). Il existe de petites différences entre chaque condition expérimentale, mais celles-ci ne sont pas véritablement en relation avec la concentration de sulfate de magnésium.

En absence total de MgSO₄, il semble qu'il y ait un développement plus faible de la croissance (DO = 0,20) mais le nombre final de germes représente tout de même 10 fois l'inoculum.

A l'opposé du faible développement, on a un taux de croissance très élevé pour chacune des deux souches (tab. 13), et nettement supérieur à celui de la souche M5N1. Celui-ci est constant, quelque soit la concentration de sulfate de magnésium.

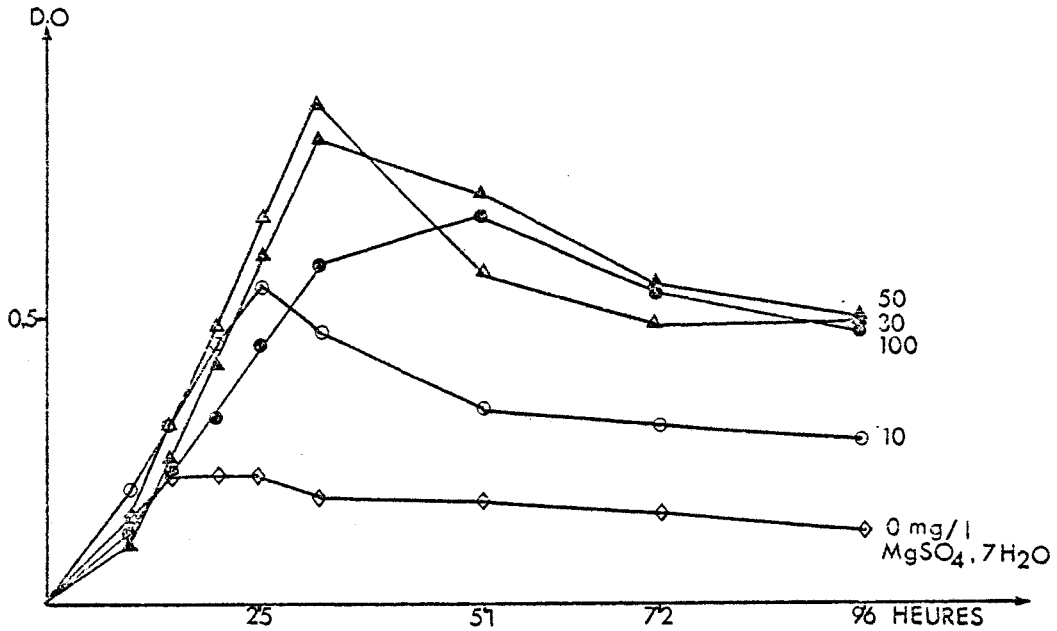


FIGURE 18 : EVOLUTION DES DENSITES OPTIQUES (D.O) DES CULTURES DE M1-5 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. LA SOURCE AZOTEE EST NH_4NO_3 .

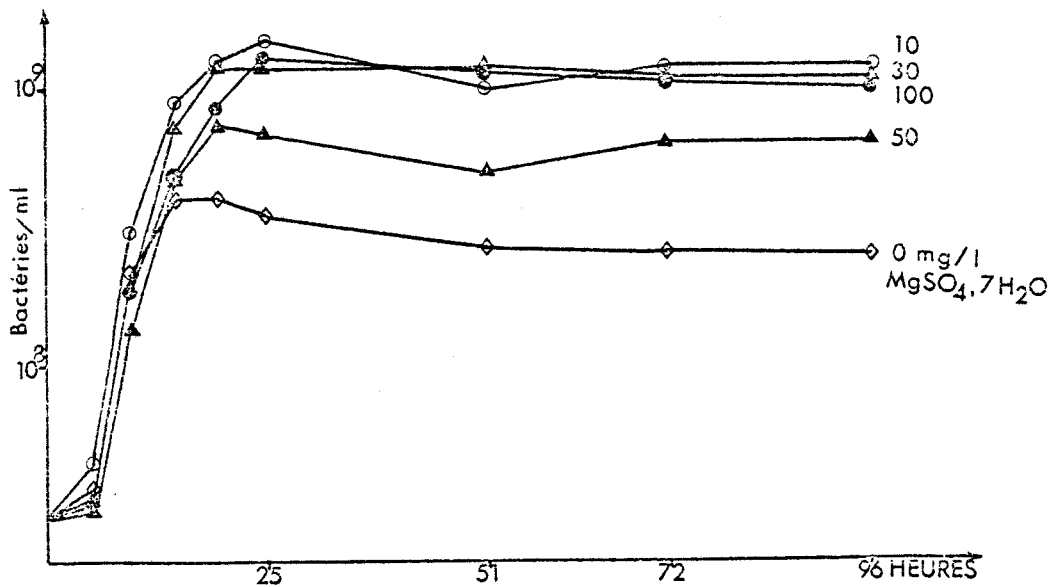


FIGURE 19 : EVOLUTION DU NOMBRE DE GERMES VIABLES DE LA SOUCHE M1-5 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ DANS LE MILIEU. LA SOURCE AZOTEE EST NH_4NO_3 .

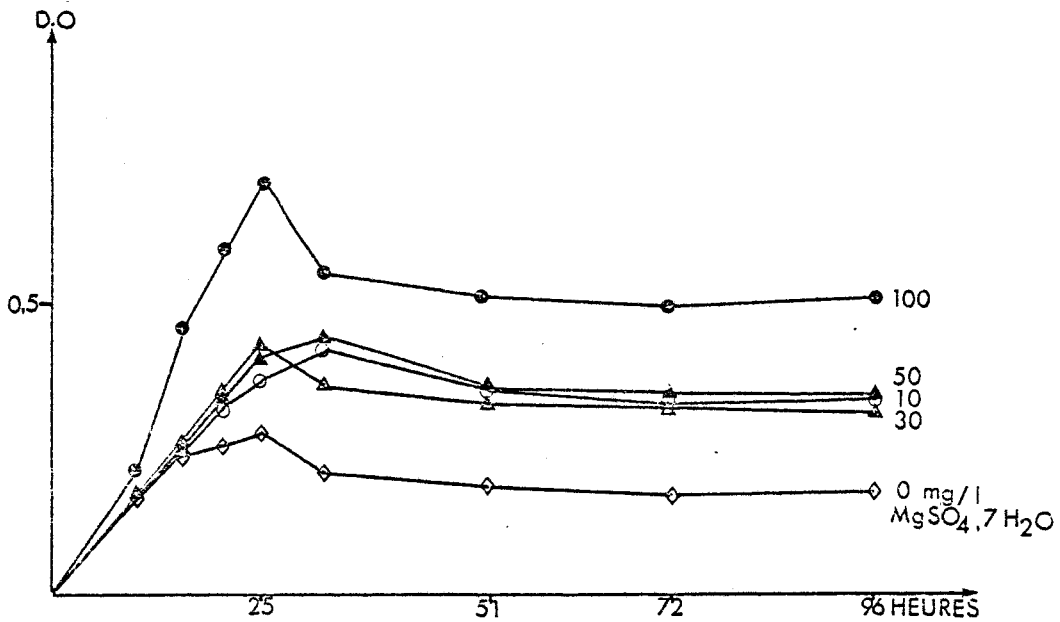


FIGURE 20 : EVOLUTION DES DENSITES OPTIQUES (DO) DES CULTURES DE B6 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ DANS LE MILIEU. LA SOURCE AZOTEE EST NH_4NO_3 .

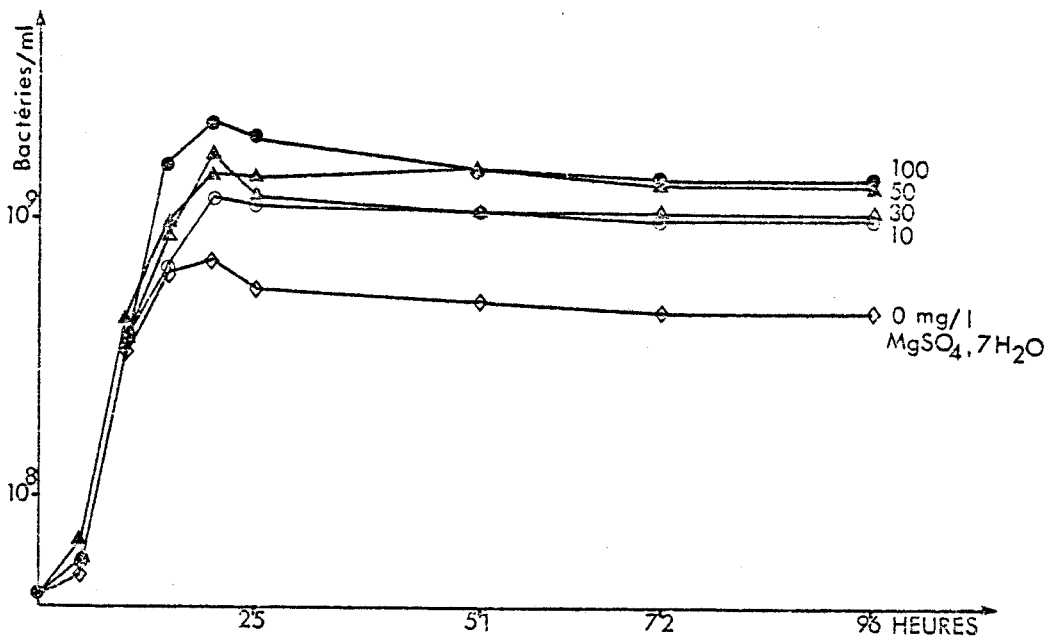


FIGURE 21 : EVOLUTION DU NOMBRE DE GERMES VIABLES DE LA SOUCHE B6 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ DANS LE MILIEU. LA SOURCE AZOTEE EST NH_4NO_3 .

CONCENTRATION EN MgSO ₄ , 7H ₂ O (mg/l)	SOUCHES			
	M1-5		B6	
	μ	Temps de génération	μ	Temps de génération
0	0,48	125 mn	0,52	115 mn
10	0,50	120 mn	0,52	115 mn
30	0,48	125 mn	0,54	111 mn
50	0,49	122,5 mn	0,55	109 mn
100	0,46	130 mn	0,55	109 mn

TABLEAU 13 : EVOLUTION DES PARAMETRES DE CROISSANCE DES SOUCHES M1-5 ET B6 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN MgSO₄, 7H₂O.

2.2.2.3 - pH

L'acidification des souches M1-5 et B6 en présence de fructose est encore plus forte sur milieu minimum que celle de la souche M5N1 (tab. 14). Elle n'est apparemment pas en relation avec la concentration de sel de magnésium. Il n'y a pas production d'acide 2 cêto-gluconique.

pH DES CULTURES APRES 72h DE CROISSANCE					
SOUCHES	CONCENTRATION EN $MgSO_4, 7H_2O$ (mg/l)				
	0	10	30	50	100
M1-5	5,10	4,90	4,65	4,85	4,85
B6	5,25	5,30	5,10	5,10	5,00

TABLEAU 14 : EVOLUTION DU pH DES CULTURES DE M1-5 ET B6 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN $MgSO_4, 7H_2O$; LA SOURCE AZOTEE EST NH_4NO_3 .

2.2.2.4 - Conclusion

Les souches M1-5 et B6, contrairement à la souche M5N1, seraient insensibles à l'effet des doses faibles de magnésium. Leurs développements, vitesses de croissance et acidifications ne sont pas ou très peu touchés par les variations de la concentration en sel de magnésium. L'absence totale de ce sel est quelque peu limitante dans la croissance mais a très peu de répercussions sur la morphologie des cellules et leur viabilité.

2.3 - ETUDE DE LA CROISSANCE EN MILIEU COMPLET, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE SULFATE DE MAGNESIUM

2.3.1 - Viabilité

Les viabilités cellulaires rapportées dans le tableau 15 révèlent que :

- lorsque les souches MSN1, Ar16, M17 sont cultivées dans un milieu à base d'extrait de levures, il est nécessaire de leur fournir du sulfate de magnésium pour augmenter leur viabilité. Or ces 3 souches se déformaient lorsqu'elles étaient en croissance sur le milieu N gélosé ;
- les viabilités des souches 2004 et Ve26 de *R. meliloti* et de la souche *Rhizo* d'*Agrobacterium* sont peu sensibles à la concentration du sulfate de magnésium dans ce type de milieu. Ces souches ont, par ailleurs, un développement normal sur le milieu N gélosé.

2.3.2 - pH

L'acidification des milieux RC additionné de fructose est obtenue avec les souches 2004, Ve26, *Rhizo* (tab. 16). Les autres souches acidifient uniquement lorsque la concentration de sulfate de magnésium permet d'obtenir des populations importantes ($DO > 1,00$) de cellules pléiomorphiques. Cette concentration correspond souvent à 30 mg/l. En dessous de cette valeur, la croissance est trop faible pour révéler un métabolisme acidifiant ; au-dessus, les cellules retrouvent une morphologie normale et le pH reste neutre en présence de fructose.

SOUCHES	NOMBRE DE CELLULES VIABLES $\times 10^9$ ml ⁻¹ /DO = 1				
	CONCENTRATION EN MgSO ₄ , 7H ₂ O (mg/l)				
	0	10	30	50	100
2004	1,19	1,54	1,62	1,69	1,48
Ve26	0,94	1,46	1,64	1,57	1,54
Rhizo	0,93	1,77	1,89	1,89	1,48
M17	0,83 $\times 10^{-2}$	0,02	0,15	0,17	-
Ar16	2,5 $\times 10^{-4}$	0,12	0,12	0,5	0,6
M5N1	2 $\times 10^{-4}$	0,07	0,4	1,05	1,13

TABLEAU 15 : VIABILITE DES CELLULES DE DIVERSES SOUCHES DE *R. MELILOTI* OU D'*AGROBACTERIUM*, "EXIGEANTES OU NON" EN MAGNESIUM, APRES 72 h D'INCUBATION DANS UN MILIEU A BASE D'EXTRAIT DE LEVURES.

SOUCHES	pH DES CULTURES APRES 72 h DE CROISSANCE				
	CONCENTRATION EN MgSO ₄ , 7H ₂ O (mg/l)				
	0	10	30	50	100
2004	5,55	5,55	5,45	5,4	5,35
Ve26	5,7	5,5	5,45	5,45	5,4
Rhizo	-	5,5	5,45	5,4	5,4
M17	7,8	7,8	<u>7,3</u>	7,35	7,45
Ar16	7,8	7,5	<u>6,2</u>	6,4	6,4
M5N1	7,4	7,35	<u>6,3</u>	7	7,1

TABLEAU 16 : pH DES CULTURES DE DIVERSES SOUCHES DE *R. MELILOTI* ET D'*AGROBACTERIUM*, "EXIGEANTES OU NON" EN MAGNESIUM, APRES 72 h D'INCUBATION DANS UN MILIEU A BASE D'EXTRAIT DE LEVURES.

Dans aucun des cas, l'acidification n'est consécutive à la synthèse d'acide 2 céto-gluconique.

2.3.3 - Conclusion

Les résultats obtenus en milieu RC sont similaires aux observations faites en milieu minimum : chaque souche répond de manière spécifique à la carence en ions Mg^{2+} , suivant son comportement sur le milieu N gélosé.

