

50376  
1985  
113

N° d'ordre : 1292

50376  
1985  
113

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spécialité : «Amélioration et Transformation des Productions Végétales et Microbiennes»

Option : MICROBIOLOGIE

par

Nour-Eddine EL-HALOU

## INCIDENCES DE LA MOBILITE ET DU CHIMIOTACTISME SUR LA COMPETITIVITE CHEZ *RHIZOBIUM MELILOTI*



Soutenue le 16 Juillet 1985 devant la Commission d'Examen

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

Un étudiant est sur le point d'aboutir après une recherche de longue haleine. Mesdames et Messieurs bonsoir... **Mais!?** que se passe-t-il? On lit l'étonnement sur le visage du chercheur en herbe...



Ça peut pas  
faire de mal. C'est  
des plantes!..

BU  
LILLE

iiiiikkk

GNARF  
GNARF

oh yeah



A la mémoire de mon père et de BA-HOUMANE,

A ma mère et grand-mère,

A mes frères : MOHAMED, ALI, ABDELOUAHED  
et CHOUAIB,

A tous mes amis,

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME. Pour son accueil, sa bienveillance et l'intérêt qu'il a porté à notre travail, nous tenons à lui exprimer notre profonde gratitude. Qu'il trouve dans ces quelques mots un témoignage sincère de reconnaissance.

Nous tenons également à remercier Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ pour ses critiques et les conseils précieux qu'il nous a prodigués tout au long de ce travail. Nous le remercions également d'avoir bien voulu accepter d'être le rapporteur de cette Thèse et l'assure de notre profond respect.

Que Monsieur le Professeur J.C. DERIEUX trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance pour avoir accepté de juger notre travail et de participer à notre Jury.

A Monsieur D. OCHIN, qui nous a apporté son aide et sa sympathie, nous le prions de trouver ici un gage sincère de reconnaissance.

Nous adressons, enfin, nos remerciements à tout le personnel du Laboratoire dont l'aide et l'amitié m'ont été précieuses.

## TABLE DES MATIERES

---

	<u>Pages</u>
AVANT - PROPOS.....	1
INTRODUCTION.....	3
1. - L'APPAREIL LOCOMOTEUR : LE FLAGELLE....	5
1.1. - <u>Structure du flagelle</u> .....	5
1.1.1. - Le filament flagellaire.....	5
1.1.2. - La "protéine crochet".....	5
1.1.3. - Le corps basal.....	5
1.2. - <u>Fonctionnement du flagelle</u> .....	7
2. - LA CHIMIOTAXIE BACTERIENNE.....	7
2.1. - <u>Approche comportementale</u> .....	8
2.2. - <u>Etude moléculaire du chimiotactisme</u> .....	9
2.2.1. - Les chimiorécepteurs.....	10
2.2.2. - Les éléments d'intégration de l'informa- tion sensorielle.....	11
2.3. - <u>Transduction sensorielle</u> .....	12
2.3.1. - Variation du potentiel membranaire....	12
2.3.2. - Interaction de type protéine-protéine....	13
2.3.3. - Intervention de molécules diffusibles....	13
2.3.4. - Interaction de type complexe.....	13
3. - LES METHODES D'ETUDE DE LA COMPETITIVITE.....	13
3.1. - <u>Les techniques de la reconnaissance des             souches de Rhizobium</u> .....	13
3.1.1. - L'utilisation de marqueurs génétiques....	14
3.1.1.1. - Marquage par résistance à certains antibiotiques.....	14
3.1.1.2. - Utilisation de mutants auxotrophes...	15

3.1.2. - Le typage phagique.....	15
3.1.3. - Les méthodes sérologiques.....	15
3.2. - <u>Les méthodes et les paramètres d'évaluation de la compétitivité</u> .....	16
<b>BUT DU TRAVAIL</b> .....	19
<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	20
1. - SOUCHES BACTERIENNES.....	20
1.1. - <u>Origine</u> .....	20
1.2. - <u>Conservation</u> .....	20
1.3. - <u>Culture des souches bactériennes</u> .....	20
2. - MATERIEL VEGETAL.....	20
3. - MILIEUX DE CULTURES.....	20
3.1. - <u>Milieux complets</u> .....	20
3.1.1. - Milieu R.C. ....	20
3.1.2. - Milieu complet Tryptone-Yeast : TY....	21
3.2. - <u>Milieux synthétiques</u> .....	21
3.2.1. - Milieu R.....	21
3.2.2. - Milieu de Nicol et Thornton.....	22
3.2.3. - Gélose blanche.....	22
3.3. - <u>Solutions tampons</u> .....	23
3.3.1. - Tampon de non prolifération (T.N.P.)....	23
3.3.2. - Tampon C.W. ("Chem. Wash").....	23
3.3.3. - Tampon de mutagenèse.....	23
4. - INFECTIVITE ET EFFICIENCE.....	23
4.1. - <u>Opérations préliminaires : techniques de cultures in vitro des plantes de luzerne</u> .....	24
4.1.1. - Stérilisation des graines.....	24
4.1.2. - Germination des graines.....	24
4.1.3. - Culture aseptique de la luzerne.....	24

4.1.3.1. - En milieu liquide.....	24
4.1.3.2. - En milieu solide.....	26
4.1.3.2.1. - Description de la "mini-serre".....	26
4.1.3.2.2. - Stérilisation de la "mini-serre".....	26
4.1.3.2.3. - Stérilisation du support solide : la perlite.....	26
4.1.4. - Inoculation des souches à étudier.....	27
4.2. - <u>Test d'infectivité</u> .....	27
4.3. - <u>Test d'efficience</u> .....	27
4.3.1. - Technique de dosage.....	27
4.3.2. - Calcul de la quantité d'éthylène produite...	28
4.3.3. - Conditions expérimentales.....	28
5. - METHODE D'ISOLEMENT DES SOUCHES A PARTIR DE NODULES.....	29
5.1. - <u>Stérilisation superficielle des nodules</u> .....	29
5.2. - <u>Contrôle de l'asepsie superficielle des nodules</u> ...	29
5.3. - <u>Isolement des souches à partir des nodules</u> ...	29
6. - METHODE D'ISOLEMENT DES MUTANTS DE CHIMIOTACTISME ET DE MOBILITE.....	30
6.1. - <u>Conditions de mutagenèse par la N.T.G.</u> .....	30
6.2. - <u>Traitement par la N.T.G.</u> .....	30
6.3. - <u>Technique d'enrichissement de la culture bactérienne en mutants</u> .....	31
6.4. - <u>Isolement des mutants</u> .....	31
7. - TECHNIQUES DE SELECTION DE MUTANTS SPONTANES RESISTANTS AUX ANTIBIOTIQUES.....	32
7.1. - <u>Solutions d'antibiotiques</u> .....	32
7.2. - <u>Obtention de mutants résistants aux antibiotiques</u> ...	32

<b>RESULTATS - DISCUSSION.....</b>	<b>34</b>
1. - ISOLEMENT ET ETUDE DES MUTANTS ISOLES A PARTIR DE LA SOUCHE DE <u>RHIZOBIUM MELILOTI</u> Ve26	34
1.1. - <u>Etude de la mobilité de la souche de R. meliloti</u> Ve 26	34
1.1.1. - Appréciation microscopique de la mobilité...	34
1.1.2. - Appréciation macroscopique de la mobilité...	34
1.1.3. - Influence de certains paramètres physico- chimiques sur la mobilité.....	36
1.2. - <u>Isolement des mutants de mobilité et de chimiotactisme</u>	36
1.3. - <u>Etude de la migration en milieu semi-solide de la souche sauvage de R. meliloti Ve 26 et des mutants isolés.....</u>	38
2. - ETUDE DES PROPRIETES SYMBIOTIQUES DE LA SOUCHE SAUVAGE DE <u>R. MELILOTI</u> Ve 26 ET DE SES MUTANTS mob <sup>-</sup> , che <sup>-</sup> ET mob <sup>+</sup> , EN MILIEU LIQUIDE.....	38
2.1. - <u>Vérification de l'infectivité des souches étudiées...</u>	40
2.2. - <u>Contrôle de l'efficience des souches étudiées...</u>	40
2.3. - <u>Conclusion.....</u>	41
3. - ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA MOBILITE ET DU CHIMIOACTIVITE SUR LA COMPETITIVITE, EN MINI-SERRE... 41	41
3.1. - <u>Caractérisations de l'origine des nodules obtenus après inoculation mixte par la souche sauvage Ve 26 et de ses mutants Ve 26 mob<sup>-</sup>, Ve 26 che<sup>-</sup>, et Ve 26 mob<sup>+</sup>...</u>	43
3.1.1. - Inoculation mixte avec la même concentra- tion de chacune des souches étudiées dans l'inoculum... 43	43
3.1.1.1. - Inoculation mixte par la souche sauvage Ve 26 et son mutant Ve 26 mob <sup>+</sup> ..... 43	43
3.1.1.2. - Inoculation mixte par la souche sauvage Ve 26 et le mutant Ve 26 che <sup>-</sup> ..... 46	46
3.1.1.3. - Inoculation mixte par la souche sauvage Ve 26 et son mutant Ve 26 mob <sup>-</sup> ..... 46	46
3.1.1.4. - Conclusion..... 46	46

3.1.2. - Inoculation mixte avec les mutants en proportions inégales dans l'inoculum.....	47
3.1.2.1. - L'inoculation mixte par le mutant Ve 26 mob <sup>+</sup> et le mutant Ve 26 mob <sup>-</sup> .....	47
3.1.2.2. - L'inoculation mixte par le mutant Ve 26 mob <sup>+</sup> et le mutant Ve 26 che <sup>-</sup> .....	51
3.1.2.3. - Indice de compétitivité du mutant Ve 26 mob <sup>+</sup> respectivement, par rapport au mutant Ve 26 mob <sup>-</sup> et au mutant Ve 26 che <sup>-</sup> ...	51
3.1.3. - Autres cas.....	52
3.1.3.1. - Inoculation secondaire du mutant Ve 26 mob <sup>+</sup> après une inoculation préalable par les mutants Ve 26 mob <sup>-</sup> et Ve 26 che <sup>-</sup> .....	52
3.1.3.1.1. - Inoculation mixte par le mutant Ve 26 mob <sup>-</sup> puis le mutant Ve 26 mob <sup>+</sup> .....	52
3.1.3.1.2. - Inoculation mixte par le mutant Ve 26 che <sup>-</sup> puis le mutant Ve 26 mob <sup>+</sup> .....	55
3.1.3.1.3. - Conclusion.....	55
3.1.3.2. - Elimination du mutant Ve 26 mob <sup>+</sup> , à différents temps, après inoculations mixtes avec le mutant Ve 26 mob <sup>-</sup> ou le mutant Ve 26 che <sup>-</sup> .....	55
3.1.3.2.1. - Inoculation mixte par le mutant Ve 26 mob <sup>+</sup> et le mutant Ve 26 mob <sup>-</sup> .....	59
3.1.3.2.2. - Inoculation mixte par le mutant Ve 26 mob <sup>+</sup> et le mutant Ve 26 che <sup>-</sup> .....	59
3.1.3.2.3. - Détermination du temps nécessaire à l'adsorption de la souche mutante de <u>R. meliloti</u> Ve 26 mob <sup>+</sup> à la surface des poils racinaires.....	59
3.1.3.2.4. - Discussion et conclusion...	60

3.2. - <u>Etude de la compétitivité entre les souches mutantes de R. meliloti Ve 26 mob<sup>+</sup> et mob<sup>-</sup> et la souche de R. meliloti 2011.....</u>	60
3.2.1. - Inoculation mixte par la souche mutante de <u>R. meliloti</u> Ve 26 mob <sup>+</sup> et la souche de <u>R. meliloti</u> 2011.....	62
3.2.2. - Inoculation mixte par le mutant Ve 26 mob <sup>-</sup> et la souche de <u>R. meliloti</u> 2011.....	62
3.2.2.1. - En proportions égales dans l'inoculum...	62
3.2.2.2. - En proportions inégales dans l'inoculum.	63
3.2.2.3. - Discussion et conclusion.....	68
 CONCLUSION.....	69
 BIBLIOGRAPHIE.....	71
 RESUME.....	86

## ABREVIATIONS UTILISEES

---

l	: litre
ml	: millilitre
g	: gramme
mg	: milligramme
µg	: microgramme
m	: mètre
cm	: centimètre
µm	: micromètre
M	: molaire
mM	: millimolaire
°C	: degré celsius
H	: heure
min	: minute
s	: seconde
J	: joule
w	: watt
q.s.p.	: quantité suffisante pour
log	: logarithme décimal
glc	: glucose
PM	: poids moléculaire
Kd	: kilodalton ( $10^3$ dalton)
dalton	: masse de l'atome d'hydrogène ; unité de masse moléculaire

Ca <sup>++</sup>	: ion calcium
D.N.A.	: acide désoxyribonucléique
A.T.P.	: adénosine 5 <sup>i</sup> - triphosphate
pSym	: plasmide symbiotique
NADH	: nicotinamide adénine dinucléotide
P.T.S.	: phospho - transférase système
E.D.T.A.	: acide éthylène diamine tétraacétique
Tris	: tris hydroxy-méthyl aminométhane
S.D.S.	: sodium dodécyl sulfate
E.M.S.	: éthyl - méthane - sulfonate
N.T.G.	: N-méthyl - N-nitro - N-nitrosoguanidine

AVANT PROPOS

La fixation de l'azote atmosphérique est un phénomène qui conduit à la synthèse de composés organiques à partir de substances inorganiques présentes dans l'atmosphère.