2.4 - EFFET DE LA COMPOSITION IONIQUE DU MILIEU

La composition saline d'un milieu de culture doit apporter aux bactéries les ions nécessaires à leur croissance tout en évitant les fluctuations importantes de pH qui entraîneraient l'arrêt de cette croissance. La nature et la concentration des sels utilisés sont donc importantes.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressé aux interactions possibles entre certains ions et le magnésium, au point de vue de son assimilation et de son action sur la physiologie bactérienne.

2.4.1 - Influence des ions Ca^{2+}

2.4.1.1 - *Milieux liquides*

Le comportement des souches M5N1, M1-5 et B6 a été étudié en fonction des cations bivalents présents dans les milieux de croissance. Cette expérimentation a été réalisée dans des milieux à base d'extrait de levures (tab. 17) ou à base de nitrate d'ammonium (tab. 18). Les cations sont utilisés à la concentration de 0,81 mM sous forme de sulfates.

SOUCHES	NATURE DE L'OBSERVATION	CATION BIVALENT PRESENT DANS LE MILIEU RICHE		
		0	(Mg ²⁺) = 0,81 mM	(Ca ²⁺) = 0,81 mM
M5N1	DO	0,07	2,80	2,10
	P%	80-100 %	0 %	0 %
	CV	0,02 x 10 ⁹	1,2 x 10 ⁹	10 ⁹
B6	DO	1,15	1,10	1,10
	P%	0 %	0 %	0 %
M1-5	DO	0,95	1,15	1,10
	P%	0 %	0 %	0 %

TABLEAU 17 : EFFET DES CATIONS BIVALENTS SUR LES SOUCHES M5N1, M1-5 ET B6 EN CROISSANCE SUR LE MILIEU RC.

SOUCHES	NATURE DE L'OBSERVATION	CATION BIVALENT PRESENT DANS LE MILIEU MINIMUM		
		0	(Mg ²⁺) = 0,81 mM	(Ca ²⁺) = 0,81 mM
M5N1	DO	0,10	1,10	0,45
	P%	80-100 %	0 %	0 %
	CV	0,013 x 10 ⁹	1,6 x 10 ⁹	0,95 x 10 ⁹
B6	DO	0,20	0,20	0,20
	P%	0 %	0 %	0 %
M1-5	DO	0,20	0,25	0,20
	P%	0 %	0 %	0 %

TABLEAU 18 : EFFET DES CATIONS BIVALENTS SUR LES SOUCHES M5N1, M1-5 ET B6 EN CROISSANCE SUR MILIEU MINIMUM.

En général, les souches M1-5 et B6 sont insensibles à la nature et à la concentration des cations. Leur croissance est constante et les cellules ont invariablement l'aspect de bâtonnet.

Par contre la souche M5N1 exige l'emploi d'au moins un cation bivalent. En milieu calcique, le développement de cette souche est un peu plus faible qu'en présence de magnésium mais les cellules retrouvent une morphologie et une viabilité normales.

2.4.1.2 - Milieux gélosés

Nous avons observé l'effet des ions Ca^{2+} sur le pléiomorphisme des souches Ar16 et M5N1 en croissance sur le milieu N gélosé.

L'ion calcium (0,81 mM) a été utilisé seul ou en présence de magnésium (0,81 mM), sous forme de chlorures ou de sulfates : dans aucun des cas, le pléiomorphisme de ces souches ne disparaît.

2.4.1.3 - Discussion

L'ion calcium pourrait, dans les milieux de croissance liquide, se substituer à l'ion magnésium. Il aurait donc un rôle équivalent au niveau de la synthèse pariétale. De plus, il est fort possible que les ions Ca^{2+} soient, tout comme les ions Mg^{2+} , inutilisables par les bactéries en croissance sur le milieu N gélosé.



2.4.2 - Influence des sels de magnésium employés à concentrations élevées

Les figures 22 et 23 traduisent les effets de concentrations fortes de sulfate de magnésium sur des cultures de M5N1, M1-5 et B6. Ces souches sont en croissance dans les milieux RC ou RHB₁ liquides.

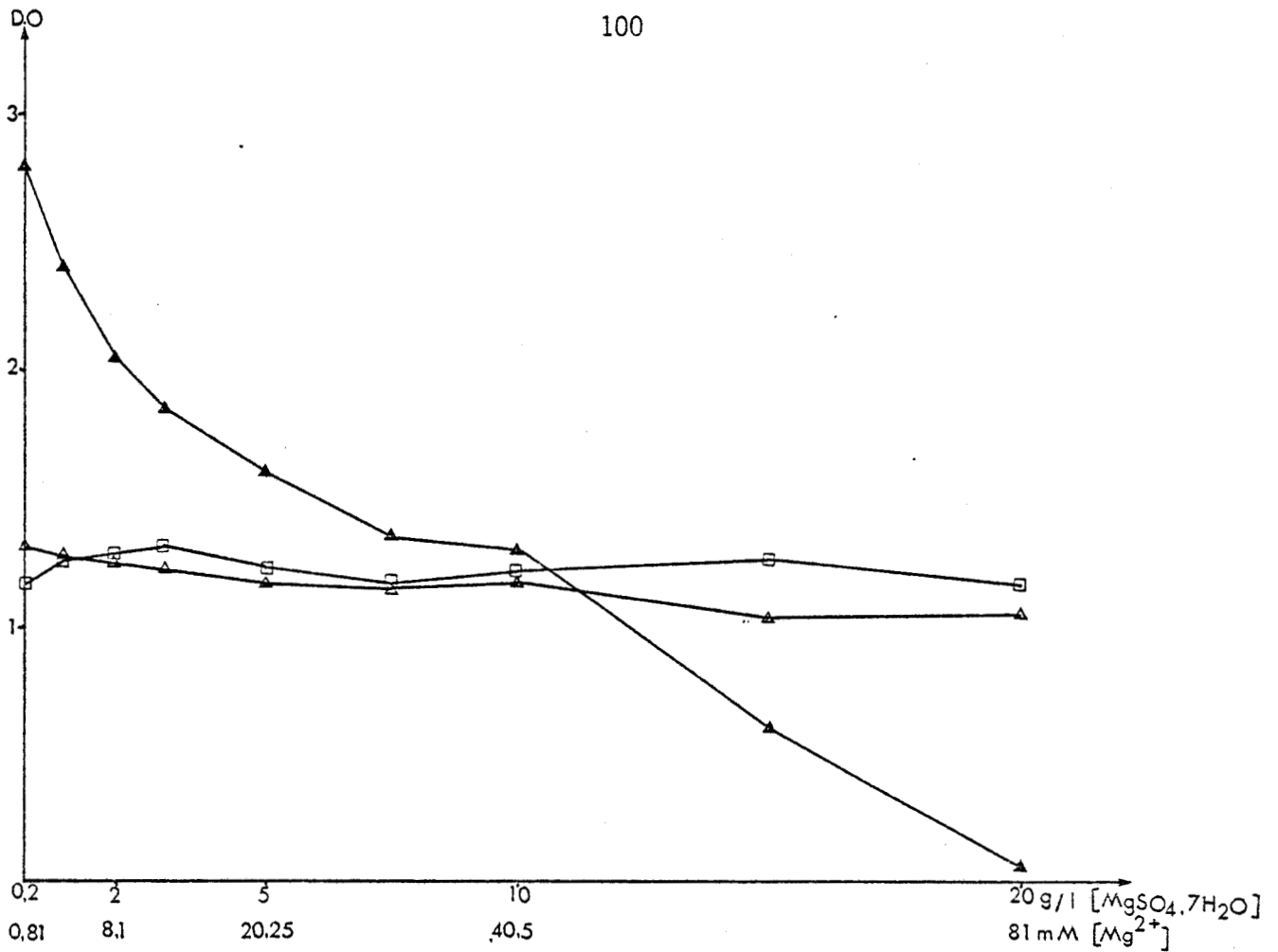


FIGURE 22 : DENSITES OPTIQUES DES SOUCHES M5N1 (▲), M1-5 (Δ) ET B6 (□) APRES 72 h D'INCUBATION DANS UN MILIEU A BASE D'EXTRAIT DE LEVURES ET EN EXCES DE SULFATE DE MAGNESIUM.

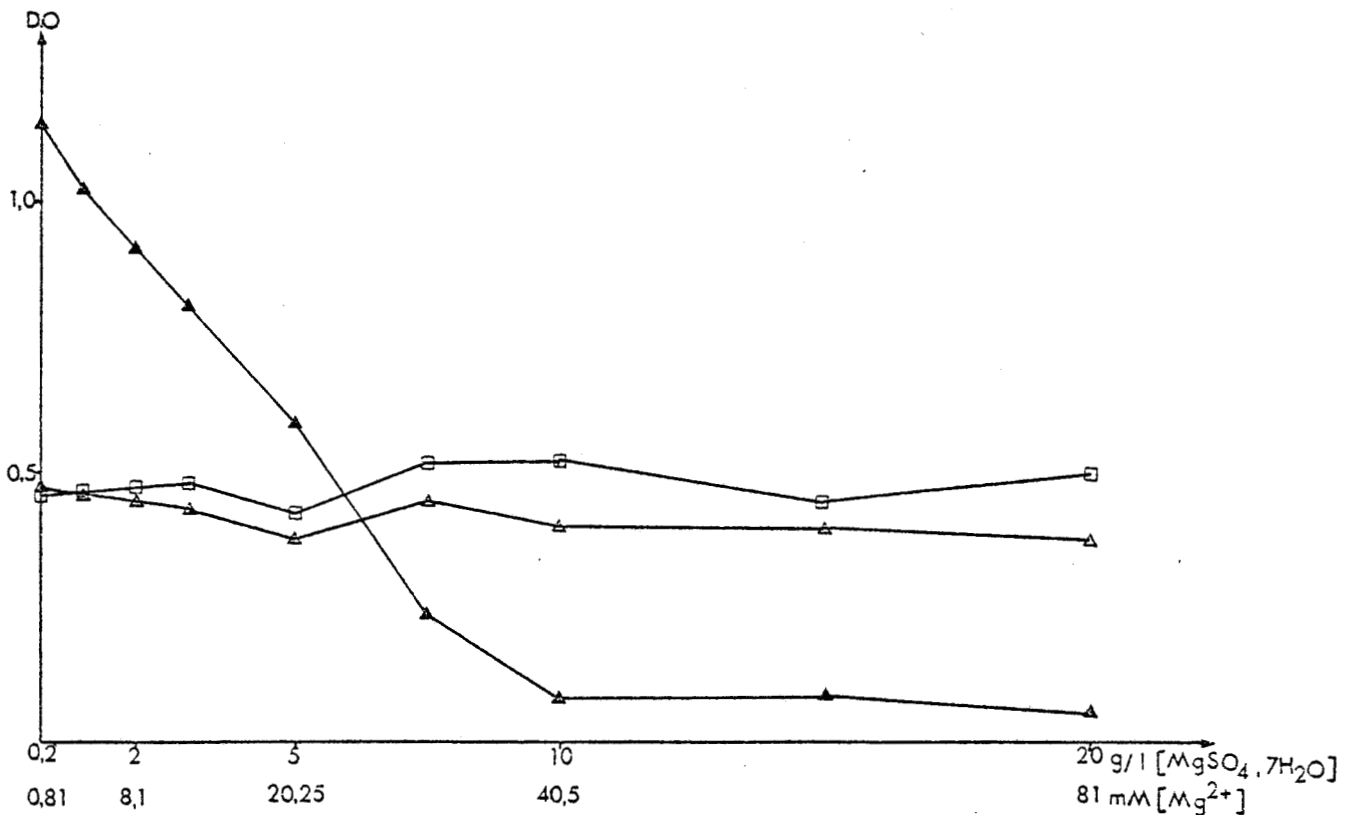


FIGURE 23 : IDEM FIGURE 22 MAIS LA SOURCE D'AZOTE EST LE NITRATE D'AMMONIUM.

La souche M5N1 se distingue encore une fois des souches M1-5 et B6. En effet, celle-ci est la seule souche dont la croissance est inhibée par des concentrations importantes de sulfate de magnésium.

On retrouve le même phénomène en milieu N gélosé où la taille des clones de la souche M5N1 diminue à partir de la concentration de 5 g/l de ce sel.

Par contre, les ions magnésium sous forme de chlorure n'ont pas d'influence sur la croissance de la souche M5N1 quelque soit la concentration utilisée.

On doit donc plutôt croire à la toxicité des ions sulfate envers la souche M5N1 qu'à une toxicité réelle du magnésium.

2.4.3 - Effets de divers sels utilisés en concentrations fortes

Le milieu RC liquide contenant 0,2 g/l de sulfate de magnésium a été enrichi par du K_2SO_4 , du KCl, du Na_2SO_4 ou du NaCl à des concentrations allant jusqu'à 81 mM (ou 81 mEq) du cation considéré.

Seul le sulfate de potassium, à cette concentration, inhibe la croissance de la souche M5N1. Les souches M1-5 et B6 ont dans tous les cas un développement normal.

On retrouve donc avec K_2SO_4 , et non pas avec Na_2SO_4 , la toxicité du sulfate pour la souche M5N1.

2.4.4 - Conclusion

Cette étude révèle que les souches se déformant sur le milieu N gélosé sont les plus sensibles à la composition ionique du milieu de croissance.

3. - ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES PLÉIOMORPHIQUES

3.1 - MISE EN EVIDENCE DE LA FRAGILISATION DES ENVELOPPES

Lors des travaux antérieurs (127), il a été prouvé que la souche IN8-25, déficiente dans ses structures pariétales, était peu résistante aux congélations et décongélations successives, ainsi qu'aux séjours prolongés à - 15°C.

De même, nous avons voulu tester la résistance des cellules obtenues en culture limitante de magnésium vis-à-vis de divers chocs thermiques et lytiques.

3.1.1 - Résistance aux températures élevées

3.1.1.1 - Mode opératoire

Les cellules sont cultivées 72 h dans le milieu RC liquide, contenant 20 ou 200 mg/l de sulfate de magnésium. Les bactéries sont ensuite centrifugées, lavées au TNP et réémulsionnées à DO = 1,00 dans le même tampon. A chaque température étudiée, des échantillons de 2 ml sont placés dans un bain marie thermostaté pendant des durées variables et mis ensuite dans la glace. Les bactéries survivantes sont numérées et l'absorbance des suspensions mesurée.

3.1.1.2 - Résultats

Les cellules carencées en magnésium présentent un pourcentage de pléiomorphisme compris entre 80 et 100 % ; la viabilité de ces bactéries est faible (2×10^8 bactéries/ml) mais normale pour ce type de cellules.

Le tableau 19 nous montre qu'une température de 50°C affecte uniquement la viabilité des cellules pléiomorphiques. Lorsque la durée de l'incubation se prolonge, ce phénomène s'accroît.

Par contre, les cellules en bâtonnet ne sont sensibles qu'aux températures supérieures à 55°C. Leur taux de survie est de 10^{-4} à 60°C ; à cette température la stérilisation est obtenue avec la suspension de pseudobactéroïdes.

Les densités optiques des échantillons ne varient pas, même à une température de 90°C.

TEMPERATURE	DUREE D'INCUBATION	CONCENTRATION EN MgSO ₄ , 7H ₂ O (mg/l)			
		20		200	
		CV	% de survie	CV	% de survie
30°C	3 mn	$2,2 \times 10^8$	100 %	$2,4 \times 10^9$	100 %
45°C	3 mn	$2,2 \times 10^8$	100 %	$2,4 \times 10^9$	100 %
50°C	3 mn	$1,3 \times 10^8$	59 %	$2,4 \times 10^9$	100 %
	5 mn	10^8	45,5 %	$2,4 \times 10^9$	100 %
	10 mn	$0,45 \times 10^8$	20,5 %	$2,4 \times 10^9$	100 %
55°C	3 mn	$0,13 \times 10^8$	5,9 %	$1,35 \times 10^9$	56 %
60°C	3 mn	0	stérilisation	$1,8 \times 10^5$	$0,75 \times 10^{-2}$ %

TABLEAU 19 : RESISTANCE DES CELLULES AU CHAUFFAGE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN MgSO₄, 7H₂O DU MILIEU DE CROISSANCE.

3.1.1.3 - Discussion

L'effet protecteur du magnésium vis-à-vis des chocs thermiques a déjà été mis en évidence par TEMPEST et STRANGE (175) chez *A. aerogenes*.

Les cellules cultivées en présence d'un excès de magnésium, adsorbent énormément cet ion. Celui-ci est éliminé par un lavage au NaCl (0,85 %) et représente alors 26 % du magnésium total. Le départ du Mg^{2+} adsorbé accélère la létalité des cellules lors d'incubations prolongées à une température de 40°C ou courtes dans un milieu à 48°C. De même, la présence de magnésium dans l'eau de chauffage protège les bactéries.

Dans notre expérience, les cellules ont été lavées puis chauffées dans du TNP qui contient lui-même 0,2 g/l de sulfate de magnésium. La sensibilité des bactéries carencées en magnésium vis-à-vis des températures élevées peut donc être due à la quantité moindre de Mg^{2+} dans leurs enveloppes mais aussi à la perte de l'aptitude à adsorber cet ion.

3.1.2 - Conservation à + 4°C

Les cellules proviennent du même type de milieu que le paragraphe précédent. Après le dernier lavage, les cellules ne sont réémulsionnées que dans un très faible volume de TNP. On détermine la viabilité et l'absorbance des purées cellulaires avant réfrigération et après 22 jours à + 4°C (tab. 20).

Il en ressort que :

- la viabilité des cellules provenant d'un milieu carencé en magnésium baisse de manière identique à celle des bactéries cultivées en excès de cet ion ;
- par contre, la diminution de la densité optique est beaucoup plus forte lorsque les organismes ont une morphologie anormale. Ceci pourrait s'expliquer par une lyse importante des cellules pléiomorphiques (une bactérie lysée sur trois). L'examen

microscopique de la purée cellulaire montre que celle-ci est toujours formée par 80 à 100 % de bactéries atypiques.

Ce résultat est important car il prouve la nécessité de travailler avec des cellules fraîches et non avec des purées conservées à + 4°C. Celles-ci sont habituellement utilisées au laboratoire pour la synthèse d'EPS ou pour des études de perméation.

NATURE DE LA PUREE CELLULAIRE	CONCENTRATION EN $MgSO_4, 7H_2O$ (mg/l) DANS LE MILIEU DE CROISSANCE			
	20		200	
	D.O.	C.V.	D.O.	C.V.
Purée fraîche	21,5	$2,2 \times 10^8$	17,5	$2,4 \times 10^9$
Purée conservée 22 j à + 4°C	14,5	$1,35 \times 10^8$	16,0	$1,45 \times 10^9$

TABLEAU 20 : COMPORTEMENT DE PUREES CELLULAIRES PROVENANT DE MILIEUX DE CROISSANCE OU $MgSO_4, 7H_2O$ EST EN CONCENTRATION LIMITANTE (20 mg/l) OU EN EXCES (200 mg/l).

3.1.3 - Action de lysozyme

3.1.3.1 - Principe

Le lysozyme coupe les liaisons $\beta 1-4$ entre le GlcNAc et le MurNAc de la muréine. L'action lytique de cette enzyme sur les cellules de *Rhizobium* nécessite l'emploi de l'EDTA et de détergents (165). Ceux-ci

déstabilisent les LPS et permettent au lysozyme d'atteindre le peptidoglycane. La lyse des sphéroplastes ainsi obtenus est provoquée en réalisant une déplasmolyse rapide et se traduit par une diminution de l'absorbance.

3.1.3.2 - Mode opératoire

Nous nous sommes inspiré de la méthode de SCHEÏE (160). Les cellules sont cultivées et traitées pareillement au paragraphe 3.1.1.1. 5 ml de chaque suspension cellulaire ajustée à $DO = 1,00$ sont centrifugés. Le surnageant est enlevé et les parois du pot à centrifuger sont séchées. Le culot est alors mis en contact avec 0,2 ml d'une solution de TNP et de saccharose à concentration variable. Après homogénéisation, on ajoute 0,1 ml de lysozyme (1 mg/ml) dans du tampon Tris 50 mM/HCl (pH 8) ou dans du tampon Tris 50 mM/EDTA 20 mM (pH 8). On mélange et, après une minute d'incubation à température ambiante, la déplasmolyse est provoquée par l'ajout de TNP QSP 5 ml. L'absorbance à 600 nm est mesurée 5 mn plus tard. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'absorbance initiale et en fonction de la concentration de saccharose dans le milieu de plasmolyse.

3.1.3.3 - Résultats

Dans la figure 24, on voit que le lysozyme seul a très peu d'effet sur les cellules non déformées. Par contre, près de 50 % des cellules polymorphiques sont lysées dans les mêmes conditions. La déplasmolyse n'augmente que très peu ce taux.

La figure 25 rend compte de l'action du lysozyme en présence d'EDTA. Dans ce cas, seulement 20 % des cellules sont insensibles au lysozyme, quelque soit leur morphologie. La déplasmolyse est nécessaire chez les cellules en bâtonnet pour obtenir cette valeur. Par contre, elle est toujours inefficace chez les organismes pléiomorphiques.

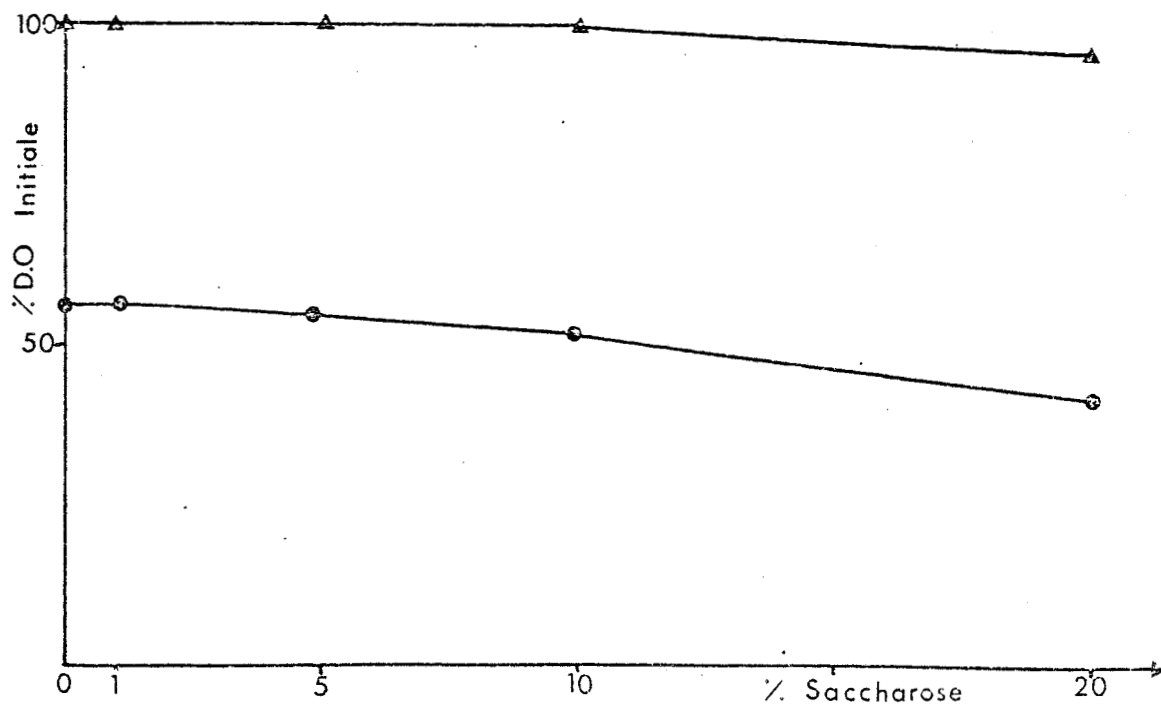


FIGURE 24 : LYSE DES CELLULES PROVENANT D'UN MILIEU EN EXCES (▲) OU DEFICIENT (●) EN MAGNESIUM, APRES ACTION DU LYSOZYME DANS DU TAMPON TRIS 50 mM/HCl (pH 8). LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN POURCENTAGE DE LA DENSITE OPTIQUE INITIALE ET SONT FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SACCHAROSE DANS LE MILIEU DE PLASMOLYSE.

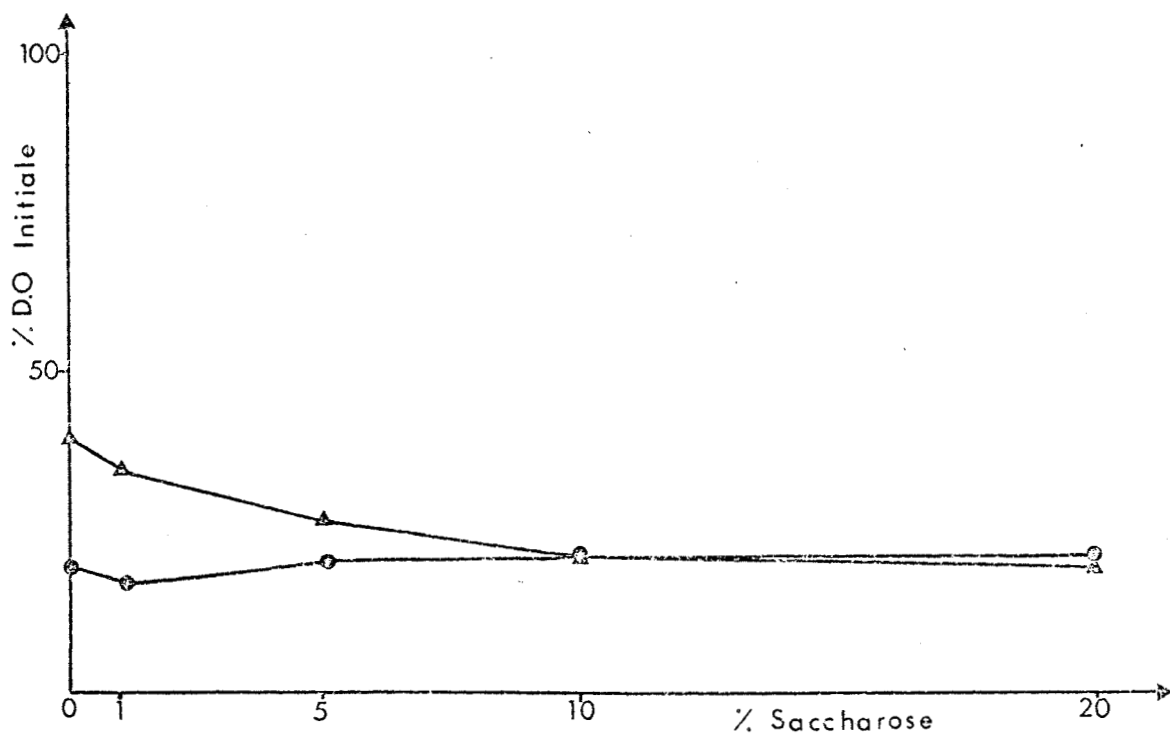


FIGURE 25 : IDEM FIGURE 24 MAIS ACTION DU LYSOZYME DANS DU TAMPON TRIS 50 mM/EDTA 20 mM (pH 8).

Ces résultats montrent que :

- le lysozyme seul est plus actif chez les bactéries déformées. La muréine est sans doute plus accessible par l'enzyme chez ce type de cellules ; les LPS seraient synthétisés en quantité moindre ou leur rétention par la muréine serait diminuée (186) ;
- les sphéroplastés obtenus à partir des cellules pléiomorphiques sont les plus fragiles car ils éclatent même sans déplasmolyse. Soit les sphéroplastés sont totalement dépourvus de paroi et se rapprochent ainsi de l'état protoplastique, soit leur structure membranaire a subi des modifications et sont de ce fait très instables.

C'est sans doute ce phénomène de fragilisation des enveloppes qui nous a empêché d'observer le contenu plasmidique des cellules polymorphiques.

3.1.4 - Conclusion

Les cellules pléiomorphiques résistent mal aux chocs thermiques et sont très sensibles à l'action du lysozyme et de l'EDTA.

Ces résultats mettent en évidence une certaine fragilisation des enveloppes cellulaires ainsi qu'une perméabilité accrue au lysozyme et aux détergents. Ces propriétés sont caractéristiques du bactéroïde intranodulaire (185, 173).

3.2 - ETUDE ULTRASTRUCTURALE

3.2.1 - Colorations négatives

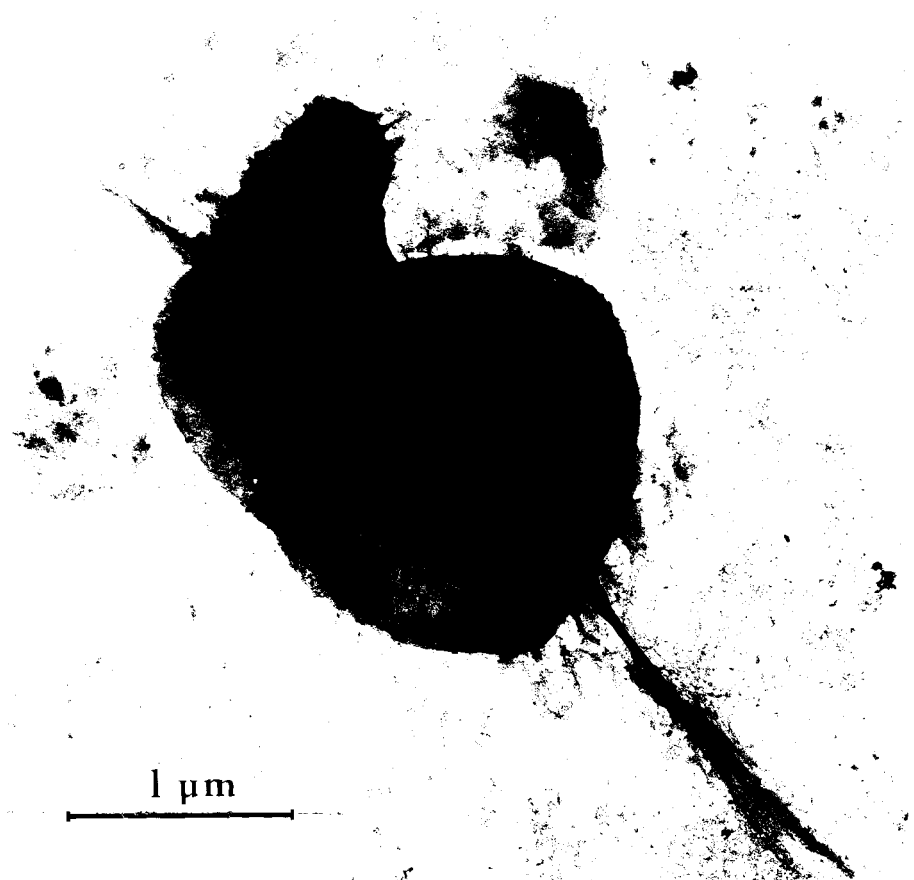
1°) La coloration par la glutaraldéhyde, le rouge de ruthénium et l'acétate d'uranyle permet l'observation, en microscopie électronique, du corps bactérien et des structures polysaccharidiques externes (pseudo-capsule, réseau fibrillaire) (130).