Cette synthèse n'est assurée que par certaines cellules procaryotiques (des bactéries et des algues bleu-vert) et concerne au moins cent millions de tonnes d'azote par an. L'assimilation de l'azote atmosphérique (réduction) est assurée par un système enzymatique la nitrogenèse, isolée en 1966.

Ainsi, quelques plantes de la famille des Légumineuses s'associent à des bactéries du genre Rhizobium de façon à réaliser une symbiose qui conduit communément à l'apparition de nodosités sur le système racinaire.

C'est un phénomène d'une importance primordiale. En effet, l'utilisation d'engrais azotés pour enrichir les sols nécessite des dépenses énergétiques très lourdes à supporter, surtout pour les pays sous-développés.

En outre, la symbiose fixatrice d'azote, fait intervenir trois facteurs bactériens : l'infectivité, la spécificité d'hôte et l'efficacité. La distinction entre l'infectivité ou virulence et l'efficacité est nette : l'infectivité permet au Rhizobium de pénétrer dans la plante et de former un cordon infectieux qui induira la nodulation ; l'efficacité caractérise son aptitude à fixer l'azote atmosphérique à l'intérieur du nodule dont la structure a été définie par la plante.

Un Rhizobium potentiellement actif (infectieux et efficace) ne formera cependant des nodules que sur les légumineuses correspondant à sa spécificité d'hôte.

Actuellement il n'est pas encore possible de dire si les caractères d'infectivité et de spécificité d'hôte sont distincts l'un de l'autre. En effet, lorsqu'un Rhizobium n'est pas en présence de son hôte spécifique aucun moyen actuel ne permet de déceler son pouvoir infectieux. Ainsi on aurait d'abord une

première étape de fixation liée à la spécificité d'hôte qui serait, par conséquent, responsable sélectivement de l'identité du Rhizobium, contrairement à l'infectivité qui correspondrait à un génotype semblable quel que soit le Rhizobium.

Ainsi, l'hypothèse d'une lectine capable de se lier de façon spécifique avec son polysaccharide complémentaire, pourrait intervenir dans l'étape de la reconnaissance. Cependant des hybrides, obtenues par transfert de D.N.A. de R. trifolii chez A. vinelandii, peuvent adhérer spécifiquement aux poils racinaires du trèfle sans y provoquer de nodulation. Ainsi, l'hypothèse d'un contrôle génétique de cette spécificité a été émise (JOHNSTON, 56). En effet, des transconjugants, obtenus après transfert du méga-plasmide (p Sym) de la souche de R. meliloti 2011 chez A. tumefaciens (Après mobilisation par la plasmide  $RP_4$ ), peuvent infecter spécifiquement les hôtes spécifiques de R. meliloti et y provoquer la nodulation bien que les nodules restent inefficients (TRUCHET, 118), d'où l'intervention de ces P Sym dans le contrôle des propriétés symbiotiques lors de la fixation biologique de l'azote atmosphérique.

## INTRODUCTION

L'un des aspects de l'étude de la symbiose Rhizobium - légumineuse porte sur la compétitivité pour la nodulation d'une souche de Rhizobium, soit dans une population indigène, soit dans une population apportée pour enrichir le sol.

En outre, dans un sol donné les populations naturelles de Rhizobium peuvent être plus ou moins aptes à fixer l'azote atmosphérique avec une légumineuse donnée.

En effet, dans un souci d'amélioration de cette fixation symbiotique, il est très souvent intéressant, de procéder à l'inoculation artificielle de souches de Rhizobium les plus intéressantes. Mais le problème réside dans le fait qu'en présence de deux ou de plusieurs souches la plante peut "sélectionner" préférentiellement l'une de ces souches pour former des nodosités et aboutir à la fixation biologique de l'azote atmosphérique, ou peut être même s'agit-il que d'une "autosélection" des bactéries elles-mêmes ?

Ceci nous amène à penser que les souches de Rhizobium, de même spécificité, diffèrent les unes des autres par leur aptitude à être sélectionnées et à provoquer la nodulation d'une légumineuse hôte, c'est-à-dire par leur compétitivité.

Le problème consiste d'une part, à trouver une souche de Rhizobium d'efficacité supérieure à celle des souches indigènes et d'autre part, que cette même souche arrive à les supplanter, en fait, qu'elle soit plus compétitive.

Parmi le peu de travaux effectués sur la compétitivité, la majorité concerne l'aspect quantitatif.

Les principaux facteurs influençant la compétitivité, peuvent être liés au milieu, à la plante ou à la bactérie (8, 92). Ainsi, selon certains auteurs dont CADWELL et VEST (28), cette compétitivité qui subit l'influence du partenaire végétal résulte de la combinaison de caractères propres à la souche bactérienne tels que :

- la compétence saprophytique, c'est-à-dire son aptitude à survivre et à se multiplier dans un sol donné et à coloniser la surface racinaire (29)

- l'aptitude à former des nodules en présence d'une souche de même spécificité c'est-à-dire sa compétitivité pour l'infection.
- le taux de croissance (83).
- l'efficience ; d'après ROBINSON (94) il y aurait une relation très étroite entre efficience et compétitivité. D'autres auteurs mettent en doute cette relation (55, 98).
- La production de polysaccharides ; ceux-ci interagissent avec les lectines d'origine végétale et aboutissent à l'établissement de cette symbiose. C'est souvent en fonction de cette synthèse que s'établira la symbiose en présence de deux ou de plusieurs souches de Rhizobium dans le même sol (18, 35, 76).
- Le chimiotactisme et la mobilité : en effet, une souche mobile aura beaucoup plus de chance d'être plus compétitive qu'une souche non mobile (8, 27, 82, 88)
- Par ailleurs, BREWIN et al. (22) signalent, qu'un plasmide de Rhizobium leguminosarum interviendrait dans la nodulation du pois notamment dans les phénomènes de compétition entre souches. Ce plasmide interviendrait au niveau de la synthèse d'une protéine unique de 24 000 Daltons, capable de s'exprimer dans la rhizosphère de l'hôte.

Quant au rôle de la plante dans la compétitivité, DATE et BROCKWELL (34) signalent que la plante peut "sélectionner" les souches de Rhizobium avec lesquelles elle va entrer en symbiose. Ce rôle sélectif exercé par la plante s'opère par l'intermédiaire des exsudats racinaires et des lectines.

En effet, les exsudats racinaires sont très riches en composés énergétiques qui provoquent une attraction des différentes souches de Rhizobium (34,52). Les lectines, par leur liaison au polysaccharides bactériens, interviennent très fortement dans les associations Rhizobium-légumineuses (17, 20, 18, 58).

Dans le présent travail, nous avons surtout étudié l'influence de la mobilité et du chimiotactisme sur la compétitivité.

## 1. - L'APPAREIL LOCOMOTEUR : LE FLAGELLE

Le flagelle constitue l'appareil locomoteur de la bactérie. Une bactérie flagellée possède un ou plusieurs flagelles, chez E. coli les flagelles sont au nombre de 5 à 10.

La synthèse de cet organe est assujettie à la répression catabolique (93a), il n'est pas formé à haute température (42° C chez E. coli). Une trentaine de gènes sont responsables de la formation et du fonctionnement du flagelle (105, 89, 63). La microscopie électronique a permis de préciser la structure du flagelle et son insertion dans les enveloppes bactériennes (38).

### 1.1. - Structure du flagelle

Le flagelle est constitué de trois parties principales. Certains gènes et leurs produits impliqués dans cette construction sont indiqués dans la figure n°1 qui représente une interprétation schématique de sa structure d'après les micrographies.

#### 1.1.1. - Le filament flagellaire :

C'est un long polymère hélicoïdale d'un polypeptide : la flagelline, chez E. coli son PM varie de 50 à 60 kd et est codée par le gène hag. (74)

#### 1.1.2. - La "protéine crochet" :

Le filament flagellaire est inséré dans une structure protéique en forme de crochet (en anglais "HOOK PROTEINE") dont chaque sous-unité est le produit du gène Flak. L'assemblage de ces sous-unités est contrôlé par le gène Fla E (105).

Cette protéine crochet a un diamètre légèrement supérieur à celui du filament.

#### 1.1.3. - Le corps basal :

C'est un édifice complexe de structure protéique et sur lequel est fixé la "protéine crochet". Il est inséré dans les enveloppes bactériennes, établissant une jonction entre la membrane cytoplasmique, le peptidoglycane et la membrane externe. Les produits des gènes Fla L, Fla M, Fla S, Fla T et Fla V sont des composants du corps basal (63).

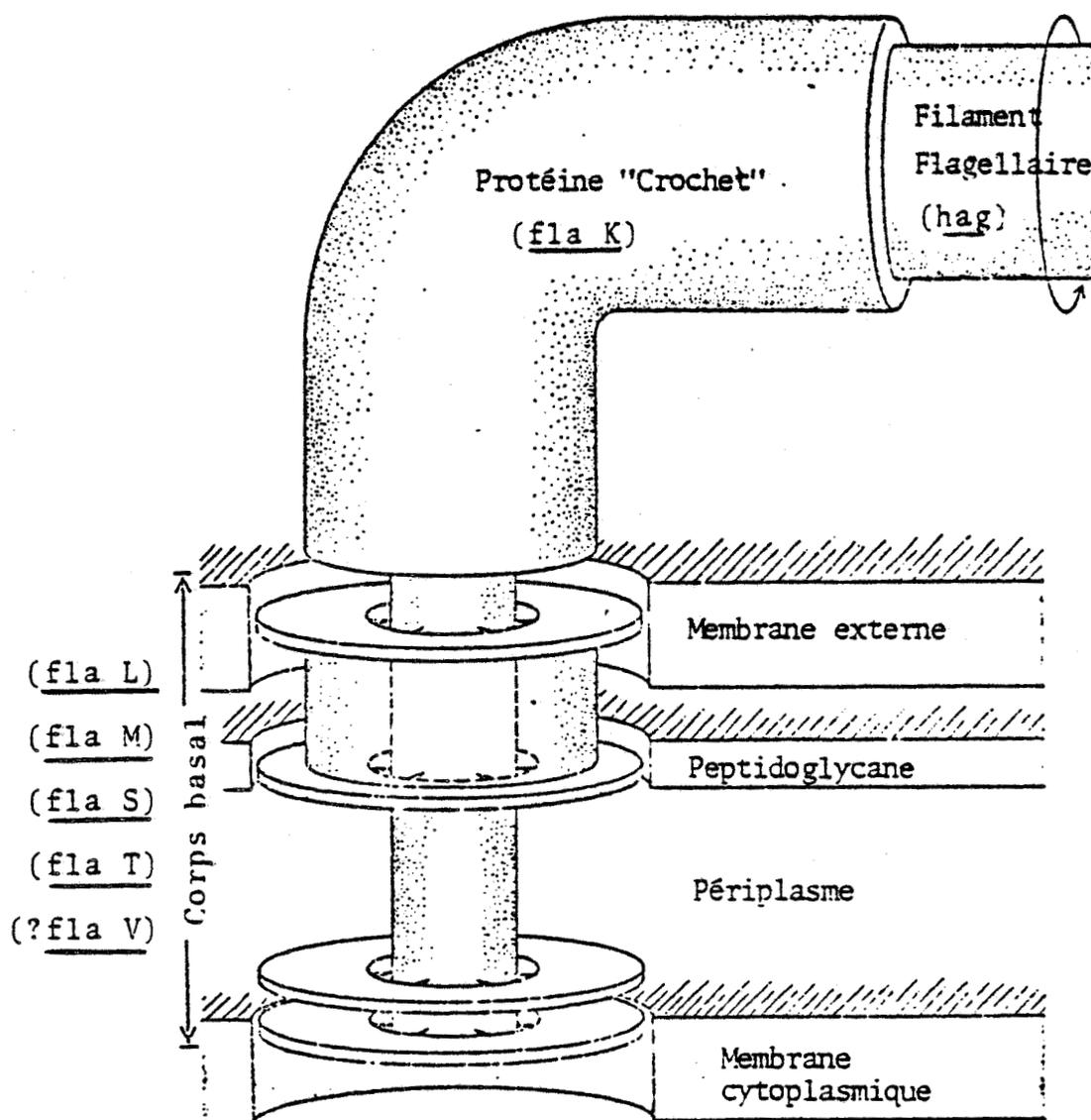


Fig.1 - Structure du Flagelle de *E.coli* d'après DEPAMPHILIS et ADLER (1971)

Quelques gènes de structure d'éléments le composant sont indiqués entre parenthèses.

Des résultats d'électrophorèse en gel de polyacrylamide -SDS- montrent que le corps basal est identique chez les bactéries de type sauvage et des bactéries mutantes mot paralysées (107). Cette étude n'a pas été réalisée chez les mutants de chimiotactisme.

## 1.2. - Fonctionnement du flagelle

Le flagelle fonctionne par rotation du filament le long de son axe principal (13,106). Cette rotation peut se faire dans le sens des aiguilles d'une montre ; sens "horaire" (rotation SAM) ou, dans le sens "anti-horaire" (rotation SCAM). chez une bactérie sauvage, le flagelle tourne alternativement dans le sens SAM pendant quelques secondes, puis dans le sens SCAM pendant environ un dixième de seconde. (75).

LARSEN et al., (69) ont établi que la source énergétique actionnant le flagelle n'était pas l'A.T.P. lui-même mais, un intermédiaire de la phosphorylation oxydative.

MANSON et al. (77, 78) d'une part, KHAN et MACNAB (60,61) d'autre part, ont ensuite montré que, c'est la force protomotrice ou potentiel électro-chimique qui entraînait le flagelle (104).