PLANCHE 2 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE APRES COLORATION NEGATIVE (GLUTARALDEHYDE/CACODYLATE/ROUGE DE RUTHENIUM/ACETATE D'URANYLE). LES BACTERIES, APRES AVOIR ETE CULTIVEES 96 h DANS UN MILIEU CARENCE EN SULFATE DE MAGNESIUM (20 mg/l), ONT ETE CENTRIFUGEES, LAVEES ET PLACEES DANS UN MILIEU DE NON PROLIFERATION (TNP) ADDITIONNE DE FRUCTOSE PENDANT 100 h.

PHOTO 3 (partie supérieure gauche) : SOUCHE Ve26 DE R. MELILOTI ; MISE EN EVIDENCE DE LA CAPSULE ET DU RESEAU FIBRILLAIRE IMPORTANT SECRETE PAR LE PSEUDOCOCCI (grossissement x 50 000).

PHOTO 4 (partie supérieure droite) : SOUCHE M5N1 DE R. MELILOTI ; RESEAU FIBRILLAIRE PEU DENSE AUTOUR DE LA CELLULE PLEIOMORPHIQUE (grossissement x 30 000).

PHOTO 5 (partie inférieure) : SOUCHE M5N1 ; MISE EN EVIDENCE DE LA SECRETION POLAIRE DES FIBRES POLYSACCHARIDIQUES CHEZ CE PSEUDOBACTEROIDE (grossissement x 30 000).



Ainsi les photographies 3 et 4 montrent la différence de taille et d'aspect entre les cellules de *R. meliloti* "exigeantes" en magnésium (souche M5N1) ou "non exigeantes" (souche Ve26), lorsque celles-ci proviennent d'un milieu carencé en sulfate de magnésium (20 mg/l).

Les cellules de la souche Ve26 (photo 3) ont l'allure de pseudococci alors que la souche M5N1 (photo 4) présente des formes très hétérogènes et volumineuses.

Le réseau fibrillaire semble peu important chez les formes polymorphiques. Ceci expliquerait la faible viscosité des milieux. La photo 5 indique que la sécrétion des fibres est polaire chez les cellules pléiomorphiques, tout comme chez les cellules en bâtonnet (130).

2°) Le phosphotungstate de potassium est utilisé pour mettre en évidence la présence de flagelles chez les cellules de *Rhizobium* en culture liquide (130). Un tel traitement sur les cellules pléiomorphiques de la souche M5N1, obtenues en milieu liquide exempt en magnésium, ne révèle pas l'existence d'une ciliature. Cette caractéristique se retrouve chez les bactéroïdes intranodulaires (14, 89).

3.2.2 - Coupes ultrafines

L'hétérogénéité des cellules de la souche M5N1 carencées en magnésium et leur accroissement de volume sont une nouvelle fois mis en valeur par les coupes ultrafines (photo 6).

L'étude du contenu intracellulaire montre l'existence de nombreux grains de PHB. Ceux-ci peuvent occuper toute la bactérie au niveau du plan de coupe (photo 7).

La microscopie optique faisait déjà état d'une répartition inégale du cytoplasme dans les cellules polymorphiques de la souche Ar16 (photo 2). Ceci se traduisait par des plages sombres et claires dans le corps bactérien. Les coupes fines confirment l'existence de zones exemptes de cytoplasme (photo 8). Ce dernier occupe alors une mince région contre la paroi.

PLANCHE 3 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE COUPES ULTRAFINES.

PHOTO 6 (partie supérieure gauche) : SOUCHE M5N1 ; CELLULE EN X OBTENUE APRES 72 h DE CULTURE DANS UN MILIEU A BASE D'EXTRAIT DE LEVURE LIQUIDE ET CARENCE EN SULFATE DE MAGNESIUM (10 mg/l) (grossissement x 30 000).

PHOTO 7 (partie supérieure droite) : SOUCHE M5N1 ; MISE EN EVIDENCE DE L'ACCUMULATION DE PHB (PLAGES CLAIRES) CHEZ CETTE CELLULE PROVENANT D'UN MILIEU LIQUIDE A BASE DE NH_4NO_3 ET NE CONTENANT QUE 10 mg/l DE SULFATE DE MAGNESIUM (grossissement x 20 000).

PHOTO 8 (partie inférieure) : SOUCHE Ar16 ; CELLULE PSEUDOSPHEROPLASTIQUE OBTENUE APRES 5 j DE CROISSANCE SUR LE MILIEU N GELOSE. LE CYTOPLASME (PLAGE SOMBRE) EST RETRACTE LE LONG DE LA PAROI (grossissement x 30 000).



3.2.3 - Discussion

L'étude en microscopie électronique dévoile certaines analogies ultrastructurales entre les cellules polymorphiques et les bactéroïdes intranodulaires :

- diversité morphologique,
- accroissement du volume,
- absence de ciliature,
- accumulation de PHB,
- désorganisation interne.

L'hypertrophie des cellules pléiomorphiques peut s'expliquer par l'accumulation excessive de substances de réserves et par l'entrée d'eau.

3.3 - ETUDE DE LA PERMEATION DE SUBSTRATS CARBONES CHEZ LES CELLULES DEFICIENTES EN MAGNESIUM

Les perméases et d'autres protéines intervenant dans le transport ("Binding Proteins") sont localisées au niveau de la membrane cytoplasmique et de l'espace périplasmique. Les altérations des enveloppes, chez les cellules pléiomorphiques déficientes en magnésium, peuvent donc modifier les caractéristiques des transports.

C'est dans cette optique et au vu des résultats déjà obtenus avec les bactéroïdes d'autres souches que nous avons réalisé notre étude.

3.3.1 - Effet de la source d'azote

Des cellules de la souche M5N1 sont cultivées en présence de 20 ou de 200 mg/l de sulfate de magnésium. Les milieux de culture sont à base d'extrait de levure (milieu RC) ou de nitrate d'ammonium (milieu RHB₁). La source de carbone est représentée par le fructose (1 %).

La concentration de 20 mg/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ permet d'obtenir des populations de cellules pléiomorphiques suffisante pour la réalisation des purées cellulaires.

Après 72 h de culture, les bactéries sont centrifugées (12 000 g, 10 mn), lavées deux fois par du TNP et utilisées aussitôt pour les essais de perméation.

La figure 26 permet de suivre l'incorporation du fructose par des cellules normales ou polymorphiques, en fonction de la source azotée du milieu de culture.

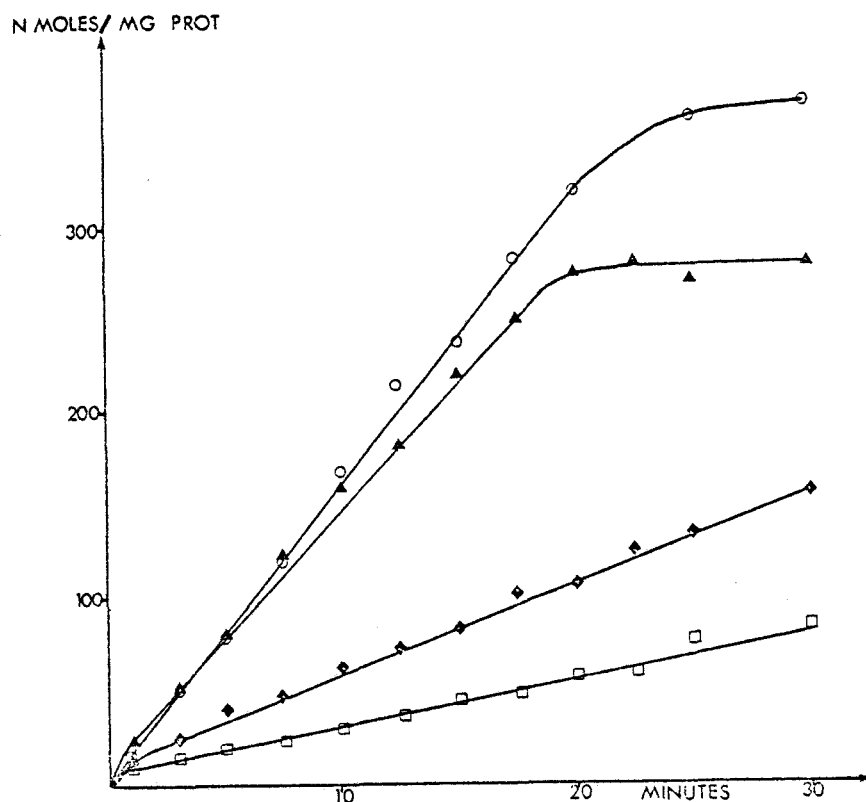


FIGURE 26 : INCORPORATION DU FRUCTOSE PAR DES CELLULES CARENCÉES (□, ◆) OU NON (○, ▲) EN MAGNÉSIMUM. LES SYMBOLES CLAIRS REPRESENTENT LES CELLULES PROVENANT DU MILIEU RC FRUCTOSE ET LES SYMBOLES SOMBRES, CELLES CULTIVÉES SUR RHB₁ FRUCTOSE.

On constate que :

- quelque soit la source d'azote utilisée, les cinétiques d'accumulation du fructose sont équivalentes pour un type de morphologie cellulaire donné ;
- les cellules déformées incorporent nettement moins bien le fructose que les cellules en bâtonnet. Par exemple, lorsque le milieu de culture est le milieu RC, la pénétration du fructose après 20 mn d'incubation est 6 fois plus faible si les cellules ont une morphologie anormale.

3.3.2 - Incorporation du glucose et du fructose

Il était intéressant de savoir si les conclusions sur l'incorporation du fructose étaient valables pour le glucose ; le transport de ce sucre ayant déjà été étudié chez le bactéroïde (86, 43).

Les incorporations du glucose et du fructose sont respectivement réalisées sur des cellules ayant cultivées 72 h sur RHB₁ glucosé ou RHB₁ fructosé.

Le milieu RC n'a pas été utilisé pour ce type de manipulation car les divers constituants de l'extrait de levure peuvent interférer dans la formation de systèmes de transport non spécifiques du sucre considéré et ainsi modifier l'incorporation de cet ose.

La figure 27 montre que le glucose pénètre moins bien que le fructose dans les cellules non déformées. Les cellules pléiomorphiques, quant à elles, n'incorporent pas du tout le glucose, même après 30 mn de contact.

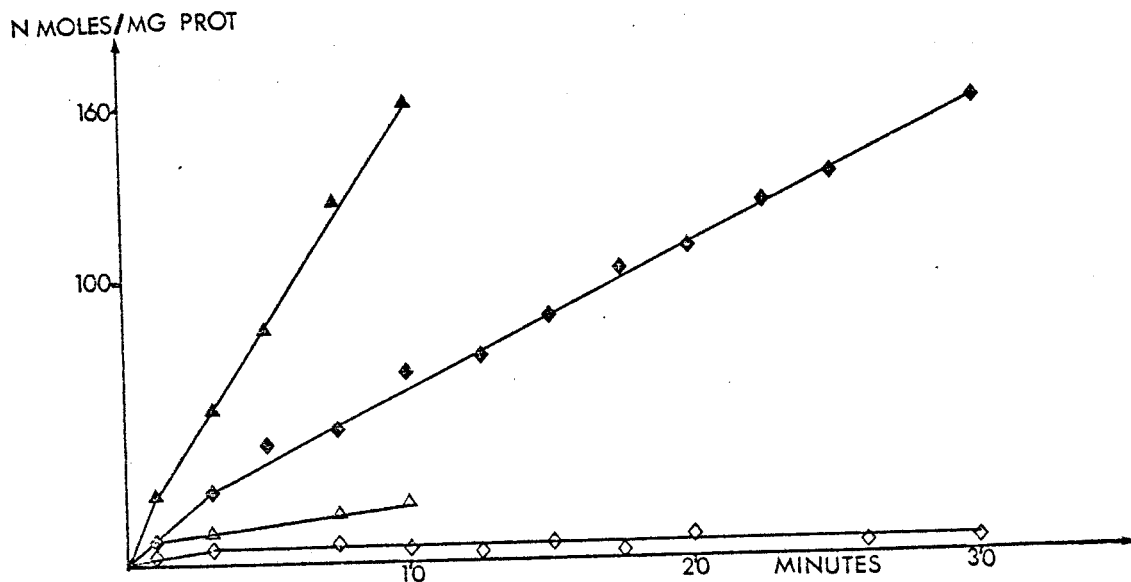


FIGURE 27 : INCORPORATION DU FRUCTOSE ET DU GLUCOSE PAR DES CELLULES CARENCEES (◆,◇) OU NON (▲, △) EN MAGNESIUM. LES SYMBOLES FONCES REPRESENTENT LE FRUCTOSE ET LES SYMBOLES CLAIRS LE GLUCOSE.

3.3.3 - Spécificité de la glucose perméase pour divers hydrates de carbone

Les cellules sont cultivées 72 h sur RHB₁ glucosé en présence de 20 ou de 200 mg/l de sulfate de magnésium. Après lavage des cellules, l'incorporation du glucose, du fructose et du succinate est suivie pendant 10 mn.

Chez les cellules à morphologie normale, l'accumulation de ces divers substrats est réalisée à des vitesses différentes (fig. 28). C'est le glucose qui est le mieux incorporé par ce type de cellules. En effet, le système perméasique de cet ose avait été induit par la culture dans le milieu RHB₁ glucose. Le fructose et surtout le succinate ont plus de difficulté pour pénétrer dans les bactéries.

Par contre, les cellules pléiomorphiques montrent des cinétiques d'accumulation très différentes (fig. 29). Si les sucres sont toujours incorporés à des vitesses différentes, c'est cette fois le glucose qui rentre le plus mal

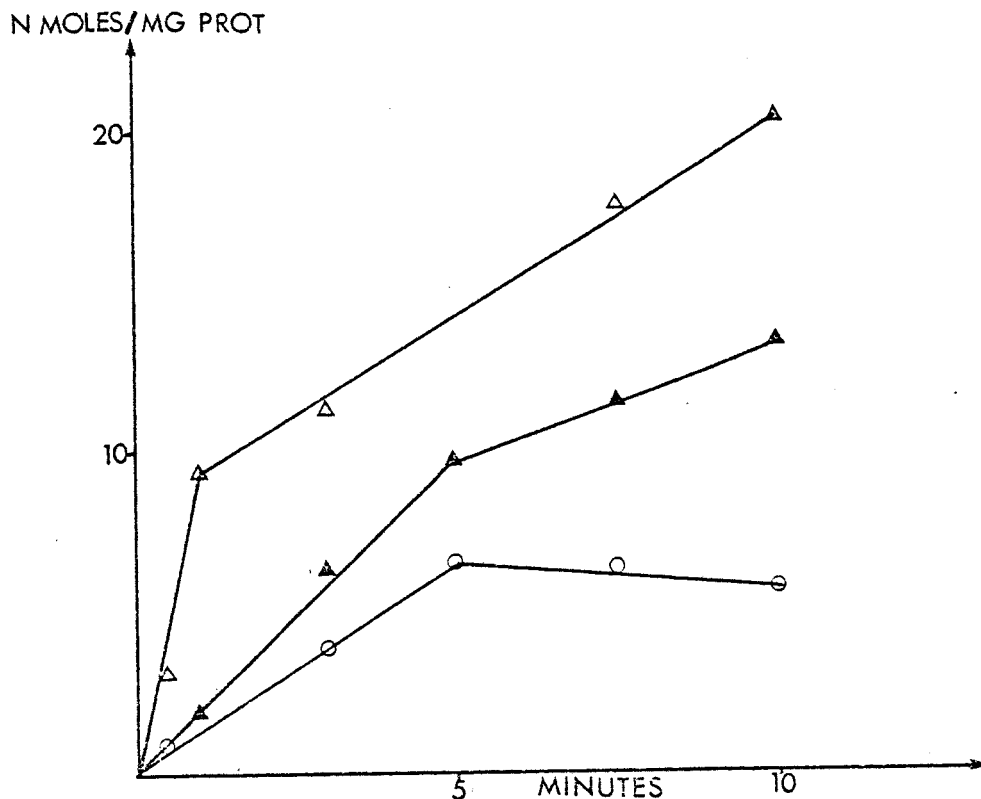


FIGURE 28 : INCORPORATION DU GLUCOSE (Δ), DU FRUCTOSE (\blacktriangle) ET DU SUCCINATE (\circ) PAR DES CELLULES PROVENANT D'UN MILIEU RHB₁ GLUCOSE CONTENANT 200 mg/l DE SULFATE DE MAGNESIUM.

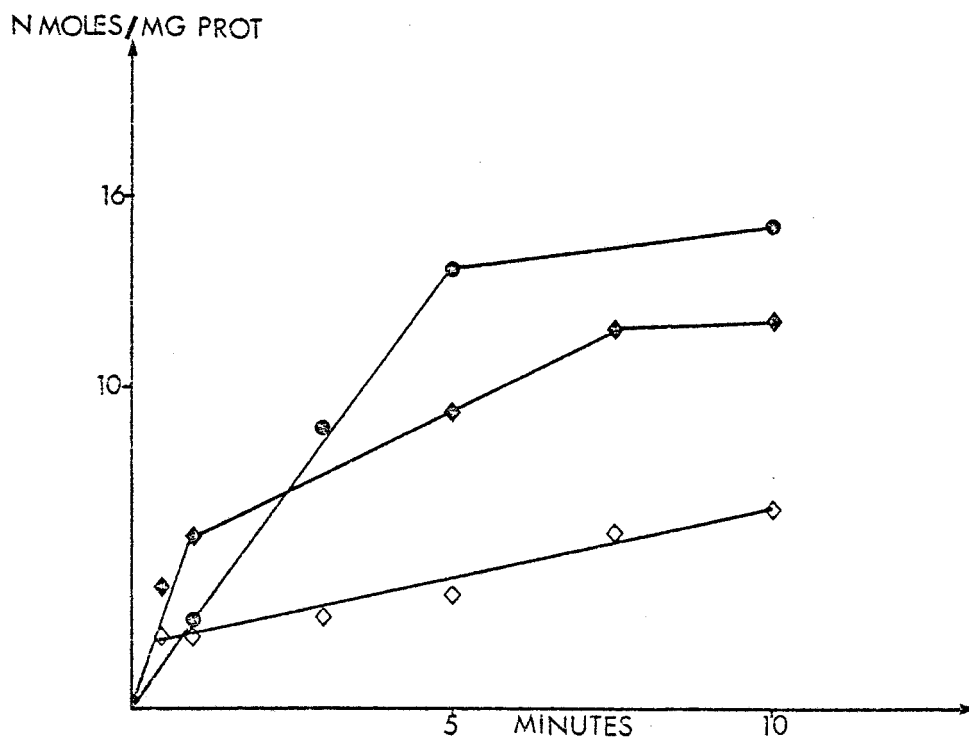


FIGURE 29 : INCORPORATION DU GLUCOSE (\diamond), DU FRUCTOSE (\blacklozenge) ET DU SUCCINATE (\bullet) PAR DES CELLULES PROVENANT D'UN MILIEU RHB₁ GLUCOSE CONTENANT 20 mg/l DE SULFATE DE MAGNESIUM.

dans les cellules. Celui-ci avait pourtant été utilisé pour la croissance des bactéries. Inversement, c'est le succinate qui est le mieux incorporé et ensuite le fructose.

Ce comportement est anormal pour les cellules libres de *Rhizobium* mais apparemment pas pour les formes symbiotiques (86, 43).

3.3.4 - Discussion

Les malformations pariétales, dues à la déficience en magnésium, entraînent des modifications quantitatives et qualitatives des systèmes perméasiques. Le pléiomorphisme diminue la pénétration du fructose et empêche l'utilisation du glucose.

Les cellules dont la morphologie est normale incorporent apparemment moins bien le glucose que le fructose. Ce phénomène a déjà été observé (176) et attribué au "choc physiologique" consécutif à l'acidification forte lors des croissances en milieu RHB₁ glucosé. En effet, la perméation du glucose est meilleure à pH neutre.

Les cellules pléiomorphiques provenant d'un milieu RHB₁ glucosé incorpore très mal cet ose. Pourtant, dans les mêmes conditions, le fructose et surtout le succinate pénètrent facilement.

Ce résultat est à rapprocher des conclusions de HUDMAN et GLENN (86) et de DE VRIES et coll. (43). Ces auteurs ont démontré que le succinate contrairement au glucose est un bon substrat pour les bactéroïdes intranodulaires. Les cellules en culture liquide, carencées en magnésium, auraient donc des activités perméasiques similaires aux cellules symbiotiques.

Cette analogie permet de supposer que le pléiomorphisme du bactéroïde pourrait être aussi provoqué dans le nodule par la carence en magnésium.

3.4 - ESSAI DE REDUCTION DE L'ACÉTYLENE

Nous avons voulu mettre en évidence une éventuelle activité nitrogénasique chez les cellules pléiomorphiques, obtenues sur le milieu N gélosé, par la technique de la réduction de l'acétylène.

Il fallait pour cela rassembler les conditions nécessaires à l'expression du pléiomorphisme et de la nitrogénase. Or, de part la présence de nitrate d'ammonium (1 g/l) dans le milieu N, il apparaissait difficile de trouver un compromis. Cette source azotée, à une telle concentration, inhibe la fixation de l'azote (141).

Nous avons procédé de deux manières différentes :

1°) les cellules sont mises en culture sur le milieu N gélosé ; les bactéries pléiomorphiques ainsi obtenues sont récoltées, lavées dans du TNP et placées dans le milieu de O'GARA et SHANMUGAN (134). Ce milieu contient du glutamate, favorable à la réduction de l'acétylène. L'apport carboné est représenté par le mannitol (0,5 %) et le gluconate (0,5 %) ;

2°) les cellules sont directement cultivées sur un milieu et dans des conditions propices au pléiomorphisme et susceptibles de révéler une activité nitrogénasique. Les divers milieux utilisés conservent certains éléments du milieu de O'GARA et SHANMUGAN (sels minéraux, vitamines, oligoéléments) mais subissent des variations au niveau des sources azotées et carbonées (tab. 21). Ces modifications tiennent compte des résultats de PANKHURST et CRAIG (141) et de PANKHURST (140). Ces auteurs ont remarqué que :

- l'ion NH_4^+ , lorsqu'il représente un apport de 2 mMole/l d'azote permet tout comme le glutamate, la réduction de l'acétylène ;
- certaines sources carbonées comme le succinate (10 mM) associé au glycérol (100 mM) ou à l'arabinose (100 mM) sont favorables à l'expression de la nitrogénase.

SOURCES AZOTEES (mMole d'azote)		SOURCES CARBONEES	
NH ₄ Cl (2 mM)	Mannitol (0,5 %) + Gluconate (0,5 %)	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (2 mM)	" " " "	
NH ₄ NO ₃ (2 mM)	" " " "	
" "	Fructose (1 %) + Succinate (10 mM)	
" "	Glycérol (100 mM) + Succinate (10 mM)	
" "	Arabinose (100 mM) + Succinate (10 mM)	
NH ₄ NO ₃ (20 mM)	Mannitol (0,5 %) + Gluconate (0,5 %)	
NH ₄ NO ₃ (10 mM) + Glutamate (10 mM)	" " " "	

TABLEAU 21 : NATURE DES SOURCES AZOTEES ET CARBONEES ENTRANT DANS LA COMPOSITION DES MILIEUX GELOSES UTILISES POUR PROVOQUER LE PLEIOMORPHISME DES CELLULES DE LA SOUCHE M5N1 ET L'ACTIVITE NITROGENASIQUE.

Les essais de réduction de l'acétylène sont réalisés avec des cellules de la souche M5N1 de *R. meliloti* et la souche ATCC 12837 d'*A. vinelandii*. Cette dernière est capable de fixer l'azote atmosphérique lorsque les conditions de culture sont favorables à une telle activité. Elle est donc utilisée comme témoin.

Après 5 jours de cultures en milieu gélosé sous atmosphère normale, les cellules sont, suivant le cas, soit transférées dans le milieu de O'GARA et SHANMUGAN liquide, soit laissées sur le milieu de culture d'origine. L'air est alors chassé par l'argon et on introduit l'acétylène à raison de 5 %. L'éthylène formé est mesurée après 5 jours d'incubation.

Seule la souche d'*Azotobacter* montre une activité nitrogénasique. En général, la nature des sources carbonées et azotées a peu d'effet sur la quantité d'éthylène formé. Il y a uniquement inhibition de la réduction de l'acétylène quand le nitrate d'ammonium représente un apport d'azote supérieur à 2 mMole.

Malgré des conditions expérimentales apparemment convenables, les cellules pléiomorphiques de la souche MSN1, obtenues sur milieu gélosé, ne sont pas capables de réduire l'acétylène. Elles diffèrent donc de l'état bactéroïde. Cette absence d'activité peut avoir deux origines :

- soit une inaptitude interne réelle,
- soit des conditions expérimentales encore défavorables.

L'altération des enveloppes, comme celles que l'on retrouve chez le bactéroïde intranodulaire, sont peut-être une condition nécessaire à la réalisation de l'activité nitrogénasique mais certainement pas suffisante.

CONCLUSION
GENERALE

Nous nous sommes attaché dans ce travail à étudier le pléiomorphisme des bactéries du genre *Rhizobium* à l'état non symbiotique.

Nous avons pour cela utilisé 47 souches représentant les diverses espèces à croissance rapide de *Rhizobium* et 7 souches du genre *Agrobacterium*.

Nous sommes parvenu à déclencher le pléiomorphisme des bactéries en utilisant :

- soit le milieu de croissance N gélosé, caractérisé par la présence de gluconate et surtout d'ions NH_4^+ sous la forme de nitrate d'ammonium,
- soit des milieux de culture liquides carencés en ions Mg^{2+} .

Seule l'espèce *R. meliloti* (22 souches sur 26) exprime un polymorphisme important ; les formes cellulaires aberrantes étant généralement peu viables. Cette espèce se distingue donc des autres espèces de *Rhizobium* étudiées ainsi que du genre *Agrobacterium*.

La similitude de comportement des souches de *R. meliloti* sur ces deux types de milieux met en évidence la relation entre la carence en magnésium et le pléiomorphisme sur le milieu N gélosé. Les conditions de croissance, spécifiques à ce milieu, seraient à l'origine de la non assimilation des ions Mg^{2+} par les cellules de *R. meliloti*, provoquant ainsi la désorganisation des structures pariétales.

L'étude de cultures en milieu liquide révèle l'importance des ions Mg^{2+} pour ces souches de *R. meliloti*. En effet, l'utilisation de sulfate de magnésium en concentration limitante (inférieure à 50 mg/l) a des répercussions sur :

- la morphologie et la viabilité cellulaire, tout comme en milieu gélosé ;
- le nombre total de germes en phase stationnaire ;
- le taux de croissance.

Les cellules pléiomorphiques ont, en outre, un métabolisme acidifiant. La production d'acide 2 céto-gluconique, habituellement à l'origine de la diminution du pH chez *R. meliloti*, n'a pas été mise en évidence.

Ces mêmes souches sont les plus sensibles à la composition saline du milieu de croissance : leurs cultures nécessitent la présence d'au moins un cation bivalent (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) et elles manifestent une certaine toxicité aux ions sulfates.

Les souches 2004, A145, Ve26 et M1-5 de *R. meliloti*, qui ne se déforment pas sur le milieu N gélosé, paraissent peu sensibles aux variations de concentration de sulfate de magnésium ; elles se comportent comme les souches d'*Agrobacterium*. Elles seraient taxonomiquement plus proches de ce genre que le reste du groupe de *R. meliloti*.

L'étude des cellules atypiques obtenues en culture a permis de mettre en évidence certaines analogies avec les bactéroïdes intranodulaires. Elles sont d'ordre ultrastructural (accroissement de volume et hétérogénéité morphologique, absence de ciliature, accumulation de PHB) mais aussi physiologique. En effet, ces cellules s'identifient aux bactéroïdes par :

- la fragilisation de leurs enveloppes,
- la perméabilisation accrue au lysozyme et aux détergents,
- la modification de l'incorporation de substrats carbonés tels que le glucose et le succinate.

Par contre, aucune activité nitrogénasique n'a pu être décelée chez ce type de cellules.

Ces résultats nous permettent d'émettre quelques hypothèses sur :

- le mécanisme de la différenciation de la bactérie en (pseudo) bactéroïde,
- les fonctions possibles du pléiomorphisme exprimé par le bactéroïde dans le nodule.

1°) Mécanisme de la différenciation de la bactérie en (pseudo) bactéroïde

L'obtention de cellules à morphologie anormale à l'état libre est très souvent consécutive à la modification de la composition du milieu de croissance et des conditions de culture :

- le milieu N gélosé agirait sur les enveloppes de *R. meliloti* par l'intermédiaire des ions NH_4^+ ; le gluconate et la faible teneur en oxygène auraient une action synergique ;
- le pléiomorphisme de la souche mutante 1N8-25 de *R. meliloti* (128, 129) est provoqué par la croissance sur le milieu d'Iswaran grâce aux effets combinés de l'extrait de levures et du gluconate ;

Ces observations sont complétées par les travaux réalisés avec d'autres espèces de *Rhizobium* à croissance rapide.

- l'extrait de levures (3,5 %) est à l'origine des malformations pariétales de *R. leguminosarum* (90, 168) ;
- un milieu enrichi en extrait de levures, "casamino acids", glucose et succinate déclenche l'apparition de formes cellulaires aberrantes chez *R. trifolii* (184).

Les pressions environnementales agissant sur la morphologie des cellules de *Rhizobium* à l'état libre sont donc essentiellement nutritives. Elles seraient différentes pour chaque espèce ou pour chaque souche. Mais, par notre travail, nous avons démontré que ces pressions étaient à l'origine de "blocages métaboliques" au niveau de l'adsorption et de l'assimilation des cations bivalents. Les principales conséquences seraient :

- des enveloppes défectueuses dans leur synthèse et leur rigidité ; ces anomalies se visualiseraient par l'hétérogénéité de l'aspect cellulaire ;
- l'arrêt des divisions.

Nos résultats confirment donc l'hypothèse émise par JORDAN et COULTER (90) sur les interventions éventuelles entre la nature chimique du milieu et l'assimilation des ions métalliques par les bactéries. Cela expliquerait aussi pourquoi les bactéroïdes artificiels possèdent moins de magnésium dans la paroi que les bâtonnets (COULTER et BRAUN, travaux non publiés).