Le sens de rotation semble également être régulé par la force proto-motrice. EISENBACH et ADLER (43) ont obtenu des enveloppes bactériennes, censées ne plus contenir de matériel cytoplasmique, mais ayant des flagelles fonctionnels après addition d'un donneur d'électrons, en l'occurrence le NADH. Dans ces conditions, le flagelle tourne en sens SCAM uniquement. Le potentiel électrochimique est bien une force motrice du flagelle. Les mêmes auteurs font l'hypothèse que la rotation SAM nécessiterait l'intervention d'un composant cytoplasmique.

## 2. - LA CHIMIOTAXIE BACTÉRIENNE

L'étude de la chimotaxie bactérienne a commencée à la fin du siècle dernier et au début du 20ème (45, 46, 91, 95).

La chimiotaxie est très répandue dans le règne bactérien mais, n'a été étudiée extensivement que chez quelques espèces, E. coli, Salmonella typhimurium et plus récemment chez Bacillus subtilis. Si l'on retrouve des analogies comportementales et des mécanismes communs

chez les espèces étudiées, il faut remarquer qu'un stimulus chimique considéré comme "attractant" par une même espèce bactérienne peut être "repellent" pour une autre. Rhizobium, bactérie gramm - négative mobile est attirée par certains produits chimiques: "les attractants" (sucres, certains acides aminés et des analogues de ces substances) est repoussée par d'autres : les "repellents" (d'autres acides aminés, des ions métalliques..). Ce chimiotactisme, positif ou négatif, est une réponse physiologique de la bactérie à des variations chimiques de son environnement (1, 2, 3, 4,81, 114, 119)

### 2.1. - Approche comportementale

En absence de stimulus on observe une nage rectiligne ou nage "lisse" (smooth) pendant quelques secondes, puis la bactérie culbute sur place "tumble" (ou gigotements) pendant quelques dixièmes de seconde et repart dans une direction aléatoire (12, 59). Pendant la nage "lisse" les flagelles forment un faisceau propulsant le corps bactérien. Les "gigotements" sont dus à la rotation SAM des flagelles tandis que la nage "lisse" est due à la rotation SCAM. Les mécanismes de coordination entre les quelques flagelles du corps bactérien et de changement de sens de rotation ne sont pas encore connus.

L'addition d'un "attractant" au milieu provoque une diminution de la fréquence de "gigotements" et par conséquent, une augmentation du temps de nage "lisse". Tandis que l'addition d'un "repellent" a les effets opposés : augmentation de la fréquence des "gigotements" et, par suite diminution des temps de nage "lisse".

Les stimulus favorisent donc l'un ou l'autre sens de rotation des flagelles (68). Ceci s'accompagne par un phénomène d'adaptation et de désadaptation des bactéries à un stimulus donné. En effet, la réponse à un stimulus n'est que transitoire : après un stimulus donné et au bout d'un certain temps; les bactéries s'adaptent au stimulus et retrouvent leur comportement initial bien que l'effecteur soit toujours présent dans le milieu. L'augmentation de la concentration de l'effecteur provoque une nouvelle réponse transitoire, suivie d'une nouvelle adaptation à cette concentration. Cette adaptation est maintenue tant que l'effecteur est là. Par contre, si l'effecteur est enlevé du milieu, les bactéries redeviennent sensibles à une nouvelle addition de ce même effecteur : c'est le

phénomène de désadaptation . (66)

En outre, MACNAB et KOSHLAND (73) signalent l'existence d'une stimulation de type spatio-temporelle. En effet, les bactéries "reconnaissent" un gradient spécial de concentration d'un effecteur ; par exemple plus concentré à droite qu'à gauche, mais aussi un gradient temporel de concentration d'un effecteur c'est-à-dire plus concentré au temps  $t_1$  qu'au temps  $t_0$ . Autrement dit, placées dans un gradient de concentration les bactéries auront tendance à migrer vers les concentrations les plus fortes. Lorsque, les bactéries "remontent" le gradient, la fréquence des "gigotements" est diminuée, et donc les temps de nage "lisse" sont augmentés mais dès qu'elles redescendent le gradient, par suite d'une "mauvaise" orientation, la fréquence des gigotements est augmentée. Le mouvement résultant est une migration vers les fortes concentrations "d'attractant". (36)

Dans le cas d'un gradient de "repellent" la situation inverse est observée et le résultat est une migration vers les faibles concentrations de "repellent"

## 2.2. - Etude moléculaire du chimiotactisme

Dans ce paragraphe nous effectuerons une brève revue des molécules impliquées dans ce système sensoriel primitif.

### 2.2.1. - Les chimiorécepteurs :

De nature protéique, ces chimiorécepteurs, ont été mis en évidence pour la 1ère fois en 1969 par ADLER (3). Ils sont localisés dans le périplasme (cas des Maltoses Binding Proteins ou M.B.P.) ou font partie de la membrane cytoplasmique (c'est le cas de l'enzyme "EnZ glu II" du système PTS qui reconnaît le glucose). Des chimiorécepteurs d'acides aminés sont connus. Ainsi, chez E. coli le produit du gène che D ou tsr reconnaît la sérine et le produit du gène che M ou tar reconnaît l'aspartate. Certains de ces chimiorécepteurs participent également au transport de métabolites : la M.B.P. est nécessaire au transport du maltose vers le cytoplasme.

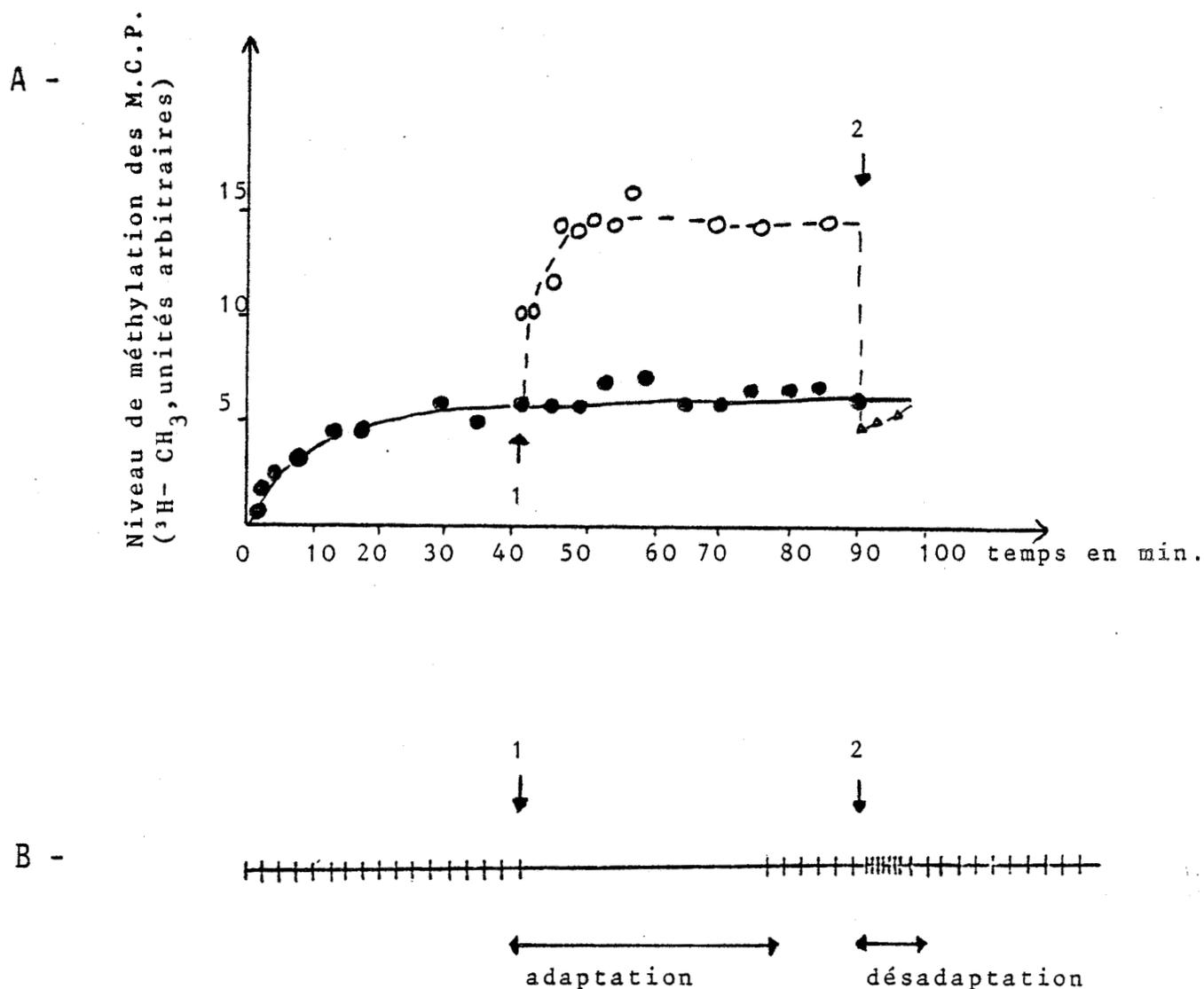


Figure 2 : Corrélation entre le niveau de méthylation des M.C.P. et le phénotype natatoire : SPINGER et al. (112)

En A : niveau de méthylation des M.C.P.

En B : type de nage des bactéries (les traits verticaux représentent les temps de "gigotements", les traits horizontaux les temps de nage "lisse").

- Absence de stimulus
- Présence d'attractant (Ajouté en 1 )
- △---△ Après dilution de l'attractant (en 2 )

### 2.2.2. - Les éléments d'intégration de l'information sensorielle.

La L. méthionine est nécessaire au chimiotactisme bactérien. En effet, le groupe méthyl de la L. méthionine est transféré via la S. adénosylméthionine (10, 11) à des protéines membranaires spécifiques, les M.C.P. ("Méthyl accepting Chemotaxis Proteins") impliquées dans le chimiotactisme (65, 108, 111). Les M.C.P. sont des protéines constamment méthylées. En absence de tout stimulus, il existe un niveau de base de cette méthylation (rôle non encore compris).

En présence "d'attractant" on observe une augmentation du niveau de la méthylation jusqu'à un plateau : la durée de la réaction se calque étroitement à la durée de l'adaptation (figure n° 2). On note aussi que ce plateau est atteint au bout de quelques minutes, et il est maintenu tant que l'"attractant" est dans le milieu. Ce plateau peut être corrélé au maintien de l'adaptation, lorsque l'attractant est enlevé on observe une déméthylation, on retrouve alors le niveau de base. Cette déméthylation est effective au bout de quelques secondes. Au contraire les "repellents" provoquent une diminution du niveau de base de la méthylation des M.C.P. Trois classes de M.C.P. ont été définis :

- M.C.P.I : récepteurs membranaires spécifiques de la sérine
- M.C.P.II : récepteurs membranaires spécifiques de l'aspartate (51, 123)
- M.C.P.III : nécessaire à la chimiotaxie envers le ribose et le galactose (50, 64, 117).

Un autre groupe de M.C.P. a été récemment défini chez E. coli. Il s'agit des M.C.P. IV, cependant leur rôle dans la chimiotaxie n'est pas clair (21, 124).

On conclut donc que la méthylation des M.C.P. est préférentielle. Elle est aussi séquentielle. En effet, les M.C.P. peuvent fixer jusqu'à quatre radicaux méthylés par molécule. Le rôle de cette polyméthylation, est encore incompris (peut-être un rôle de régulation de la méthylation au niveau de l'adaptation).

Enfin, notons que les enzymes responsables de la méthylation et de la déméthylation sont des protéines cytoplasmiques : la méthyltransférase et la méthylestérase. Une autre molécule cytoplasmique de PM inférieur à ceux des précédentes pourrait être l'accepteur des radicaux méthylés lors de la déméthylation des M.C.P., mais aucune démonstration n'était actuellement cette hypothèse (113, 116).

### 2.3. - Transduction sensorielle

Après une première étape de reconnaissance de l'effecteur par le chimiorécepteur, il est légitime de se demander quelle est la nature du mécanisme qui transmet cette information au flagelle. Aussi plusieurs hypothèses ont été émises.

#### 2.3.1. - Variation du potentiel membranaire :

Le transfert de l'information peut être du à un signal transmembranaire de type électrique, accompagné de mouvement d'ions spécifiquement impliqués dans la réponse comportementale. En effet, ADLER (5) a montré que chez E. coli des stimulus chimiotactiques provoquaient des modifications du potentiel membranaire (53).

ORDAL (86), implique l'intervention de cations bivalents ; en particulier l'ion  $Ca^{++}$  dans le contrôle du comportement chimiotactique chez B. subtilis.

SNYDER et al. (110) ont montré, à l'encontre de ces résultats, que les modifications du potentiel de membrane observées chez E. coli n'étaient pas directement liées à la chimiotaxie. En effet, d'une part des mutants du chimiotactisme présentent les mêmes variations de potentiel membranaire que la souche sauvage, d'autre part tous les effecteurs chimiotactiques n'entraînent pas ces modifications, enfin l'addition de tampon à la place de l'effecteur provoque les mêmes effets que ce dernier. Ils ont aussi montré que chez S. typhimurium l'ion  $Ca^{++}$  n'intervenait pas dans la transduction sensorielle.

### 2.3.2. - Interactions de type protéine-protéine.

Le signal sensoriel peut être transmis par contact entre protéines : la fixation du ligand induisant un changement conformationnel du chimiorécepteur, cette modification est transmise de proche en proche jusqu'au moteur flagellaire. En effet, certains mutants trg ne sont pas chimiotactiques pour le ribose et le galactose bien que les chimiorécepteurs de ces sucres ("Ribose" et "Galactose Binding Protéins" : R.B.P. et G.B.P.) soient présents et fonctionnels (50). Des expériences de compétition suggèrent qu'il y a interaction se faisant sur les mêmes sites (117) .

De plus, la méthyltransférase et la méthylestérase interagissent nécessairement avec les protéines M.C.P., au moins pendant les réactions de méthylation et de déméthylation. Ces interactions ont lieu du côté "interne" de la membrane cytoplasmique. D'autre part, KOIWAI et HAYASHI (62) ont montré qu'il y a interaction entre la M.B.P. et la protéine tar, cette interaction n'ayant lieu qu'en présence de maltose. Les protéines M.C.P. sont donc capables d'interagir avec des protéines périplasmiques et avec des éléments cytoplasmiques.

### 2.3.3. - Intervention de molécules diffusibles

Une molécule diffusible peut être le support de l'information. En effet, le corps bactérien est suffisamment petit pour qu'une petite molécule diffuse en environ  $10^{-2}$  seconde d'une extrémité à l'autre de la bactérie (LEE et FITZSINONS cité par SNYDER et al. (110)).

### 2.3.4. - Interaction de type complexe

L'hypothèse enfin, de combinaison entre signal transmembranaire, interaction protéine-protéine et molécule diffusible ne doit pas être exclue.

## 3. - LES MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA COMPÉTITIVITÉ.

### 3.1. - Les techniques de la reconnaissance des souches de Rhizobium

L'un des volets de l'étude de la compétitivité est de pouvoir reconnaître les différentes souches de Rhizobium inoculées simultanément à une plante hôte.

Ainsi différentes techniques de reconnaissance des souches de Rhizobium ont été décrites dans la littérature. Les principales sont :

- l'utilisation de marqueurs génétiques
- le typage phagique
- les techniques sérologiques

### 3.1.1. - L'utilisation de marqueurs génétiques

C'est la méthode la plus utilisée dans les études de compétitivité (6, 23, 24, 25, 26, 54, 55, 92, 102). Elle présente cependant deux inconvénients :

- le risque d'altération des propriétés symbiotiques des mutants par rapport au type sauvage parental (33, 103)
- des changements au niveau des acides nucléiques sont susceptibles de se produire chez Rhizobium au stade bactéroïde (41).

#### 3.1.1.1. - Marquage par résistance à certains antibiotiques

L'utilisation de souches bactériennes résistantes à certains antibiotiques est la méthode la plus employée dans les travaux sur la compétitivité (72, 96, 100, 102, 103). L'avantage de cette technique est sa simplicité. Par contre, elle peut provoquer des modifications des propriétés symbiotiques (71).

SCHWINGHAMER (100, 101, 102) après son étude sur les relations entre la résistance à certains antibiotiques et la modification de l'efficacité chez des mutants spontanés de R. leguminosarum et R. trifolii, conclut que certains antibiotiques peuvent être utilisés sans risque d'altération.

Ainsi selon cet auteur, des mutants résistants à la streptomycine, à la spiramycine ou au chloramphénicol ne présentent jamais de perte d'efficacité. Elle se produit rarement chez les mutants résistants à la kanamycine, à la spectinomycine ou à la polymyxine. En ce qui concerne l'infectivité sur l'hôte homologue, SCHWINGHAMER, constate que celle-ci est maintenue chez tous les mutants résistants à des antibiotiques.

### 3.1.1.2. - Utilisation de mutants auxotrophes

L'utilisation de mutants auxotrophes peut être envisageable mais, dans certains cas, on peut avoir une perte de l'infectivité ou de l'efficacité des souches.

PAIN (87) observe que tous les mutants exigeants en adénine ne sont pas infectieux, mais que les propriétés symbiotiques des autres mutants ne semblent pas altérées. En particulier, le phénotype symbiotique des souches exigeantes en uracile ou en leucine ne paraît pas modifié. Par contre SCHERRER et DENARIE (99) observent que les mutants de R. meliloti sélectionnés pour leur exigence en adénine ou en uracile, sont inefficients. De même, DENARIE et Coll (37) signalent que 11 mutants de R. meliloti exigeants en leucine ont perdu leur efficacité. La perte de l'efficacité observée chez certains mutants auxotrophes suggère selon SCHWINGHAMER (101) une liaison étroite entre les sites impliqués dans l'exigence en purine et ceux intervenant dans la nodulation.

### 3.1.2. - Le typage phagique

La sensibilité de certaines souches à certains bactériophages peut aider à reconnaître entre elles des souches de Rhizobium en compétition (115).

Si ce procédé présente l'avantage de pouvoir utiliser des souches sauvages, il ne peut constituer, selon certains auteurs, qu'un test complémentaire en cas de doute (32).

Actuellement, les études visant à différencier des souches particulières à l'intérieur des espèces de Rhizobium font défaut. Par conséquent cette méthode est rarement utilisée.

### 3.1.3. - Les méthodes sérologiques

Les techniques sérologiques sont très utilisées pour la reconnaissance des souches de Rhizobium en compétition (23, 24, 26, 30, 39, 42, 97, 109, 120, 121).

Elles sont applicables aussi, aux souches sauvages, mais elles nécessitent la production d'immu-serum spécifique.

### 3.2. - Les méthodes et les paramètres d'évaluation de la compétitivité

Généralement le travail sur la compétitivité consiste à déterminer :

- le nombre de nodules apparus.
- la proportion de souches isolées des nodules.
- la quantité de cellules présentes à la surface racinaire par rapport à celle présente dans l'inoculum ou dans le sol.
- l'influence des différents facteurs sur le succès de la nodulation.

Les différents auteurs qui se sont déjà penchés sur ce problème de compétitivité entre souches de Rhizobium, ont surtout recherché les propriétés susceptibles d'expliquer le succès compétitif de la nodulation. En effet, l'inoculation avec une souche d'efficacité supérieure ne permettra à la plante de fixer plus d'azote atmosphérique que dans la mesure où cette souche serait capable de "supplanter" les souches indigènes. Cette capacité dépend à la fois de l'indice de compétitivité et du nombre de bactéries apportées ou présentes dans le sol.

Ces travaux conduisent à la détermination du pourcentage de nodules attribuable à chacune des souches étudiées (48).

Les études comparatives menées seulement sur quelques espèces ont montré qu'il existait, pour deux souches mises en présence dans un même inoculum, une relation du type  $y = a x$  où  $y$  représente le nombre de nodules formés par une souche donnée et  $x$ , le nombre de Rhizobium de cette souche dans l'inoculum. La valeur du coefficient  $a$  permet d'estimer la compétitivité d'une souche par rapport à l'autre ou par rapport, à une autre souche de compétitivité connue, ceci dans un sol et dans des conditions données.

Cette relation permet aussi de prévoir, à partir d'expériences simples réalisées en serre, le nombre de bactéries nécessaires

pour qu'une proportion donnée de nodules soit formée par la souche inoculée, lorsque la plante sera semée dans un sol contenant déjà des Rhizobium indigènes.

Certains auteurs comme PINTO, YAO, VINCENT (92), expriment cette relation différemment :

$$\log \frac{n_1}{n_2} = \log C + b \log \frac{r_1}{r_2}$$

$r_1$  et  $r_2$  représentent le nombre de cellules présentes dans l'inoculum pour chaque souche.

$n_1$  et  $n_2$  : le nombre de nodules formés par chaque souche.

Dans cette équation,  $C$  exprime le succès relatif de la nodulation quand les souches sont également représentées à la surface des racines ; c'est l'indice de compétitivité. Il est aussi important de signaler que la relation  $y = a x$ , correspond bien à la formule d'adsorption de FREUNDLICH. En effet, le nombre de nodules formés par une souche donnée varie en fonction du nombre de bactéries dans le milieu, de la même manière que varie une quantité de substance adsorbée en fonction de sa concentration dans la solution ; cela peut laisser supposer que les différences de compétitivité ne résultent que d'une "adsorption sélective" de souches de Rhizobium sur les racines. Cette hypothèse est en accord avec les différences d'adsorption observées sur des racines de luzerne avec des souches de R. meliloti de compétitivité différente.

LAGACHERIE et Coll (67) apprécient la compétitivité en comparant les efficacités des souches étudiées par rapport à une souche inefficace.

Ils définissent aussi un coefficient  $C$  de compétitivité pour l'infection (différent de celui défini par PINTO et Coll).

$$C = \frac{MS (eff^+ + eff^-)}{MS eff^+}$$

$Ms$  : indique la matière sèche des parties aériennes des plantes

$eff^+$  : souche efficace

$eff^-$  : souche inefficace

Ce coefficient est ensuite comparé au pouvoir compétitif des différentes souches en compétition : le pouvoir compétitif d'une souche étant le nombre de nodules qu'elle forme en présence de souches de même spécificité.

En outre, s'il y a proportionnalité entre le nombre de nodules formés et le logarithme décimal du nombre de bactéries apportées dans l'inoculum, il est possible de comparer l'aptitude d'une souche à former des nodules en présence de souches indigènes de même spécificité.

Rappelons aussi que la supériorité compétitive d'une souche par rapport à une autre, ne peut être définie simplement par la vitesse de la formation de nodules, ni par le nombre de nodules produits quand elle est testée séparément.

On peut aussi mettre en évidence un "effet sol" important sur la compétitivité, en comparant les courbes données par différentes souches inoculées dans des sols différents contenant des nombres voisins de Rhizobium.

Enfin, il ne faut pas perdre de vue, l'importance du génotype de la plante hôte sur la sélection des souches de Rhizobium avec lesquelles elle va entrer en symbiose.

BUT DU TRAVAIL

Notre travail vise à étudier l'influence de la mobilité et du chimiotactisme sur la compétitivité entre souches bactériennes du genre **Rhizobium**.

Dans une première étape, nous avons cherché à isoler différents mutants affectés sur leur caractère de mobilité et de chimiotactisme à partir de la souche de **R. meliloti** Ve 26.

Des inoculations mixtes dans différentes conditions ont été ensuite réalisées à partir des différents mutants isolés. Cette étude nous permettra de bien apprécier le rôle de la mobilité et du chimiotactisme dans les phénomènes de compétition entre souches bactériennes du genre **Rhizobium**.

Notre travail consiste aussi à vérifier s'il n'y a pas de perte de propriétés symbiotiques (nodulation et efficacité) lorsque les souches de **R. meliloti** étudiées sont devenues résistantes à des antibiotiques.

MATERIEL ET METHODES

## 1. - SOUCHES BACTÉRIENNES

### 1.1. - Origine

Nous avons utilisé la souche de Rhizobium meliloti Ve 26 isolée par OBATON (I.N.R.A. centre de Montpellier).

Différents mutants ont été isolés par nous à partir de la souche ve 26. On a aussi utilisé la souche de Rhizobium meliloti 2011 de la collection du laboratoire.

### 1.2. - Conservation

Les souches de Rhizobium meliloti sont conservées en milieu RC glucosé à 1 % en présence de glycérol à 20 % et à -20°C.

### 1.3. - Culture des souches bactériennes

A partir des souches glycérolées et congelées, on réalise soit des isolements sur milieu RCG, soit des précultures en tubes stériles en présence de milieu RC liquide glucosé à 1 %. L'incubation se fait à 30°C sous agitation, soit sur table à agitation linéaire Biolafitte (50 saccades par min), soit sur agitateur rotatif Biolafitte (85 rotations par min).

## 2. - MATÉRIEL VÉGÉTAL

Ce travail a été réalisé sur la luzerne: Medicago sativa variété "Magali".

## 3. - MILIEUX DE CULTURES

### 3.1. - Milieux complets

#### 3.1.1. - Milieux RC (Rhizobium complexe).

Mg SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	.....	0,2	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.....	1	g
Extrait de levure (Difco)	.....	1	g
Eau distillée q.s.p.	.....	1	l

Le pH est ajusté entre 7 et 7,5, le milieu est stérilisé par autoclavage 20 min à 120°C.

Le milieu RC est utilisé pour les précultures et les conservations des souches bactériennes. Additionné de 15 g d'agar par litre de milieu, il sert à l'isolement, aux numérations, à la sélection, ainsi qu'à la germination de graines de luzerne.

Gélosé à 3 g d'agar par litre de milieu (milieu semi-solide), nous l'avons utilisé pour nos expériences sur la mobilité.

La source de carbone (glucose ou fructose) est additionnée avant utilisation à la concentration finale de 1 % sous forme d'une solution stérilisée à 105°C pendant 30 min.

### 3.1.2. - Milieu complet Tryptone-Yeast : TY

Bacto tryptone (Difco) .....	5	g
Extrait de levure .....	3	g
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O .....	0,88	g
Eau distillée q.s.p. ....	1	l

Le CaCl<sub>2</sub> est stérilisé séparément sous forme d'une solution à 8,8 g pour 100 ml d'eau distillée.

Le pH est ajusté entre 7,2 et 7,5 et la stérilisation effectuée à 120°C pendant 20 min.

Ce milieu riche sert aux précultures des souches de R. meliloti. Il permet aussi la conservation des souches bactériennes à +4°C pendant 3 semaines.

A l'état semi-solide (3 g/l d'agar Difco), il est employé pour des études de mobilité. On l'a aussi utilisé sous sa forme diluée (au 1/100), qui donne le maximum de mobilité.

## 3.2. - Milieux synthétiques

### 3.2.1. - Milieu R.

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

Le pH du milieu est ajusté à 7,2.

La stérilisation s'effectue à 120°C pendant 20 min.