On peut envisager que de tels phénomènes existent dans le nodule. Les pressions exercées par l'environnement de la cellule végétale sur la cellule de *Rhizobium* pourraient correspondre à celles qui sont réalisées dans le milieu N gélosé. Mais, il faut **tenir** compte du fait que la cellule hôte représente un environnement complexe ; l'intervention de certains alcaloïdes végétaux ou d'enzymes lytiques (89) n'est donc pas à négliger.

La résultante de tous ces facteurs serait la non assimilation des ions Mg^{2+} par les bactéries au sein des nodules. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de comparer la quantité de magnésium présente dans la paroi :

- des bactéroïdes intranodulaires,
- des cellules en bâtonnet,
- des cellules pléiomorphiques obtenues après culture sur le milieu N gélosé.

2°) Fonctions du pléiomorphisme chez le bactéroïde intranodulaire

Les rôles principaux du polymorphisme seraient de :

- faciliter les échanges nutritifs et gazeux entre le bactéroïde et l'hôte. Ceci aurait pour conséquences de fragiliser les enveloppes et d'augmenter la perméabilité pour certaines molécules, comme nous l'avons démontré avec le lysozyme ;
- de modifier les systèmes perméasiques pour les adapter aux voies métaboliques existant dans le nodule.

Ces modifications physiologiques, se manifestant par des changements morphologiques, seraient nécessaires mais non suffisantes à la mise en place du système nitrogénasique. En effet, si PANKHURST et CRAIG (141) ont remarqué que la souche 32H1 était pléiomorphique lorsqu'elle fixait l'azote asymbiotiquement, KANESHIRO et coll. (93) signalent que ces deux phénomènes ne sont pas toujours en relation.

En conclusion, nous proposons que les cellules pléiomorphiques obtenues en culture seraient une forme transitoire entre l'état végétatif et l'état symbiotique.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ANRAKU, Y.
Transport of sugars and amino acids in bacteria. Purification and specificity of the galactose and leucine binding proteins.
J. Biol. Chem., 1968, 243, 3116-3122.
- 2 - ANRAKU, Y.
Transport of sugars and amino acids in bacteria. Properties of galactose and leucine binding proteins.
J. Biol. Chem., 1968, 243, 3123-3127.
- 3 - AKKERMANS, A.D.L., ABDULKADIR, S. and TRINICK, M.J.
Nitrogen fixing root nodules in *Ulmaceae*.
Nature, 1978, 274, 190.
- 4 - APPLEBY, C.A. and BERGERSEN, F.J.
Cytochromes of *Rhizobium*.
Nature, 1958, 182, 1174.
- 5 - ARCHIBALD, A.R., BADDILEY, J. and HEPTINSTALL, S.
Distribution of the glucosyl substituents along the chain of the teichoic acid in walls of *Lactobacillus buchneri* NCIB 8007.
Biochem. J., 1969, 111, 245-246.
- 6 - ASHBY, S.F.
Some observations on the assimilation of atmospheric nitrogen by a free-living soil organism - *Azotobacter chroocoeum* of Beijerinck.
J. Agric. Sci., 1907, 2, 35-51.
- 7 - AUSTRIAN, R.
Morphologic variation in *Pneumococcus* and a description of a hitherto undefined morphologic variant.
J. Exp. Med., 1953, 98, 21-34.
- 8 - BADDILEY, J.
Les acides teichoïques et la paroi cellulaire bactérienne.
Endeavour, 1964, 23, 33-37.
- 9 - BADDILEY, J.
Structure, biosynthesis and function of teichoic acids.
Accounts Chem. Res., 1970, 3, 98-105.
- 10 - BAL, A.K., SHANTHARAM, S. and RATNAM, S.
Ultrastructure of *Rhizobium japonicum* in relation to its attachment to root hairs.
J. Bacteriol., 1978, 133, 1393-1400.

- 11 - BAYER, M.E.
Areas of adhesion between wall and membrane of *Escherichia coli*.
J. Gen. Microbiol., 1968, 53, 395-404.
- 12 - BERGERSEN, F.J.
The symbiotic state in legume root nodules : studies with the soybean system.
Trans. 9th Int. Cong. Soil Sci. Adelaide, 1968, 2, 49-63.
- 13 - BHAGWAT, A.A. and THOMAS, J.
Dual binding sites for peanut lectin on Rhizobia.
J. Gen. Microbiol., 1980, 117, 119-125.
- 14 - BISSET, K.A. and HALE, C.M.F.
The production of swarmers in *Rhizobium* spp..
J. Gen. Microbiol., 1951, 5, 592-595.
- 15 - BOHLOOL, B.B. and SCHMIDT, E.L.
Lectins : a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-Legume root nodule symbiosis.
Science, 1974, 185, 269-271.
- 16 - BOOS, W. and GORDON, A.S.
Transport properties of the galactose-binding protein of *Escherichia coli* occurrence of two conformational states.
J. Biol. Chem., 1971, 246, 621-628.
- 17 - BROOKS, D. and BADDILEY, J.
The mechanism of biosynthesis and direction of chain extension of a poly-(N-acetylglucosamine 1-phosphate) from the walls of *Staphylococcus lactis* NCTC 2102.
Biochem. J., 1969, 113, 635-642.
- 18 - BURDETT, I.D.J. and ROGERS, H.J.
Modification of the appearance of mesosomes in sections of *Bacillus licheniformis* according to the fixation procedures.
J. Ultrastruct. Res., 1970, 30, 354-367.
- 19 - CADMUS, M.C., BURTON, K.A. and SLODKI, M.E.
Growth related substituent changes in exopolysaccharides of fast-growing Rhizobia.
Appl. Env. Microbiol., 1982, 44, 242-245.

- 20 - CALVERT, H.E., LALENDE, M., BHUVANESWARI, T.V. and BAUER, W.D.
Role of lectins in plant-microorganism interactions. IV - Ultrastructural localization of soybean lectin binding sites on *Rhizobium japonicum*.
Can. J. Microbiol., 1978, 24, 758-793.
- 21 - CARD, G.L.
Effect of growth conditions on the phospholipid composition of *Bacillus stearothermophilus*.
Bact. Proc., 1969, 120.
- 22 - CARD, G.L., GEORGI, C.E. and MILITZER, W.E.
Phospholipids from *Bacillus stearothermophilus*.
J. Bacteriol., 1969, 97, 186-192.
- 23 - CARLSON, R.W.
Heterogeneity of *Rhizobium* lipopolysaccharides.
J. Bacteriol., 1984, 158, 1012-1017.
- 24 - CARLSON, R.W., SANDERS, R.E., NAPOLI, C. and ALBERSHEIM, P.
Host-symbiont interactions. III - Purification and partial characterization of *Rhizobium* lipopolysaccharides.
Plant Physiol., 1978, 62, 912-917.
- 25 - CHILD, J.J. and SIETSMA, J.H.
Spheroplasts from *Rhizobium japonicum*.
Plant. Sc. Lett., 1975, 4, 267-271.
- 26 - CHIN, T., BURGER, M.M. and GLASER, L.
Synthesis of teichoic acids. VI - The formation of multiple wall polymers in *Bacillus subtilis* W-23.
Archs. Biochem. Biophys., 1966, 116, 358-367.
- 27 - CHING, T.M., HEDTKE, S. and NEWCOMB, W.
Isolation of bacteria, transforming bacteria and bacteroids from soybean nodules.
Plant Physiol., 1977, 60, 771-774.
- 28 - CLAPP, C.E. and DAVIS, R.
Properties of extracellular polysaccharides from *Rhizobium*.
Soil Biol. Biochem., 1970, 2, 109-117.

- 29 - CLARKE, K., GRAY, G.W. and REAVELEY, D.A.
The cell walls of *Pseudomonas aeruginosa*. General composition.
Biochem. J., 1967, 105, 749-754.
- 30 - CLARKE, K., GRAY, G.W. and REAVELEY, D.A.
The extraction of cell walls of *Pseudomonas aeruginosa* with aqueous phenol. Material from the phenol layer.
Biochem. J., 1967, 105, 755-758.
- 31 - CLARKE K., GRAY, G.W. and REAVELEY, D.A.
The extraction of cell walls of *Pseudomonas aeruginosa* with aqueous phenol. The insoluble residue and material from the aqueous layers.
Biochem. J., 1967, 105, 759-765.
- 32 - CORNER, T.R. and MARQUIS, R.E.
Why do bacterial protoplasts burst in hypotonic solutions ?
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 183, 544-558.
- 33 - COURTOIS B., DERIEUX, J.C. et HORNEZ, J.P.
Etude des polysides de *Rhizobium* à croissance rapide.
Ann. Microbiol. Inst. Pasteur Paris, 1975, 126B, 3-15.
- 34 - COURTOIS B., HORNEZ, J.P. et DERIEUX, J.C.
Effet de la synthèse d'acide 2 cêto-gluconique sur la production d'exopolysaccharides par une souche de *Rhizobium meliloti*.
Can. J. Microbiol., 1979, 25, 1191-1196.
- 34bis - COURTOIS, B., HORNEZ, J.P., COURTOIS, J. et DERIEUX, J.C.
Mise en évidence d'une propriété métabolique de *Rhizobium meliloti* utilisable pour sa classification.
Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 1983, 134A, 141-147.
- 35 - COWLES, J.R., EVANS, H.J. and RUSSEL, S.A.
B12 coenzyme-dependant ribonucleotide reductase in *Rhizobium* species and the effects of cobalt deficiency on the activity of the enzyme.
J. Bacteriol., 1969, 97, 1460-1465.
- 36 - CUTINELLI, C. and GALDIERO, F.
Ion-binding properties of the cell wall of *Staphylococcus aureus*.
J. Bacteriol., 1967, 93, 2022-2023.
- 37 - DART, P.J.
Infection and development of leguminous nodules.
In : "A treatise on dinitrogen Fixation". Section 3 "Biology", ed. SILVER, W.S., 1977, 367-472. Wiley (Interscience), New-York.

37bis - DART, P.J. and MERCER, F.V.

The intracytoplasmic membrane system of the bacteroids of *subterraneum* clover nodules (*Trifolium subterraneum* L.).

Arch. Mikrobiol., 1963, 47, 1-18.

38 - DAWSON, M.H.

Variation in the *Pneumococcus*.

J. Path. Bact., 1934, 39, 323.

39 - DAZZO, F.B. and HUBBEL, D.H.

Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover association.

Appl. Microbiol., 1975, 30, 1017-1033.

40 - DAZZO, F.B., NAPOLI, C.A. and HUBBEL, D.H.

Adsorption of bacteria to root as related to host specificity in the *Rhizobium*-clover symbiosis.

Appl. Env. Microbiol., 1976, 32, 166-171.

41 - DELATTRE, J.M.

Introduction à une étude génétique du genre *Rhizobium*.

Thèse de Docteur-Ingénieur, n°121, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 1971.

42 - DENARIE, J. et TRUCHET, G.

La symbiose *Rhizobium*-Légumineuses : rôles respectifs des partenaires.

Physiol. Vég., 1979, 17, 643-667.

42bis - DE SMEDT, J. and DE LEY, J.

Intra and intergenetic similarities of *Agrobacterium* ribosomal ribonucleic acid cistrons

Int. J. system. Bact., 1977, 27, 222-240.

43 - DE VRIES, G.É., Van BRUSSEL, A.A.N. and QUISPÉL, A.

Mecanism and regulation of glucose transport in *Rhizobium leguminosarum*.

J. Bacteriol., 1982, 149, 872-879.

44 - DIENES, L. and WEINBERGER, H.J.

The L Forms of bacteria.

Bact. Rev., 1951, 15, 245-288.

45 - DIENES, L. and ZAMECNIK, P.C.

Transformation of bacteria into L Forms by amino acids.

J. Bacteriol., 1952, 64, 770-771.

46 - DREYFUS, B.M., ELMERICH, C. and DOMMERGUES, Y.R.

Free-living *Rhizobium* strain able to grown on N₂ as the sole nitrogen source.

Appl. Env. Microbiol., 1983, 45, 711-713.

- 47 - DRÖGE, W., LEHMAN, J., LÜDERITZ, O. and WESTPHAL, O.
Structural investigations on the 2-keto-3-deoxyoctonate region of
lipopolysaccharides.
Eur. J. Biochem., 1970, 14, 175-184.
- 48 - DUDMAN, W.F.
Capsulation in *Rhizobium* species.
J. Bacteriol., 1968, 95, 1200-1201.
- 49 - DUGUID, J.P.
The sensitivity of bacteria to the action of penicillin.
Edinburgh Med. J., 1946, 53, 401.
- 50 - DUGUID, J.P.
The demonstration of bacterial capsules and slime.
J. Pathol. and Bacteriol., 1951, 63, 673-685.
- 51 - DUGUID, J.P. and WILKINSON, J.F.
Environmentally induced changes in bacterial morphology.
11th Symp. Soc. for General Microbiology, 1961, 11, 69-99, Ed.
Cambridge, Univ. London.
- 52 - ELLWOOD, D.C.
The distribution of 2-keto-3-deoxy-octonic acid in bacterial walls.
J. Gen. Microbiol., 1970, 60, 373-380.
- 53 - ELLWOOD, D.C.
The wall content and composition of *Bacillus subtilis* var. *niger*
grown in a chemostat.
Biochem. J., 1970, 118, 367-373.
- 54 - ELLWOOD, D.C. and TEMPEST, D.W.
The teichoic acids of *Bacillus subtilis* var. *niger* and *Bacillus subtilis*
W23 grown in a chemostat.
Biochem. J., 1968, 108, 40P.
- 55 - ELLWOOD, D.C. and TEMPEST, D.W.
Control of teichoic acid and teichuronic acid biosynthesis in chemos-
tat culture of *Bacillus subtilis* var. *niger*.
Biochem. J., 1969, 111, 1-5.

- 56 - ELLWOOD, D.C. and TEMPEST, D.W.
Influence of growth environment on the cell wall anionic polymers in some Gram-positive bacteria.
J. Gen. Microbiol., 1969, 57, XV.
- 57 - ELLWOOD, D.C. and TEMPEST, D.W.
Environmental effects on bacterial walls.
In : "Advances in Microbial Physiology", 1972, 7, 83-117. Ed. ROSE, A.H. and TEMPEST, D.W. Academic Press, London and New-York.
- 58 - FALK, J.E., APPLEBY, C.A. and PORRA, R.J.
The nature, function and biosynthesis of the haem compounds and porphyrins of legume root nodules.
Symp. Soc. Exptl. Biol., 1959, 13, 73-86.
- 59 - FERNANDEZ-ARIAS, H., GOURRET, J.P., LENORMAND, M. et COLENO, A.
Etude ultrastructurale de deux bactéries en culture, *Pseudomonas phaseolicola* (Burck) Dowson et *Rhizobium trifolii*.
C. R. Acad. Sc. Paris, 1973, 277, 1709-1712.
- 60 - FISCHER, A.
Die Empfindlichkeit der Bakterienzelle und das baktericide Serum.
Z. Hyg. Infekt. Kr., 1900, 35, 1.
- 61 - FORSBERG, C.W., COSTERTON, J.W. and MAC LORD, R.A.
Separation and localization of cell wall layers of a Gram-negative bacterium.
J. Bacteriol., 1970, 104, 1338-1353.
- 62 - FRERMAN, F.E. and WHITE, D.C.
Membrane lipid changes during formation of a functional electron transport system in *Staphylococcus aureus*.
J. Bacteriol., 1967, 94, 1868-1874.
- 63 - GARRETT, A.J.
The effects of magnesium ion deprivation on cell-wall synthesis and accumulation of amino-sugars in *Bacillus subtilis*.
Biochem. J., 1968, 106, 40P-41P.
- 64 - GARRETT, A.J.
The effect of magnesium ion deprivation on the synthesis of mucopeptide and its précurseurs in *Bacillus subtilis*.
Biochem. J., 1969, 115, 419-430.

- 65 - GERSON, T. and PATEL, J.J.
Neutral lipids and phospholipids of free-living and bacteroid forms of two strains of *Rhizobium* infective on *Lotus pedunculatus*.
Appl. Microbiol., 1975, 30, 193-198.
- 66 - GHAI, J.K., HISAMATSU, M., AMEMURA, A. and HARADA, T.
Production and chemical composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium*.
J. Gen. Microbiol., 1981, 122, 33-40.
- 67 - GHUYSEN, J.M.
Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism.
Bact. Rev., 1968, 32, 425-464.
- 68 - GHUYSEN, J.M., STROMINGER, J.L. and TIPPER, D.J.
In : "Comprehensive Biochemistry", eds. FLORKIN, M. and STOTZ, E.H., 1968, 26A, 53-104, American Elsevier, New-York.
- 69 - GHUYSEN, J.M. and LEYH-BOUILLE, M.
The primary structure of bacterial wall peptidoglycans. *In the Symposium* : "The cell wall and the cytoplasmic membrane of bacteria".
J. Gen. Microbiol., 1969, 57, I-II.
- 70 - GLAUERT, A.M. and THORNLEY, M.J.
The topography of the bacterial cell wall.
Ann. Rev. Microbiol., 1969, 23, 159-198.
- 71 - GLENN, A.R. and DILWORTH, M.J.
The uptake and hydrolysis of disaccharides by fast -and slow- growing species of *Rhizobium*.
Arch. Microbiol., 1981, 129, 233-240.
- 72 - GMEINER, J., LÜDERITZ, O. and WESTPHAL, O.
Biochemical studies on lipopolysaccharides of *Salmonella* R mutants.
6. Investigations on the structure of the lipid A component.
Eur. J. Biochem., 1969, 7, 370-379.
- 73 - GOODER, H.
In : "Microbial protoplasts, spheroplasts and L Forms". Ed. GUZE, L.B., 1968, 40-51, Williams and Wilkins, New-York.
- 74 - GRAHAM, P.H. and O'BRIEN, M.A.
Composition of lipopolysaccharides from *Rhizobium* and *Agrobacterium*.
Antonie van Leeuwenhoek, 1968, 34, 326-330.

- 74bis - GRESSHOFF, P.M. and ROLFE, B.G.
Viability of *Rhizobium* bacteroids isolated from soybean nodule protoplasts.
Planta, 1978, 142, 329-333.
- 75 - GRULA, E.A., SMITH, G.L. and GRULA, M.M.
Cell division in a species of *Erwinia*. VIII - Amino acid composition of the mucopeptide in dividing and non-dividing cells.
Can. J. Microbiol., 1965, 11, 605-610.
- 76 - HANCOCK, I.C. and MEADOW, P.M.
The extractable lipids of *Pseudomonas aeruginosa*.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 187, 366-379.
- 77 - HARADA, T.
Succinoglucan 10 C3 : a new acidic polysaccharide of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*.
Arch. Biochem. Biophys., 1965, 112 : 65-69.
- 77bis - HARADA, T. and AMEMURA, M.
Comparative studies of polysaccharides elaborated by *Rhizobium*, *Alcaligenes* and *Agrobacterium*.
Carbohydr. Res., 1979, 77, 285-288.
- 78 - HEPTINSTALL, S., ARCHIBALD, A.R. and BADDILEY, J.
Teichoic acids and membrane function in bacteria.
Nature, 1970, 225, 519-521.
- 79 - HIGGINS, M.L. and SHOCKMAN, G.D.
Early changes in the ultrastructure of *Streptococcus faecalis* after amino acid starvation.
J. Bacteriol., 1970, 103, 244-254.
- 80 - HIGHTON, P.J.
An electron microscopic study of cell growth and mesosomal structure of *Bacillus licheniformis*.
J. Ultrastruct. Res., 1969, 26 : 130-147.
- 81 - HIRSCH, A.M., WILSON, K.J., JONES, J.D.G., BANG, M., WALKER, V.V. and AUSUBEL, F.M.
Rhizobium meliloti nodulation genes allow *Agrobacterium tumefaciens* and *Escherichia coli* to form pseudonodules on alfalfa.
J. Bacteriol., 1984, 158, 1133-1143.
- 82 - HORNEZ, J.P., COURTOIS, B., DEFIVES, C. et DERIEUX, J.C.
Etude des membranes internes dans les bactéroïdes de *Rhizobium meliloti* au sein des nodules de luzerne (*Medicago sativa*).
C. R. Acad. Sc. Paris, 1974, 278, 157-159.

- 83 - HORNEZ, J.P., COURTOIS, B. et DERIEUX, J.C.
Mise en évidence de voies de métabolisme différentes à partir du glucose et du fructose chez *Rhizobium meliloti*.
C. R. Acad. Sc. Paris, 1976, 283D, 1559-1562.
- 84 - HUGUES, R.C.
The cell wall of *Bacillus licheniformis* NCTC 6346. Linkage between the teichuronic acid and mucopeptide components.
Biochem. J., 1970, 117, 431-439.
- 85 - HUGUES, R.C., PAVLIK, J.G., ROGERS, H.J. and TANNER, P.J.
Organization of polymers in the cell walls of some bacille.
Nature, 1968, 219, 642-644.
- 86 - HUDMAN, J.F. and GLENN, A.R.
Glucose uptake by free living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum*.
Arch. Microbiol., 1980, 128, 72-77.
- 87 - HUMPHREY, B., EDGLEY, M. and VINCENT, J.M.
Absence of mannose in the extracellular polysaccharide of fast-growing Rhizobia.
J. Gen. Microbiol., 1974, 81, 267-270.
- 88 - JEENER, H. and JEENER, R.
Cytological studies of *Thermobacterium acidophilus* R36 cultured in absence of deoxyribonucleosides or uracil.
Exp. Cell Res., 1952, 3, 675-680.
- 89 - JORDAN, D.C.
The bacteroids of the genus *Rhizobium*.
Bact. Rev., 1962, 26, 119-141.
- 90 - JORDAN, D.C. and COULTER, W.H.
On the cytology and synthetic capacities of natural and artificially produced bacteroids of *Rhizobium leguminosarum*.
Can. J. Microbiol., 1965, 11, 709-720.
- 91 - KAMBERGER, W.
An ouchterlony double diffusion study on the interaction between legume lectins and rhizobial cell surface antigens.
Arch. Microbiol., 1979, 121, 83-90.

- 92 - KANESHIRO, T., NEWTON, J.W., SELKE, E. and SLODKI, M.E.
Dinitrogen ($^{15}\text{N}_2$) fixation and acetylene reduction in free-living strains of *Rhizobium*.
Curr. Microbiol., 1980, 3, 279-281.
- 93 - KANESHIRO, T., BAKER, F.L. and JOHNSON, D.C.
Pleomorphism and acetylene-reducing activity of free-living Rhizobia.
J. Bacteriol., 1983, 153, 1045-1050.
- 94 - KEISTER, D.L.
Acetylene reduction by pure cultures of Rhizobia.
J. Bacteriol., 1975, 123, 1265-1268.
- 95 - KEPES, A.
The β -galactoside permease of *Escherichia coli*.
J. Membrane Biol., 1971, 4, 87-112.
- 96 - KIDBY, D.K. and GOODCHILD, D.J.
Host influence on the ultrastructure of root nodules of *Lupinus luteus* and *Ornithopus sativus*.
J. Gen. Microbiol., 1966, 45, 147-152.
- 96bis - KIDBY, D.K. and PARKER, C.A.
In : "Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in Legumes".
Ann. Rev. Plant. Physiol., 1971, 22, 121-140.
- 97 - KLIENEBERGER, E.
The natural occurrence of *Pleuropneumonia* - like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and others bacteria.
J. Pathol. Bacteriol., 1935, 11, 93-105.
- 98 - KLIENEBERGER, E.
L Forms of bacteria. In : "The Bacteria", 1960, 1, 361-386, Eds. GUNSALUS, I.C. and STANIER, R.Y., Acad. Press, London.
- 99 - KNIVETT, V.A. and CULLEN, J.
Some factors affecting cyclopropane acid formation in *Escherichia coli*.
Biochem. J., 1965, 96, 771-776.
- 100 - KNIVETT, V.A. and CULLEN, J.
Fatty acid synthesis in *Escherichia coli*.
Biochem. J., 1967, 103, 299-306.

- 101 - KOCON, J.
Ultrastructure of bacteroids in nodules of red clover (*Trifolium pratense*) shown in transmission and scanning electron microscopy.
Bull. Acad. Polonaise Sci., 1980, 27, 529-532.
- 102 - KOCUN, F.J.
Amino acid containing phospholipids as major components of the phospholipids of *Streptococcus faecalis* 10 CI.
Biochim. Biophys. Acta, 1970, 202, 277-282.
- 103 - KOLENBRANDER, P.E. and ENSIGN, J.C.
Isolation and chemical structure of the peptidoglycan of *Spirillum serpens* cell walls.
J. Bacteriol., 1968, 95, 201-210.
- 104 - KORN, E.D.
Cell membranes : structure and synthesis.
Annu. Rev. Biochem., 1969, 38, 263-288.
- 105 - KUNDIG, W., GHOSH, S. and ROSEMAN, S.
Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1964, 52, 1067-1074.
- 106 - KURTZ, W.G.W. and LARUE, T.A.
Nitrogenase activity in Rhizobia in absence of plant host.
Nature, 1975, 256, 407-409.
- 107 - LACEY, B.W.
In : Microbial reaction to environment : non-genetic variation of surface antigens in *Bordetella* and other micro-organisms.
11th Symp. Soc. Gen. Microbiol., 1961, 11, 343-390.
- 108 - LANG, D.R. and LUNDGREN, D.G.
Lipid composition of *Bacillus cereus* during growth and sporulation.
J. Bacteriol., 1970, 101, 483-489.
- 109 - LEDERBERG, J. and St CLAIR, J.
Protoplasts and L type growth of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 1958, 75, 143-160.
- 110 - LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J.
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chemistry, 1951, 193, 265-275.

- 111 - LÜDERITZ, O.
Neuere Ergebnisse zur Biochemie der Zellwand - Lipopolysaccharide von *Salmonella* Bakterien.
Angew. Chem. Dtsch., 1970, 82, 708-722.
- 112 - LÜDERITZ, O., JANN, K. and WHEAT, R.
In comprehensive biochemistry.
Eds. FLORKIN, M. and STOTZ, E.H., 1968, 26A, 105-228, American Elsevier, New-York.
- 113 - LUFT, J.H.
Improvements in epoxy resin embedding methods.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 9, 409.
- 114 - LUFT, J.H.
Ruthenium red staining of the striated muscle cell membrane and the myothendinal junctions.
Proc. 6 Intern. Congr. Electr. Micr. Kyoto, 1966, 2, 65.
- 115 - LUFT, J.H.
Ruthenium red and violet I. Chemistry, purification methods of use for electron microscopy and mechanism of action.
Anat. Rec., 1971, 172, 347.
- 116 - MAC COMB, J.A., ELLIOT, J. and DILWORTH, M.J.
Acetylene reduction by *Rhizobium* in pure culture.
Nature, 1975, 256, 409-410.
- 117 - MAC KENZIE, C.R., VAIL, W.J. and JORDAN, D.C.
Ultrastructure of free-living and nitrogen-fixing forms of *Rhizobium meliloti* as revealed by freeze-etching.
J. Bacteriol., 1973, 113, 387-393.
- 118 - MAC QUILLEN, K.
Bacterial protoplasts. In : "The Bacteria", Eds. GUNSALUS, I.C. and STANIER, R.Y., 1960, 1, 249-359, Acad. Press, New-York.
- 119 - MARR, A.G. and INGRAHAM, J.L.
Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 1962, 84, 1260-1267.

- 120 - MARSHALL, K.C., CRUICKSHANK, R.H. and BUSHBY, H.V.A.
The orientation of certain root-nodule bacteria at interfaces including legume root-hair surfaces.
J. Gen. Microbiol., 1975, 91, 198-200.
- 121 - MATTHEW, D.D. and ROSENBLUM, E.D.
Kinetics of adsorption of staphylococcal phage and cellular binding sites.
Bact. Proc., 1967, 144.
- 122 - MEDILL, M.A. and O'KANE, D.J.
A synthetic medium for the L type colonies of *Proteus*.
J. Bacteriol., 1954, 68, 530-533.
- 123 - MICHL, H.
Monatsh. Chem., 1951, 82, 489.
- 124 - MILLER, R.W. and TREMBLAY, P.A.
Cytoplasmic membrane of *R. meliloti* bacteroids. I - Alterations in lipid composition, physical properties and respiratory proteins.
Can. J. Biochem. Cell Biol., 1983, 61, 1334-1340.
- 125 - MITCHELL, P.D. and MOYLE, J.M.
Osmotic function and structure in bacteria.
Symp. Soc. Gen. Microbiol., 1956, 6, 150-180.
- 125bis - MOFFLET, M.L. and COLWELL, R.L.
Adansonian analysis of the *Rhizobiaceae*.
J. Gen. Microbiol., 1968, 51, 245-266.
- 126 - MORT, A.J. and BAUER, W.D.
Composition of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum* : changes with culture age and correlations with binding of soybean seed lectin on the bacteria.
Plant Physiol., 1980, 66, 158-163.
- 127 - MROZ, C.
Etude d'un mutant pléiomorphe de *Rhizobium meliloti*.
Mémoire de D.E.A., Université des Sciences et Techniques de Lille I, 1982.
- 128 - MROZ, C., COURTOIS, B., HORNEZ, J.P. and DERIEUX, J.C.
Characterization of a pleiomorphic mutant of *Rhizobium meliloti*.
5th Int. Symp. of Nitrogen Fixation, Netherlands, 1983.

- 129 - MROZ, C., COURTOIS, B., HORNEZ, J.P. and DERIEUX, J.C.
Isolation and characterization of a pleiomorphic mutant of *Rhizobium meliloti*.
Symbiotic Nitrogen Fixation (1), 1984, Ed. GHAI, B.S., USG Publishers and Distributors, Ludhiana (India).
- 130 - MUTAFTSCHIEV, S., VASSE, J. and TRUCHET, G.
Exostructures of *Rhizobium meliloti*.
FEMS Microbiol. Lett., 1982, 13, 171-175.
- 131 - NANDI, A.S. and SEN, S.P.
Mutants of *Rhizobium* capable of fixing N₂ in the free-living condition.
Arch. Microbiol., 1981, 130, 147-149.
- 132 - NIMMICH, W.
Zur Frage der Bindung von Kapsel-Antigenen an Bestandteile der Bakterienzellwand.
Acta Biol. Med. Germ., 1969, 22, 191-195.
- 132bis - NORRIS, D.O.
Rhizobium needs magnesium, not calcium.
Nature, 1958, 182, 734-735.
- 133 - NORRIS, D.O.
The role of calcium and magnesium in the nutrition of *Rhizobium*.
Aust. J. Agric. Res., 1959, 10, 651-698.
- 133bis - OCHIN, D.
La production en masse et la préparation de cellules déshydratées de *Rhizobium*.
Thèse de Doctorat de 3^{ème} Cycle, n°831, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 1980.
- 134 - O'GARA, F. and SHANMUGAN, K.T.
Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia export of fixed N₂ as NH₄⁺.
Bioch. Biophys. Acta, 1976, 437, 313-321.
- 135 - OKUYAMA, H.
Phospholipid metabolism in *Escherichia coli* after a shift in temperature.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 176, 125-134.
- 136 - OSBORN, M.J.
Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall.
A. Rev. Bioch., 1969, 38, 501-538.
- 137 - PAAU, A.S. and COWLES, J.R.
Development of bacteroids in alfalfa (*Medicago sativa*) nodules.
Plant Physiol., 1978, 62, 526-530.