IL est complété de 0,01 µg/ml de vitamine H (ou biotine), de 0,5 µg/ml de vitamine B<sub>1</sub> (ou thiamine) et de 1 % de glucose pour constituer le milieu RHB<sub>1</sub> glc.

Sous sa forme semi-solide, nous l'avons utilisé pour des tests de chimiotactisme et de mobilité. On l'a aussi employé pour effectuer les dilutions pour des numérations.

### 3.2.2. - Milieu de Nicol et Thornton (NT)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	.....	0,2 g
NaCl	.....	0,1 g
FePO <sub>4</sub>	.....	1 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	.....	2 g
Fe Cl <sub>3</sub>	.....	0,01 g soit 1ml d'une solution mère à 10g/l
H <sub>2</sub> O distillée q.s.p.	.....	1 l

Le pH du milieu est ajusté à 6,8-6,9. La stérilisation s'effectue à 105°C pendant 30 min.

Ce milieu est utilisé pour les cultures in vitro des plantules de luzerne.

### 3.2.3. - Gélose blanche

Elle renferme 7,5 g de Bacto Agar (Difco) par litre d'eau distillée, elle est répartie à raison de 4 ml par tube. La stérilisation s'effectue à 120°C pendant 20 min. Elle est utilisée pour les numérations et les sélections de mutants résistants à certains antibiotiques par la méthode dite en double couche.

### 3.3. - Solutions tampons

#### 3.3.1. - Tampon de non prolifération ( T N P )

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1	g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0,2	g
H <sub>2</sub> O distillée q.s.p. ....	1	l

Le pH final est ajusté à 7,2. Le T.N.P. est autoclavé à 120°C pendant 20 min.

Ce milieu dépourvu de toutes trace de carbone et d'azote, est utilisé pour les lavages, suspensions et dilutions des suspensions bactériennes.

#### 3.3.2. - Tampon C.W. ("Chem. Wash")

Tampon phosphate 10<sup>-2</sup> M (pH7) additionné d'E.D.T.A. (Acide éthylène-diamine tétraacétique) à 10<sup>-4</sup> M.

Sous sa forme semi-solide, nous l'avons utilisé pour des tests de mobilité.

#### 3.3.3. - Tampon de mutagenèse

Tris (hydroxyméthylaminoéthane) .....	9 ml d'une solution molaire
Acide maléique .....	5 ml d'une solution molaire

Le pH est ajusté à 6,6. La stérilisation s'effectue par filtration sur filtre Sartorius 0,22 µm.

La N.T.G. (N-méthyl N-nitro N-nitrosoguanidine) est dissoute dans ce tampon. Il sert aussi pour laver la suspension bactérienne avant et après action de la N.T.G.

## 4. - INFECTIVITÉ ET EFFICIENCE

En présence de souches de Rhizobium, les plantes appartenant à la famille des légumineuses manifestent une réaction de nodulation : on parle alors d'état d'infectivité (nod<sup>+</sup>) impliquant une réaction de fixation de l'azote atmosphérique ; on parle alors d'état d'efficacité (fix<sup>+</sup> ou eff<sup>+</sup>).

#### 4.1. - Opérations préliminaires : techniques de cultures in vitro des plantes de luzerne

##### 4.1.1. - Stérilisation des graines

Dans une boîte de Pétri, une centaine de graines, préalablement triées, sont stérilisées par immersion dans une solution contenant 20 ml d'une solution de chlorure mercurique ( $\text{HgCl}_2$ ) à 2,5 % et une ou deux gouttes de détergent (Teepool). On laisse 5 min. sous agitation manuelle, puis on élimine cette solution au moyen d'une pipette Pasteur branchée sur une pompe à vide et passée à la flamme.

Les graines subissent ensuite une dizaine de lavages successifs à l'eau bi-distillée stérile, pour éliminer toute trace de l'agent désinfectant.

##### 4.1.2. - Germination des graines

Sur milieu RC glucosé à 1 % gélosé à 15 g/l on dépose aseptiquement les graines ayant déjà subi le traitement de stérilisation, à raison de 20 graines environ par boîte de Pétri. Cette étape nous permet aussi de contrôler la stérilité des graines.

La germination des graines se déroule en chambre chaude à 30°C et à l'obscurité pendant 2 à 3 jours.

##### 4.1.3. - Culture aseptique de la luzerne

A l'aide d'une ose, on prélève stérilement les graines ayant germé sur le milieu RCG avec des racines plus ou moins rectilignes de 1 à 2 cm de longueur, tout en vérifiant que les semis sont exempts de toute contamination.

##### 4.1.3.1. - En milieu liquide

Les graines sont transférées dans des tubes (20 x 200 mm ou 40 x 200 mm) contenant du milieu de Nicol et Thornton (15 ou 50 ml). Les graines sont placées sur un support en papier watman n° 3 plié à l'extrémité supérieure, de façon à éviter leur asphyxie.

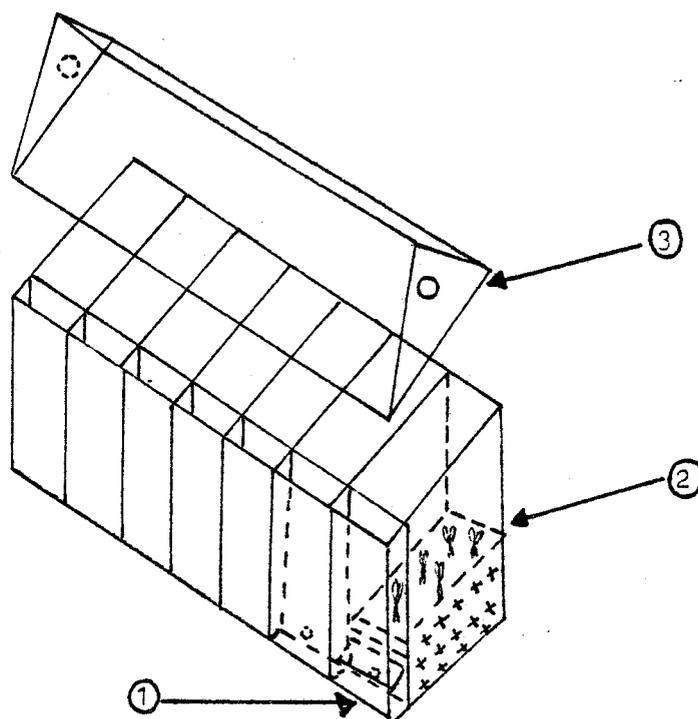


Fig.3. Schéma de la miniserre expérimentale d'après  
OCHIN et coll(84)

- ① Alveole d'introduction de la suspension bactérienne ,  
servant également à l'arrosage.
- ② Alveole de culture des plantes contenant le milieu  
solide(perlite)
- ③ Couvercle amovible

#### 4.1.3.2. - En milieu solide

Dans le but de nous approcher des conditions naturelles et pour mieux étudier l'influence de la mobilité et du chimiotactisme dans la compétitivité, une "mini-serre" a été élaborée dans notre laboratoire par LAYACHI (70) et OCHIN (84).

##### 4.1.3.2.1. - Description de la "mini-serre"

La "mini-serre" en plexiglass, comprend 7 compartiments subdivisés chacun en deux alvéoles. L'une, la plus petite, reçoit les inocula, l'autre la plus grande, contient le substrat : la perlite, sur laquelle sont déposées les graines de luzerne germées sur le milieu R.C.G.

Les deux alvéoles d'un même compartiment, communiquent entre-elles à l'aide d'un petit orifice qui permet la circulation du milieu et des bactéries (voir schéma de la figure n° 3).

##### 4.1.3.2.2. - Stérilisation de la "mini-serre"

La "mini-serre" est d'abord lavée dans un bain de Mucapur à 1 % porté à 70°C. Ensuite deux à trois lavages successifs à l'eau distillée sont effectués. Après séchage, une exposition de la cuve aux rayons U.V. émis par une lampe de 15 W correspondant à  $15 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  constitue la dernière étape de la stérilisation de la "mini-serre".

##### 4.1.3.2.3. - Stérilisation du support solide : la perlite

Elle est d'abord lavée à l'eau distillée puis, stérilisée à l'autoclave à 130°C pendant 30 min. deux fois.

Après quoi elle est mise dans les grandes alvéoles des différents compartiments constituant la "mini-serre", et imbibée de milieu de N.T., 24 heures avant l'utilisation.

Que ce soit en milieu liquide ou en milieu solide, les plantules sont ensuite cultivées en condition de serre : 16 heures d'éclairément, 8 heures d'obscurité, 80 % d'humidité et à la température de 26°C.

#### 4.1.4. - Inoculation des souches à étudier

Dès l'apparition des racines secondaires (environ 8 jours après la germination des graines), les suspensions bactériennes préalablement centrifugées et lavées dans du T.N.P., sont ajoutées aux concentrations choisies.

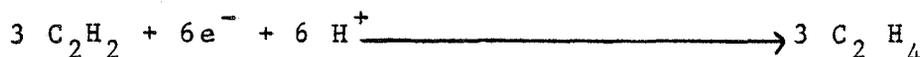
#### 4.2. - Test d'infectivité

Comme on l'a déjà défini antérieurement, l'infectivité d'une souche de Rhizobium constitue sa capacité à provoquer la nodulation chez certaines légumineuses.

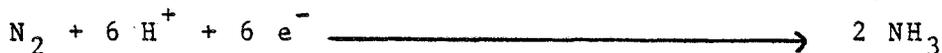
#### 4.3. - Test d'efficacité

On parle d'état d'efficacité si après symbiose Rhizobium - Légumineuses, il y a fixation de l'azote atmosphérique.

DILWORTH, SCHOLLHORN et Coll. (40) ont montré, pour la première fois, que l'acétylène était réduit en éthylène par le système de la nitrogénase chez Clostridium pasteurianum suivant la réaction suivante :



La réaction de fixation de l'azote atmosphérique est :



La fixation d'une molécule d'azote est donc réalisée de la même façon que la formation de 3 molécules d'éthylène à partir de l'acétylène .

En se basant sur cette analogie, on peut employer la méthode de réduction de l'acétylène pour mesurer l'activité nitrogénasique.

#### 4.3.1. - Technique de dosage

45 à 60 jours après inoculation, on transfère les plantules dans un flacon de 150 ml fermé hermétiquement par un opercule perforable en caoutchouc. On prélève, à l'aide d'une seringue, 17 ml d'air d'un flacon que l'on remplace par 15 ml d'acétylène (qui sera éventuellement réduit par la nitrogénase) et 2 ml de

propane dilué 100 fois par l'air (témoin interne pour le dosage).

Le flacon est ensuite homogénéisé par agitation manuelle, on prélève alors 0,5 ml que l'on injecte dans le chromatographe en phase gazeuse ; ce prélèvement donne la quantité d'éthylène formée au temps  $t = 0$ .

On maintient le flacon à l'étuve à 32°C, pendant 7 heures d'incubation, on fait une autre mesure.

#### 4.3.2. - Calcul de la quantité d'éthylène produite

La formule utilisée est la suivante :

$$Q = C \cdot K \cdot \frac{H_1}{H_2}$$

tels que : Q : nombre de moles de  $C_2H_4$  produites  
 C : nombre de moles de  $C_3H_8$  injectées ( 1,27  $\mu$ moles)  
 K : coefficient de proportionalité établi à partir d'un mélange en proportions égales (V/V de  $C_3H_8$  dans l'air).

$$K = \frac{\text{hauteur du pic } C_3H_8}{\text{hauteur du pic } C_2H_4} = 1,5$$

$H_1$  : hauteur du pic de  $C_2H_4$

$H_2$  : hauteur du pic de  $C_3H_8$

finalement  $Q = Q_7 - Q_0$

ou :  $Q_0$  : nombre de moles de  $C_2H_4$  produites au temps  $t = 0$  h

$Q_7$  : nombre de moles de  $C_2H_4$  produites au temps  $t = 7$  h

#### 4.3.3. - Conditions expérimentales

On utilise un chromatographe Intermast I.O.G. 112 F.L. selon les conditions suivantes

- Gaz vecteur	$N_2$
- température du four	50°C
- température d'injection	70°C
- température de détection	115°C

- Détecteur à ionisation de flamme
- La colonne en acier inoxydable, de 2 m de longueur et 0,31 cm de diamètre, est remplie de sphérosil XOBO 75.

## 5 - MÉTHODE D'ISOLEMENT DES SOUCHES A PARTIR DE NODULES

Après apparition et développement des nodules, les plantules sont retirées des tubes. On sectionne la racine de part et d'autre des nodules. Les nodules prélevés sont ensuite stérilisés.

### 5.1. - Stérilisation superficielle des nodules

On utilise une solution de bichlorure de mercure à la concentration de 1%. Le temps de contact avec les nodules étant de 3 min. Après quoi, on rince abondamment les nodules avec de l'eau bi-distillée stérile.

### 5.2. - Contrôle de l'asepsie superficielle des nodules

Les nodules ayant subi le traitement de désinfection, sont déposés sur milieu R.C.G. glucosé à 1 %, préalablement fondu et coulé en boîte de Pétri, à raison de 10 nodules par boîte.

Les boîtes sont ensuite mises en incubation en chambre chaude à 30°C. Si après 3 à 4 jours, il n'y a pas de développement de culture bactérienne autour des nodules, ayant subi le traitement de désinfection, les nodules sont alors considérés comme étant stériles.

### 5.3. - Isolement des souches à partir des nodules

Le nodule stérilisé est introduit dans un tube contenant 2 ml d'une solution stérile de saccharose à 20 % pour éviter la lyse des cellules. On écrase le nodule à l'aide de l'extrémité d'une tige en verre stérile.