- 138 - PAAU, A.S., LEPS, W.T. and BRILL, W.J.
Agglutinin from alfalfa necessary for binding and nodulation by
Rhizobium meliloti.
Science, 1981, 213, 1513-1515.
- 139 - PAGAN, J.D., CHILD, J.J., SCOWCROFT, W.R. and GIBSON, A.H.
Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium.
Nature, 1975, 256, 406-407.
- 140 - PANKHURST, C.E.
Nutritional requirement for the expression of nitrogenase activity
by *Rhizobium* sp. in agar culture.
J. Appl. Bacteriol., 1981, 50, 45-54.
- 141 - PANKHURST, C.E. and CRAIG, A.S.
Effect of oxygen concentration, temperature and combined nitrogen
on the morphology and nitrogenase activity of *Rhizobium* sp. strain
32H1 in agar culture.
J. Gen. Microbiol., 1978, 106, 207-219.
- 142 - PARK, J.T.
Selective inhibition of bacterial cell wall synthesis : its possible
applications in chemotherapy.
In : "The strategy of chemotherapy". *Symp. Soc. gen. Microbiol.*, 1958,
8, 49-61.
- 143 - PARTRIDGE, S.M.
Biochem. Soc. Symposia, 1949, 3, 52.
- 144 - PLANQUÉ, K. and KIJNE, J.W.
Binding of pea lectins to a glycan type polysaccharide in the cell
walls of *Rhizobium leguminosarum*.
FEBBS Lett., 1977, 73, 64-66.
- 145 - PLANQUÉ, K., VAN NIEROP, J.J., BURGERS, A., WILKINSON, S.G.
The lipopolysaccharide of free-living and bacteroid forms of *Rhizobium*
leguminosarum.
J. Gen. Microbiol., 1979, 110, 151-159.

- 146 - REAVELEY, D.A. and BURGE, E.
Walls and membranes in bacteria.
In : "Advances in Microbial Physiology", 1972, 7, 1-81. Ed. ROSE, A.H.,
Acad. Press, London and New-York.
- 147 - REES, D.A.
Shapely polysaccharides.
Biochem. J., 1972, 126, 257-273.
- 148 - REIJINDERS, L.
The origin of endosymbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium*.
J. Theor. Biol., 1976, 61, 245-248.
- 148bis - REYNOLDS, E.S.
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in
electron microscopy.
J. Cell. Biol., 1963, 17, 208.
- 149 - REYROLLE, J. and LETELLIER, F.
Morphological modifications of bacteria induced by spatial constraints.
J. Gen. Microbiol., 1977, 99, 431-433.
- 150 - RIGAUD, J., BERGERSEN, F.J., TURNER, G.T. and DANIEL, R.M.
Nitrate dependent anaerobic acetylene-reduction and nitrogen fixation
by soybean bacteroids.
J. Gen. Microbiol., 1973, 77, 137-144.
- 151 - RIGAUD, J., TRINCHANT, J.C. et PUPPO, A.
Etude physiologique du bactéroïde extrait des nodosités de Légumineuses.
Compte-rendu D.G.R.S.T., 1980.
- 152 - ROGERS, H.J. and PERKINS, H.R.
In : "Cell walls and membranes", 1968, ed. SPON, E.F. and N, LTD,
London.
- 153 - ROMEO, D., GIRARD, A. and ROTHFIELD, L.
Reconstitution of a functional membrane enzyme system in a monomolecu-
lar film. I - Formation of a mixed monolayer of lipopolysaccharide and
phospholipid.
J. Molec. Biol., 1970, 53, 475-490.

- 154 - RUSSA, R., URBANIK, T., ZURKOWSKI, W. and LORKIEWICZ, Z.
Neutral sugars in lipopolysaccharides of *Rhizobium trifolii* and its non-nodulating mutant.
Plant and Soil, 1981, 61, 81-85.
- 155 - SALTON, M.R.J.
Surface layers of the bacterial cell.
In : "The Bacteria", 1960, 1, 97-151. Eds. GUNSALUS, I.C. and STANIER, R.Y., Acad. Press, New-York and London.
- 156 - SALTON, M.R.J.
In : "The Bacterial Cell Wall", 1964, Elsevier Pub. Co., Amsterdam.
- 157 - SALTON, M.R.J. and NETSCHEY, A.
Physical chemistry of isolated bacterial membranes.
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 107, 539-545.
- 158 - SATO, K., INUKAI, S. and SHIMIZU, S.
Vitamin B₁₂-dependant methionine synthesis in *Rhizobium meliloti*.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, 60, 723-728.
- 159 - SATO, K., SEKI, T., INUKAI, S. and SHIMIZU, S.
Effects of vitamin B₁₂-dependant enzymes and folate compounds on morphological changes of *Rhizobium meliloti*.
Agric. Biol. Chem., 1982, 46, 501-505.
- 160 - SCHEIE, P.
Osmotic pressure in *Escherichia coli* as rendered detectable by lysozyme attack.
J. Bacteriol., 1973, 114, 549-555.
- 161 - SCHLEIFER, K.H.
Substrate dependant modifications of the amino acid sequence of the murein of staphylococci.
J. Gen. Microbiol., 1969, 57, XIV.
- 162 - SCHLEIFER, K.H., HUSS, L. and KANDLER, O.
Die Beeinflussung der Aminosäuresequenz des Serinhaltigen Mureins von *Staphylococcus epidermidis* Stamm 24 durch die Nährbodenzusammensetzung.
Arch. Mikrobiol., 1969, 68, 387-404.

- 163 - SCHLEIFER, K.H. and KANDLER, O.
Amino acid sequence of the murein of *Planococcus* and other *Micrococca-*
ceae.
J. Bacteriol., 1970, 103, 387-392.
- 164 - SCHWARZ, U. and LEUTGEB, W.
Morphogenetic aspects of murein structure and biosynthesis.
J. Bacteriol., 1971, 106, 588-595.
- 165 - SCHWINGHAMER, E.A.
A method for improved lysis of some Gram-negative bacteria.
FEMS Microbiol. Lett., 1980, 7, 157-162.
- 166 - SHAW, M.K. and INGRAHAM, J.L.
Fatty acid composition of *Escherichia coli* as a possible controlling
factor of the minimal growth temperature.
J. Bacteriol., 1965, 90, 141-146.
- 167 - SHOCKMAN, G.D., KOLB, J.J., BAKAY, B., CONOVER, M.J. and TOENNIS, G.
Protoplast membrane of *Streptococcus faecalis*.
J. Bacteriol., 1963, 85, 168-176.
- 168 - SKINNER, F.A., ROUGHLEY, R.J. and CHANDLER, M.R.
Effect of yeast extract concentration on viability and cell distortion
in *Rhizobium* spp.
J. Appl. Bacteriol., 1977, 43, 287-297.
- 169 - SLONEKER, J.H. and ORENTAS, D.G.
Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccha-
ride.
Nature, 1962, 194, 478-479.
- 170 - STINSON, M.W., COHEN, M.A. and MERRICK, J.M.
Isolation of dicarboxylic acid and glucose binding proteins from
B. aeruginosa.
J. Bacteriol., 1976, 128, 573-579.
- 171 - SUTHERLAND, I.W.
Formate a new component of bacterial exopolysaccharides.
Nature, 1970, 228, 280.

- 172 - SUTHERLAND, I.W.
In : "Surface carbohydrates of the Procaryotic cell".
Acad. Press, London, New-York, San Francisco, 1977.
- 173 - SUTTON, W.D. and PATERSON, A.D.
The detergent sensitivity of *Rhizobium* bacteroids and bacteria.
Plant Sci. Lett., 1979, 16, 377-385.
- 174 - SUTTON, W.D. and PATERSON, A.D.
Effect of the plant host on the detergent sensitivity and viability
of *Rhizobium* bacteroids.
Planta, 1980, 148, 287-292.
- 175 - TEMPEST, D.W. and STRANGE, R.E.
Variation in content and distribution of magnesium, and its influence
on survival, in *Aerobacter aerogenes* grown in a chemostat.
J. Gen. Microbiol., 1966, 44, 273-279.
- 176 - THEODOROPOULOS, P.
Contribution à l'étude du transport du glucose chez *Rhizobium meliloti*.
Mémoire de D.E.A., 1982, Université des Sciences et Techniques de
Lille I.
- 177 - TIPPER, D.J. and STROMINGER, J.L.
Isolation of 4-O- β -N-acetylmuramyl-N-acetylglucosamine and 4-O- β -N,6-O-
Diacetylmuramyl-N-acetylglucosamine and the structure of the cell
wall polysaccharide of *Staphylococcus aureus*.
Biochim. Biophys. Res. Comm., 1966, 22, 48-56.
- 178 - TIPPER, D.J., STROMINGER, J.L. and ENSIGN, J.C.
Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen.
VII - Mode of action of the bacteriolytic peptidase from *Myxobacter*
and the isolation of intact cell wall polysaccharides.
Biochemistry, 1967, 6, 906-920.
- 179 - TIPPER, D.J. and BERMAN, M.F.
Structures of the cell wall peptidoglycans of *Staphylococcus epidermis*
Texas 26 and *Staphylococcus aureus* Copenhagen. Chain length and average
sequence of cross-bridge peptides.
Biochemistry, 1969, 8, 2183-2192.

- 180 - TJEPKEMA, J. and EVANS, H.J.
Nitrogen fixation by free-living *Rhizobium* in a defined liquid medium.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 65, 625-628.
- 181 - TRINCHANT, J.C., BIROT, A.M. and RIGAUD, J.
Oxygen supply and energy-yielding substrates for nitrogen fixation
(acetylene reduction) by bacteroid preparations.
J. Gen. Microbiol., 1981, 125, 159-165.
- 182 - TRINICK, M.J.
Symbiosis between *Rhizobium* and the non-legume, *Trema aspera*.
Nature, 1973, 244, 459-460.
- 183 - TU, J.C. and BRAYBROOK, G.
Structural organization of the Rhizobial root nodules of clover.
Microbios., 1981, 32, 77-88.
- 184 - URBAN, J.E.
Nondividing, bacteroid-like *Rhizobium trifolii* : *in vitro* induction
via nutrient enrichment.
Appl. Env. Microbiol., 1979, 38, 1173-1178.
- 185 - VAN BRUSSEL, A.A.N.
Ph. D. Thesis, 1973, University of Leiden, The Netherlands.
- 186 - VAN BRUSSEL, A.A.N., PLANQUÉ, K. and QUISPÉL, A.
The wall of *Rhizobium leguminosarum* in bacteroid and free-living
forms.
J. Gen. Microbiol., 1977, 101, 51-56.
- 187 - VAN BRUSSEL, A.A.N., COSTERTON, J.W. and CHILD, J.J.
Nitrogen fixation by *Rhizobium* sp. 32H1. A morphological and ultrastruc-
tural comparison of asymbiotic and symbiotic nitrogen-fixing forms.
Can. J. Microbiol., 1979, 25, 352-361.
- 187bis - VINCENT, J.M.
Influence of calcium and magnesium on the growth of *Rhizobium*.
J. Gen. Microbiol., 1962, 28, 653-663.
- 188 - VINCENT, J.M. and COLBURN, J.R.
Cytological abnormalities in *R. trifolii* due to a deficiency of
calcium or magnesium.
Aust. J. Sci., 1961, 23, 269-270.

- 188bis - VINCENT, J.M., HUMPHREY, B. and NORTH, R.J.
 Some features of the fine structure and chemical composition of
Rhizobium trifolii.
J. Gen. Microbiol., 1962, 29, 551-555.
- 189 - WANG, W.S. and LUNDGREN, D.G.
 Peptidoglycan of a chemolithotropic bacterium, *Ferrobacillus ferro-*
oxidans.
J. Bacteriol., 1968, 95, 1851-1856.
- 190 - WARD, J.B. and PERKINS, H.R.
 The chemical composition of the membranes of protoplasts and L-Forms
 of *Staphylococcus aureus*.
Biochem. J., 1968, 106, 391-400.
- 191 - WEIBULL, C.
 In : "Microbial protoplasts, spheroplasts and L-Forms". ed. GUZE, L.B.,
 1968, 62-73, Williams and Wilkins, New-York.
- 192 - WEIDEL, W. and PELZER, H.
 Bagshaped macromolecules. A new outlook on bacterial cell walls.
Adv. Enzymol., 1964, 26, 193-232.
- 193 - WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O. and BISTER, F.
 Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser.
Zeitschrift für Naturforschung, 1952, 7b, 148-155.
- 194 - WILKINSON, J.F., DUGUID, J.P. and EDMUNDS, P.N.
 Distribution of polysaccharide production in *Aerobacter* and *Escherichia*
coli and its relation to antigenic character.
J. Gen. Microbiol., 1954, 11, 59-70.
- 195 - WILSON, J.K.
 Physiological studies of *Bacillus radicicola* of soybean (*Soja max* Piper)
 and of factors influencing nodule production.
Bull. Cornell Agric. Exp. Sta., 1917, 386, 369-413.
- 196 - WOLD, F.
 In : "Macromolecules : structure and fonction". Prentice-Hall Englewood
 Cliffs, New Jersey, 1971.
- 197 - WOLPERT, J.S. and ALBERSHEIM, P.
 Host-symbiont interactions. I - The lectins of legumes interact with
 the O-antigen - containing lipopolysaccharides of their symbiont
 Rhizobia.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, 70, 729-737.

- 198 - WONG, C.H., PANKHURST, C.E., KONDOROSI, A. and BROUGHTON, W.J.
Morphology of root nodules and nodule-like structures formed by
Rhizobium and *Agrobacterium* strains containing a *Rhizobium meliloti*
megaplasmid.
J. Cell Biol., 1983, 97, 787-794.
- 199 - YOUNG, F.E.
Requirement of glucosylated teichoic acid for adsorption of phage in
Bacillus subtilis 168.
Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1967, 58, 2377-2384.
- 200 - YOUNG, F.E.
Variation in the chemical composition of the cell walls of *Bacillus*
subtilis during growth in different media.
Nature, 1965, 207, 104-105.
- 201 - ZAMENHOF, S., DE GIOVANNI, R. and RICH, K.
Escherichia coli containing unnatural pyrimidines in its deoxyribonu-
cleic acid.
J. Bacteriol., 1956, 71, 60-69.
- 202 - ZEVENHUIZEN, L.P.T.M.
Chemical composition of exopolysaccharides of *Rhizobium* and *Agrobac-*
terium.
J. Gen. Microbiol., 1971, 68, 239-243.
- 203 - ZEVENHUIZEN, L.P.T.M., SCHOLTEN-KOERSELMAN, I. and POSTHUMUS, M.A.
Lipopolysaccharides of *Rhizobium*.
Arch. Microbiol., 1980, 125, 1-8.