La suspension ainsi obtenue est homogénéisée par agitation.

On procède alors à une série de dilutions. Pour déterminer le nombre de cellules de chaque souche présente dans le nodule, 0,1 ml de chaque dilution est étalé sur milieu solide (R.C.G.) additionné des

antibiotiques servant pour le marquage des souches (Identification).

## 6. - MÉTHODE D'ISOLEMENT DES MUTANTS DE CHIMIOTACTISME ET DE MOBILITÉ.

Dans la littérature, différentes techniques sont décrites pour l'obtention de mutants.

Les rayons ultra-violetts, l'acide nitrique, l'E.M.S. (éthyl-methane sulfonate) et la N.T.G. (N-méthyl N'-nitro-N-nitrosoguanidine) peuvent être utilisés.

Différents auteurs notamment MEGIAS (80) s'accordent à dire que la N.T.G. est le meilleur agent mutagène. Aussi l'a-t-on utilisée pour des essais d'obtention de mutants affectés sur leur caractère de mobilité et de chimiotactisme.

### 6.1. - Conditions de mutagenèse par la N.T.G.

On a adopté les mêmes conditions expérimentales que MEGIAS (80) pour l'obtention de mutants chez R. trifolii.

La N.T.G. a été utilisée à la concentration de 500 µg par litre. Elle a été dissoute dans le tampon tris maléate pH 6,6. La suspension bactérienne subissant l'action de l'agent mutagène, a été collectée à la fin de la phase logarithmique, à la concentration de  $10^8$  cellules par ml.

Le temps d'action de la N.T.G. est de 30 min

### 6.2. - Traitement par la N.T.G.

Une culture bactérienne de la souche de R. meliloti Ve 26, en fin de phase exponentielle est centrifugée et lavée 2 fois dans le tampon tris-maléate pH 6,6. Elle est ensuite diluée dans le même tampon ( $10^8$  cellules/ml).

L'agent mutagène est ensuite ajouté. L'incubation se fait en chambre chaude pendant 30 min.

L'agent mutagène est ensuite éliminé par centrifugation à 6000 g pendant 10 min. Les bactéries subissent ensuite une série de trois lavages dans le tampon de mutagenèse pour éliminer toute trace de l'agent mutagène.

### 6.3. - Technique d'enrichissement de la culture bactérienne en mutants

Un culot de centrifugation de la population mutée est déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu TY gélosé à 0,3 % et dilué au 1/100.

Au bout de 24 h d'incubation se développe une nappe bactérienne. Le diamètre de cette nappe dépend de la mobilité de la population : BOON (19).

De ce fait, d'une part COLLINS (31) sur S. typhimurium et ARMSTRONG (9) sur E. coli d'autre part, ont préconisé une méthode dite "négative swarn selection" pour isoler des mutants de mobilité et de chimiotactisme. En effet, des prélèvements effectués du centre et de la périphérie de la nappe de migration permettent d'isoler des mutants affectés sur leur mobilité et leur chimiotactisme.

Ainsi, des prélèvements centraux, permettent d'isoler des mutants  $mob^-$  et  $che^-$ . L'opération étant répétée 5 à 6 fois sur milieu semi-solide (TY gélosé à 0,3 % et dilué au 1/100).

Pour l'isolement de mutants hypermobiles, on utilise la même technique d'enrichissement sauf que les prélèvements sont effectués à la périphérie des nappes de migration. Il faut aussi remarquer que, l'étalement de la nappe bactérienne ne dépend pas de sa multiplication mais de sa migration : LAYACHI (70).

### 6.4. - Isolement des mutants

Après l'étape d'enrichissement, on procède à une série d'étalements sur milieu solide (TY gélosé à 1,5 %) de la suspension bactérienne ayant subi l'action de l'agent mutagène.

On teste ensuite la mobilité et le chimiotactisme des clones apparus sur milieu RHB<sub>1</sub> gélosé à 0,3 %. Ce test est complété par des observations en microscopie optique.

En effet : - un mutant non mobile (mob<sup>-</sup>) donne une colonie ponctuelle sur milieu semi-solide et parait immobile quand on fait une observation microscopique

- un mutant ché<sup>-</sup> donne soit, des colonies ponctuelles sur milieu semi-solide, mais mobiles en microscopie optique soit, des nappes bactériennes sans anneaux chimiotactiques : ADLER (4)
- un mutant mob<sup>+</sup> forme une nappe de migration plus importante que la souche sauvage.

## 7. TECHNIQUES DE SELECTION DE MUTANTS SPONTANÉS RESISTANTS AUX ANTIBIOTIQUES.

### 7.1. Solutions d'antibiotiques

Les antibiotiques utilisés dans ce présent travail, sont préparés et additionnés à des milieux dont la concentration finale en streptomycine est de 400 µg/ml, en tétracycline est de 10 µg/ml, en rifamycine est de 100 µg/ml, en ampicilline est de 100 µg/ml et enfin en kanamycine est de 200 µg/ml.

La conservation de solutions d'antibiotiques se fait à 4° C. Leur stérilisation s'effectue par filtration sur unité de filtration stérile Millipore "Millex" de porosité 0,2 µm.

### 7.2. - Obtention de mutants résistants aux antibiotiques

La sélection de mutants spontanés résistants aux fortes concentrations d'antibiotiques est réalisée par la méthode dite en double couche. Les bactéries sont cultivées en milieu riche TY jusqu'en fin de phase exponentielle (absorbance égale à 1 environ), puis 0,1 ml de cette suspension est étalé sur les boîtes de Pétri contenant du milieu R.C. fructosé à 1 % et contenant l'antibiotique en question. On ajoute alors 4 ml de gélose blanche préalablement fondue et maintenue à une température de 45° C. Les boîtes sont ensuite

homogénéisées par agitation manuelle.

Après incubation à 30° C, les clones apparus à la surface du milieu R.C. sont purifiés par isolements successifs sur milieu R.C. additionné d'antibiotiques.

Des cultures en milieu liquide additionnées ou non d'antibiotiques peuvent être réalisées à partir de ces clones.

Nous avons ainsi préparés :

- un mutant Ve 26. (Str<sup>R</sup>)
- un mutant Ve 26 mob<sup>-</sup> (Tc<sup>R</sup>)
- un mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> (Rif<sup>R</sup>)
- un mutant Ve 26 che<sup>-</sup> (Amp<sup>R</sup>.Kan<sup>R</sup>).

## RESULTATS - DISCUSSION

## 1. - ISOLEMENT ET ETUDE DES MUTANTS ISOLES A PARTIR DE LA SOUCHE DE RHIZOBIUM MELILOTI Ve 26

### 1.1 - Etude de la mobilité de la souche de R. meliloti Ve 26

#### 1.1.1 - Appréciation microscopique de la mobilité

Entre lame et lamelle la souche de *R. meliloti* Ve 26 est très mobile. Le mouvement bactérien est un déplacement des bactéries suivant des trajectoires droites suivies de pirouettes sur elles-mêmes pendant des fractions de temps très courtes, et des changements de direction. Ensuite survient une nouvelle période de nage en ligne droite suivie de brèves périodes de gigotements et ainsi de suite. Il existe aussi un sens de rotation du flagelle. En effet, des bactéries piégées par leur flagelle entre lame et lamelle bougent mais ne se déplacent pas. Dans ces conditions on voit bien qu'il y a un sens de rotation du flagelle : cette rotation se fait autour d'un axe principal (13, 14, 74).

#### 1.1.2 - Appréciation macroscopique de la mobilité

BOON en 1975 (19) a défini une méthode de migration en boîte de Pétri sur milieu semi-solide (gélosé à 0,3 %) pour une appréciation macroscopique de la migration bactérienne. En effet, un inoculum soit d'un clone soit d'un culot de centrifugation, déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant un milieu de culture, migre radialement et forme une nappe bactérienne. Le diamètre de cette nappe dépend à la fois de la concentration d'agar dans le milieu : la concentration de 0,3 % donne les meilleurs résultats (70), du temps et de la température d'incubation, et naturellement de la mobilité de la population bactérienne.

Cette même méthode permet aussi d'apprécier le chimiotactisme d'une souche bactérienne. En effet, selon ADLER (2), une population bactérienne à fonction chimiotactique présente, sur milieu semi-solide, des nappes de migrations concentriques ; on parle alors d'anneaux chimiotactiques. Les anneaux chimiotactiques correspondent à une accumulation de bactéries par migration et non par multiplication (70).

PHOTOGRAPHIE 1 - Nappe de migration sur milieu semi solide (TY gélosé à 0,3 % et dilué au 1/100) de la souche de R. meliloti, mobile et chimiotactique.  
Incubation pendant 5 jours à 30°C.

Ainsi, après 5 jours d'incubation à 30°C d'un culot de centrifugation de la souche sauvage de *R. meliloti* Ve 26, on peut observer comme le montre la photographie 1, une nappe bactérienne qui occupe tout le diamètre de la boîte de Pétri ; preuve d'une mobilité importante, les cercles de densification concentriques correspondent aux anneaux chimiotactiques.

La souche de *R. meliloti* Ve 26 est donc mobile et chimiotactique.

### 1.1.3 - Influence de certains paramètres physico-chimiques sur la mobilité

La mobilité de la souche de *R. meliloti* Ve 26 est affectée par certains facteurs physico-chimiques.

Ainsi, l'augmentation de la concentration en phosphate de potassium, dans le milieu de culture, bloque complètement la mobilité de la population bactérienne ; à la concentration de 20 mM, la mobilité de la souche de *R. meliloti* Ve 26 est affectée.

De même, l'augmentation de la température d'incubation de 30 à 38°C élimine la mobilité.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par AMES et coll. (8).

## 1.2 - Isolément des mutants de mobilité et de chimiotactisme

La technique utilisée est décrite dans la partie "**Matériels et Méthodes**".

Après action de la N.T.G. (N-nitro N-méthyl N-nitrosoguanidine) et enrichissement de la population bactérienne en mutants affectés sur leur mobilité et sur leur chimiotactisme, trois types de mutants ont été isolés à partir de la souche sauvage de *R. meliloti* Ve 26 mobile et chimiotactique.

Il s'agit d'un mutant non mobile ( $mob^-$ ), d'un autre non chimiotactique ( $che^-$ ) et enfin d'un mutant hypermobile ( $mob^+$ ). On s'était aussi intéressé, dans ce travail, à isoler un mutant hyperchimiotactique ; malheureusement ce mutant n'a pas été obtenu.

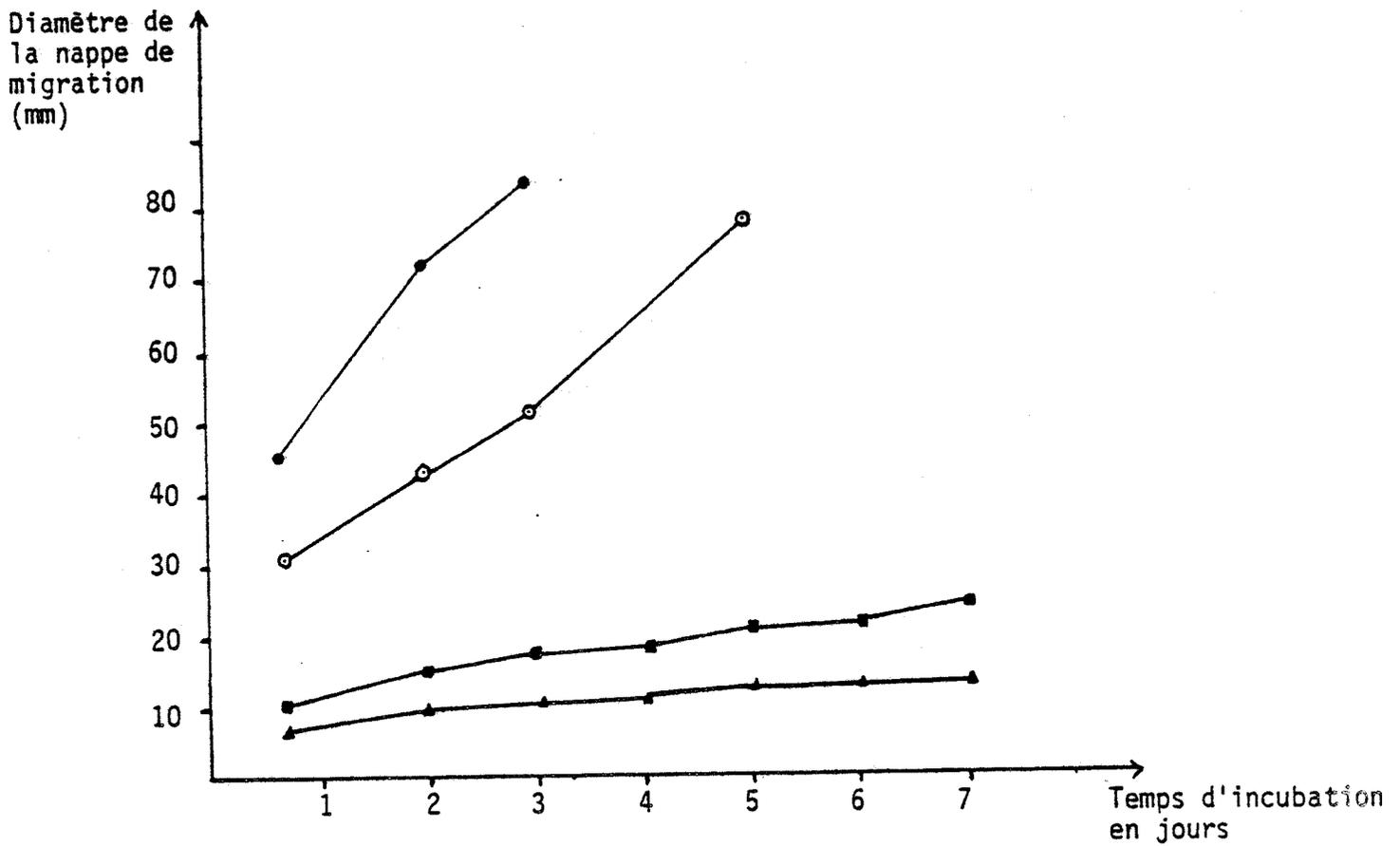


FIGURE 4 - Evolution du diamètre de la nappe de migration en fonction du temps d'incubation, pour la souche sauvage de *R. meliloti* Ve 26 (○) et ses mutants  $mob^+$  (●),  $mob^-$  (▲) et  $che^-$  (■). Incubation à 30°C. Milieu TY/100 gélosé à 0,3 %.

### 1.3 - Etude de la migration en milieu semi-solide de la souche sauvage de R. meliloti Ve 26 et des mutants isolés

Pour cette étude, nous avons adopté les mêmes conditions expérimentales définies par LAYACHI (70). Cet auteur préconise, pour avoir des réponses optimales, d'utiliser le milieu TY sous sa forme semi-solide et dilué au 1/100. Pour sa part, ADLER (2) signale que plus la concentration en éléments nutritifs est faible dans le milieu, plus la réponse chimiotactique est importante. Nous avons suivi le développement du diamètre de la nappe bactérienne pour la souche sauvage de *R. meliloti* Ve 26 et des mutants Ve 26 mob<sup>-</sup>, Ve 26 che<sup>-</sup> et Ve 26 mob<sup>+</sup>. Des mesures effectuées toutes les 24 heures nous ont permis de tracer le graphique 4.

Pour la souche sauvage de *R. meliloti* Ve 26, on remarque une évolution linéaire de la nappe bactérienne en fonction du temps. Une nappe de migration d'un diamètre de 77 mm est obtenue après 5 jours d'incubation à 30°C tandis qu'un diamètre de 83 mm est obtenu seulement après 3 jours d'incubation pour le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> ; la courbe présente une pente beaucoup plus importante. Pour les deux autres mutants, le non mobile et le non chimiotactique des diamètres de migration beaucoup plus faibles sont observés. En effet, après 7 jours d'incubation le mutant non mobile forme une nappe de 12 mm de diamètre et le mutant non chimiotactique une nappe de 22 mm.

## **2. - ETUDE DES PROPRIETES SYMBIOTIQUES DE LA SOUCHE SAUVAGE DE R. MELILOTI Ve 26 ET DE SES MUTANTS mob<sup>-</sup>, che<sup>-</sup> ET mob<sup>+</sup>, EN MILIEU LIQUIDE**

La stabilité des marqueurs génétiques de résistance aux antibiotiques utilisés après passage sur plante, a été contrôlée sur des nodules provenant de plantes inoculées séparément par chacune des souches étudiées.

La numération des cellules revivifiables isolées des nodules ayant donné un résultat semblable sur milieu additionné ou non d'antibiotiques, nous avons conclu que la résistance de nos souches était bien maintenue après passage sur plante.

Inoculation des plantes de luzerne	Nombre moyen de nodules par plante	Quantité de C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> en nM par plante et <sup>2</sup> par heure
Ve 26	9	29,7
Ve 26 (str <sup>R</sup> )	8,7	28
Ve 26 mob <sup>-</sup>	8,4	27,4
Ve 26 mob <sup>-</sup> (tc <sup>R</sup> )	8,6	28,2
Ve 26 mob <sup>+</sup>	8,9	29,3
Ve 26 mob <sup>+</sup> (Rif <sup>R</sup> )	8,5	25,6
Ve 26 che <sup>-</sup>	9,2	30,2
Ve 26 che <sup>-</sup> (Amp <sup>R</sup> .Kan <sup>R</sup> )	8,6	27,3

TABLEAU 1 - Etude de l'infectivité et de l'efficacité de la souche Ve 26 de R. meliloti et des mutants isolés. Culture en milieu liquide. 10 plantules ont été testées après 6 semaines de culture en serre.

str : streptomycine (400 µg/ml)

tc : tétracycline (10 µg/ml)

Rif : rifamycine (100 µg/ml)

Amp : ampicilline (100 µg/ml)

Kan : kanamycine (200 µg/ml)

## 2.1 - Vérification de l'infectivité des souches étudiées

L'infectivité, réaction de pénétration des bactéries à l'intérieur des poils racinaires et de formation de nodules, a été vérifiée pour chacune des souches étudiées.

Dans un travail sur la compétitivité, cette propriété pourrait être utilisée pour différencier une souche par rapport à une autre. Les résultats de ce test sont rassemblés dans le tableau 1.

Ils montrent d'une part que les souches étudiées, sauvages ou mutantes, sont bien infectieuses. D'autre part, par rapport au type sauvage, les mutants ne présentent pas de différence d'infectivité ; on obtient un nombre de nodules variant entre 8,4 et 9,2 par plante.

Il est aussi important de signaler que le caractère de résistance aux antibiotiques ne confère pas de modification de l'infectivité.

## 2.2 - Contrôle de l'efficacité des souches étudiées

Le contrôle de l'efficacité, réaction de fixation de l'azote atmosphérique à l'intérieur des nodules, a été vérifié sur des plantules qui ont été maintenues en croissance pendant 6 semaines après l'inoculation des souches de **Rhizobium**.

L'efficacité de la symbiose a été contrôlée suivant la méthode de dosage de la nitrogénase par réduction de l'acétylène décrite dans le chapitre "**Matériels et Méthodes**". Les résultats de ce dosage sont rassemblés dans le tableau 1 et montrent d'une part, que les différentes souches étudiées sont efficaces en symbiose avec la luzerne et d'autre part, que les souches mutantes  $mob^-$ ,  $che^-$  et  $mob^+$  ont une efficacité équivalente à celle de la souche sauvage parentale de **R. meliloti** Ve 26.

De plus, et comme pour l'infectivité, la résistance aux antibiotiques n'a pas provoquée d'altération de l'efficacité des souches étudiées.

### 2.3 - Conclusion

D'après les résultats du tableau 1, deux conclusions importantes peuvent être tirées :

- les mutants affectés sur leur caractère de mobilité et de chimiotactisme ne présentent pas d'altération de leurs propriétés symbiotiques par rapport au type sauvage parental. Ce qui veut dire que, lors d'inoculation simple la mobilité et le chimiotactisme n'interviennent pas dans l'infectivité et dans l'efficience.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par AMES et coll. (7, 8). De plus cette étude a été effectuée en milieu liquide, les inoculats sont déposés "au pied" des plantules. Le rôle de la mobilité et du chimiotactisme peut être ainsi "masqué" (52, 79, 82) ;

- la technique de reconnaissance des souches bactériennes par la résistance aux antibiotiques ne confère pas de modification des propriétés symbiotiques des souches étudiées.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus dans d'autres travaux (44, 100, 102).

### 3. - ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA MOBILITE ET DU CHIMIOTACTISME SUR LA COMPETITIVITE, EN MINI-SERRE

Pour mieux étudier la compétitivité et afin de nous rapprocher des conditions naturelles, une mini-serre dont la description est faite dans la partie "**Matériels et Méthodes**" a été conçue dans notre Laboratoire par LAYACHI (70) et OCHIN (84). Elle permet, d'une part de réaliser des essais avec un grand nombre de graines dans des conditions de cultures identiques et, d'autre part des inoculations à distance permettant de mieux apprécier le rôle de la mobilité et du chimiotactisme dans la compétitivité. Dans nos essais, nous avons utilisé comme substrat solide la perlite dont le diamètre des grains est compris entre 1 et 3 mm.

souche isolée nodules				Total
	Ve 26	Ve 26 mob <sup>+</sup> (Rif <sup>R</sup> )	Ve 26 + Ve 26 mob <sup>+</sup> (Rif <sup>R</sup> )	
nombre	22	27	1	50
%	44	54	2	100

TABLEAU 2 - Etude de l'infectivité en "mini-serre" (perlite), lors de l'inoculation mixte avec la souche sauvage Ve 26 et son mutant Ve 26 mob<sup>+</sup>. (Rif<sup>R</sup>).



souche isolée nodules				Total
	Ve 26 (str <sup>R</sup> )	Ve 26 mob <sup>+</sup>	Ve 26 mob <sup>+</sup> + Ve 26 (str <sup>R</sup> )	
nombre	19	28	3	50
%	38	56	6	100

TABLEAU 3 - Etude de l'infectivité en "mini-serre", lors d'inoculation mixte avec la souche Ve 26 (str<sup>R</sup>) et le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup>.

**3.1 - Caractérisations de l'origine des nodules obtenus après inoculation mixte par la souche sauvage Ve 26 et de ses mutants Ve 26 mob<sup>-</sup>, Ve 26 che<sup>-</sup> et Ve 26 mob<sup>+</sup>.**

**3.1.1 - Inoculation mixte avec la même concentration de chacune des souches étudiées dans l'inoculum**

**3.1.1.1 - Inoculation mixte par la souche sauvage Ve 26 et son mutant Ve 26 mob<sup>+</sup>.**

La concentration dans l'inoculum de chacune des deux souches étudiées est de  $10^6$  cellules/ml de milieu de NICOL et THORNTON. Nous avons utilisé cette concentration en tenant compte du taux de mutation spontané des différentes souches étudiées (de l'ordre de  $10^{-8}$ ).

Les souches ont été inoculées à concentration égale.

Nous avons cherché à déterminer le nombre de nodules attribuables à chacune des deux souches inoculées conjointement à de jeunes plantes de luzerne.

De plus, pour voir si le caractère de résistance aux antibiotiques ne confère pas de modification de la compétitivité d'une souche par rapport à une autre, on a d'abord dans une première étape inoculé avec la souche sauvage Ve 26 et son mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> Rif<sup>R</sup> ensuite dans une seconde étape, par la souche Ve 26 str<sup>R</sup> et son mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> (marquage inverse).

Les résultats de ces tests sont rassemblés dans les tableaux 2 et 3.

Sur les 50 nodules testés, que ce soit dans l'un ou dans l'autre cas, on retrouve la souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup> dans plus de 50 % des nodules. L'hypermobilité de la souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup> par rapport au type sauvage parental semble lui permettre d'infecter davantage de poils racinaires.

nodules \ souche isolée	Ve 26			Total
	Ve26	Ve 26 che <sup>-</sup> (Amp <sup>R</sup> .Kan <sup>R</sup> )	Ve 26 che <sup>-</sup> (Amp <sup>R</sup> .Kan <sup>R</sup> )	
nombre	37	8	5	50
%	74	16	10	100

TABLEAU 4 - Etude de l'infectivité en "mini-serre", lors d'inoculation avec la souche sauvage de R. meliloti Ve 26 et son mutant Ve 26 che<sup>-</sup> (Amp<sup>R</sup>.Kan<sup>R</sup>).



nodules \ souche isolée	Ve 26			Total
	Ve 26 (str <sup>R</sup> )	Ve 26 che <sup>-</sup>	Ve 26 (str <sup>R</sup> ) + Ve 26 che <sup>-</sup>	
nombre	36	7	7	50
%	72	14	14	100

TABLEAU 5 - Etude de l'infectivité en "mini-serre", lors de l'inoculation mixte avec la souche Ve 26 (str<sup>R</sup>) et le mutant Ve 26 che<sup>-</sup>.

nodules	souche isolée	Ve 26	Ve 26 mob <sup>-</sup> (Tc <sup>R</sup> )	Ve 26 + Ve 26 mob <sup>-</sup> (Tc <sup>R</sup> )	Total
	nombre		44	3	3
%		88	6	6	100

TABLEAU 6 - Etude de l'infectivité en "mini-serre", lors d'inoculation mixte avec la souche sauvage de R. meliloti Ve 26 et son mutant Ve 26 mob<sup>-</sup> (tc<sup>R</sup>).

nodules	souche isolée	Ve 26 (str <sup>R</sup> )	Ve 26 mob <sup>-</sup>	Ve 26 (str <sup>R</sup> ) + Ve 26 mob <sup>-</sup>	Total
	nombre		47	1	2
%		94	2	4	100

TABLEAU 7 - Etude de l'infectivité en "mini-serre", lors d'inoculation mixte avec la souche Ve 26 (str<sup>R</sup>) et le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>.

### 3.1.1.2 - Inoculation mixte par la souche sauvage Ve 26 et le mutant Ve 26 che<sup>-</sup>.

Comme dans le cas précédent, on a procédé à deux types d'inoculations mixtes : cas où la souche mutante Ve 26 che<sup>-</sup> est marquée (ampicilline et kanamycine) et le cas où la souche Ve 26 est marquée (streptomycine).

Les résultats de ces inoculations mixtes sont consignés dans les tableaux 4 et 5.

Dans un cas comme dans l'autre, on remarque que la souche Ve 26 mobile et chimiotactique est plus compétitive que son mutant non chimiotactique.

En effet, 70 % des nodules sont occupés uniquement par la souche sauvage.

### 3.1.1.3 - Inoculation mixte par la souche sauvage Ve 26 et son mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>.

Les résultats de ces tests sont consignés dans les tableaux 6 et 7. On a environ 90 % des nodules qui ne sont occupés que par la souche Ve 26 mobile et chimiotactique. Son succès compétitif paraît donc incontestable. Ceci se comprend dans la mesure où la souche sauvage, par le biais de sa mobilité et de son chimiotactisme, se déplace beaucoup plus vite que le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup> et infecterait donc plus vite les sites de fixations racinaires ; leur nombre étant en fait un facteur limitant pour la nodulation (15, 16, 47).

### 3.1.1.4 - Conclusion

D'après les résultats consignés dans les tableaux 2 et 3, 4 et 5 et 6 et 7, on peut considérer que la technique d'identification des souches bactériennes par l'utilisation de marqueurs génétiques de résistance aux antibiotiques semble être bien adaptée et constituer une méthode fiable pour l'étude de la compétitivité. Ceci est en accord avec les résultats de certains auteurs notamment SCHINGHAMER (100).

D'autre part, l'importance de la mobilité et du chimiotactisme dans le phénomène de nodulation paraît évidente. En outre, la souche sauvage de *R. meliloti* Ve 26 est beaucoup plus compétitive que la souche mutante Ve 26  $mob^-$  par rapport au mutant Ve 26  $che^-$ . Ceci pourrait être expliqué par le fait que la souche Ve 26  $che^-$  n'est pas chimiotactique mais présente une certaine mobilité ; elle est certes plus réduite que celle du type sauvage parental mobile et chimiotactique.

Selon certains auteurs (8, 70, 84), ces deux facteurs bactériens peuvent constituer des facteurs limitants pour la nodulation et donc intervenir dans la compétitivité pour l'infection.

### 3.1.2 - Inoculation mixte avec les mutants en proportions inégales dans l'inoculum

Dans ce chapitre, les mêmes conditions expérimentales sont appliquées mais dans l'inoculum les souches bactériennes sont inégalement représentées ; ceci doit nous permettre de savoir jusqu'à quelle concentration une souche mobile et chimiotactique arrivera à être plus compétitive par rapport à des souches non mobiles ou non chimiotactiques.

C'est un renseignement d'intérêt pratique qu'il est important de connaître pour l'inoculation artificielle au champ par des souches de *Rhizobium*.

Pour mieux apprécier l'influence de la mobilité et du chimiotactisme, on a choisi d'étudier la compétitivité du mutant Ve 26  $mob^+$  par rapport respectivement au mutant Ve 26  $mob^-$  et au mutant Ve 26  $che^-$ .

#### 3.1.2.1 - L'inoculation mixte par le mutant Ve 26 $mob^+$ et le mutant Ve 26 $mob^-$ .

Nous avons testé différents rapports de concentration des deux souches dans l'inoculum. Ainsi des rapports de 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000 et 1/10000 du mutant Ve 26  $mob^+$  par rapport au mutant Ve 26  $mob^-$  ont été réalisés.

inoculum : mob <sup>+</sup> /mob <sup>-</sup>	souche isolée	Ve 26 mob <sup>+</sup>	Ve 26 mob <sup>-</sup>	Ve 26 mob <sup>+</sup> + Ve 26 mob <sup>-</sup>
	1/1		43	5
1/10		36	9	5
1/100		30	12	8
1/1000		28	13	9
1/10000		24	15	11

TABLEAU 8 - Etude de l'infectivité en "mini-serre", en fonction du rapport de concentration dans l'inoculum du mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> et du mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>.

50 nodules ont été étudiés dans chaque cas.

inoculum : mob <sup>+</sup> /che <sup>-</sup>	souche isolée		
	Ve 26 mob <sup>+</sup>	Ve 26 che <sup>-</sup>	Ve 26 mob <sup>+</sup> + Ve 26 che <sup>-</sup>
1/1	40	8	2
1/10	32	10	8
1/100	25	12	13
1/1000	22	16	12
1/10000	19	17	14



TABLEAU 9 - Etude de l'infectivité en "mini-serre", en fonction du rapport de concentration dans l'inoculum du mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> et du mutant Ve 26 che<sup>-</sup>.

50 nodules ont été testés dans chaque cas.

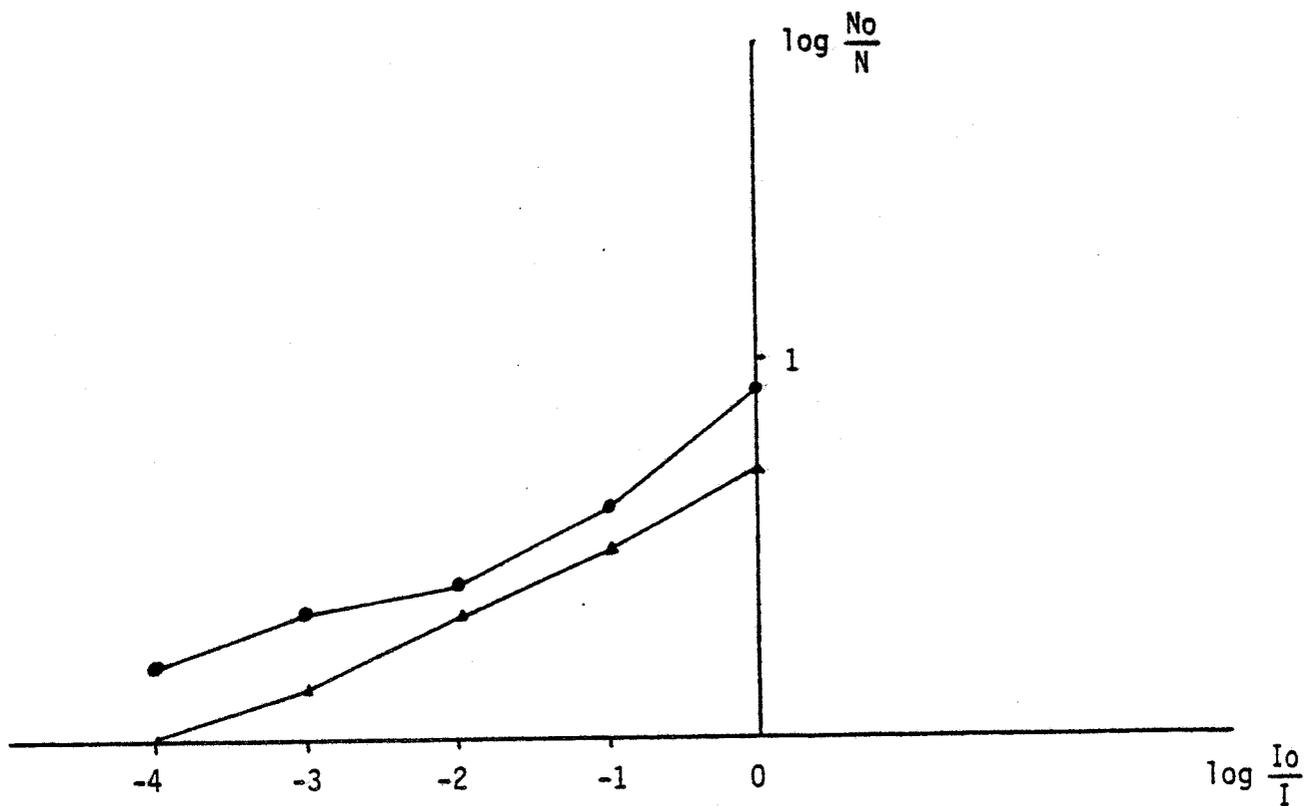


FIGURE 5 - Etude de la compétitivité en mini-serre entre le mutant Ve 26  $mob^+$  de Rhizobium meliloti et les mutants Ve 26  $mob^-$  (▲) ou Ve 26  $che^-$  (●).

$No$  = nombre de nodules formés par la souche Ve 26  $mob^+$ .

$N$  = nombre de nodules formés par la souche Ve 26  $mob^-$  ou Ve 26  $che^-$ .

$Io$  = concentration de la souche Ve 26  $mob^+$  dans l'inoculum.

$I$  = concentration de la souche Ve 26  $mob^-$  ou Ve 26  $che^-$  dans l'inoculum.

Les résultats de ces inoculations mixtes sont consignés dans le tableau 8.

Nous remarquons que jusqu'à un rapport de concentration de 1/10000, c'est-à-dire 1 bactérie Ve 26 mob<sup>+</sup> pour 10000 bactéries Ve 26 mob<sup>-</sup>, la souche Ve 26 mob<sup>+</sup> reste plus compétitive et est présente dans 24 nodules sur les 50 testés. Dans 15 nodules on retrouve le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup> et dans les 11 restant on retrouve à la fois le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> et le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>.

### 3.1.2.2 - L'inoculation mixte par le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> et le mutant Ve 26 che<sup>-</sup>.

Le succès compétitif de la souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup> sur le mutant Ve 26 che<sup>-</sup> se retrouve dans les différents cas testés. En effet, et comme le montre les résultats du tableau 9, pour un rapport de concentration égal au 1/10000, 38 % des nodules testés sont occupés par le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup>, 34 % par le mutant Ve 26 che<sup>-</sup> et le reste soit 28 % par les 2 souches.

Il est cependant intéressant de noter que le succès compétitif du mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> sur le mutant Ve 26 che<sup>-</sup> est moins important que sur le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>. Ceci s'explique par le fait que le mutant Ve 26 che<sup>-</sup> présente une mobilité plus importante que le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>.

### 3.1.2.3 - Indice de compétitivité du mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> respectivement, par rapport au mutant Ve 26 mob<sup>-</sup> et au mutant Ve 26 che<sup>-</sup>.

On a représenté sur la figure 5 le logarithme du rapport des bactéries dans l'inoculum en fonction du rapport de nodules formés par chaque souche selon la représentation de MARQUES-PINTO et al. (92a). En effet, l'équation de MARQUES-PINTO (voir "**Matériels et Méthodes**") permet de calculer un coefficient dit indice de compétitivité, qui représente le succès de la nodulation d'une souche sur une autre, ceci lorsque les concentrations bactériennes sont égales dans l'inoculum. Il est de 8,6 dans le cas du mélange souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup> - souche mutante Ve 26 mob<sup>-</sup> et de 5 dans le cas du mélange souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup> - souche mutante Ve 26 che<sup>-</sup>.

Cela signifie que le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> forme 5 fois plus de nodules que le mutant non chimiotactique et 8,6 fois plus de nodules que le mutant non mobile. La souche Ve 26 mob<sup>+</sup> est donc nettement plus compétitive que les souches Ve 26 che<sup>-</sup> et Ve 26 mob<sup>-</sup>. Ceci montre l'importance de la mobilité et du chimiotactisme dans les phénomènes de compétition et de nodulation lorsque deux ou plusieurs souches sont en présence de leurs plantes-hôtes.

D'autres auteurs (8, 84) signalent des résultats similaires.

### 3.1.3 - Autres cas

#### 3.1.3.1 - Inoculation secondaire du mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> après une inoculation préalable par les mutants Ve 26 mob<sup>-</sup> et Ve 26 che<sup>-</sup>.

Dans cette manipulation, les jeunes plantes sont d'abord inoculées par les mutants Ve 26 mob<sup>-</sup> ou Ve 26 che<sup>-</sup>, puis après par la souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup>.

##### 3.1.3.1.1 - Inoculation mixte par le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup> puis le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup>.

Les résultats de ces tests sont rassemblés dans le tableau 10. Quand le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> est ajouté 1 heure après le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>, ceci n'altère pratiquement pas son succès compétitif puisque 86 % des nodules sont uniquement occupés par le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup>.

Tandis que si le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> est ajouté 3 heures après l'inoculation par le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup> on a 26 % des nodules infectés par le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup> alors qu'ils n'étaient que de 4 % dans le cas d'1 heure.

L'augmentation du pourcentage de nodules occupés par la souche mutante Ve 26 mob<sup>-</sup> s'explique uniquement par la "disponibilité" des sites de fixation racinaires ; cette souche immobile n'est donc entraînée que par diffusion passive.

temps (H) \ souche isolée	Ve 26 mob <sup>+</sup>	Ve 26 mob <sup>-</sup>	Ve 26 mob <sup>+</sup> + Ve 26 mob <sup>-</sup>
1	43	2	5
2	37	7	6
3	28	13	9

TABLEAU 10 - Etude de l'infectivité en "mini-serre". Inoculation mixte avec le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> et le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>. Le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> étant inoculé 1, 2 et 3 heures après le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>. Etude réalisée sur 50 nodules.

temps (H) \ souche isolée	Ve 26 mob <sup>+</sup>	Ve 26 che <sup>-</sup>	Ve 26 mob <sup>+</sup> + Ve 26 che <sup>-</sup>
1	31	18	1
2	27	17	6
3	24	22	4

TABLEAU 11 - Etude de l'infectivité en "mini-serre". Inoculation mixte avec le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> et le mutant Ve 26 che<sup>-</sup>. Le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> étant inoculé 1, 2 et 3 heures après le mutant Ve 26 che<sup>-</sup>. Etude réalisée sur 50 nodules.

### 3.1.3.1.2 - Inoculation mixte par le mutant Ve 26 che<sup>-</sup> puis le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup>.

Les résultats du tableau 11 montre que si les deux souches sont inoculées à 3 heures d'intervalle, on a presque autant de nodules occupés par l'un ou par l'autre des deux mutants étudiés. En effet, 44 % des nodules sont occupés par le mutant Ve 26 che<sup>-</sup> et 48 % par le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup>. Tandis que si l'intervalle est d'1 heure la souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup> reste très compétitive.

La souche mutante Ve 26 che<sup>-</sup> étant mobile mais non chimiotactique, elle a donc le temps de se déplacer et de coloniser les sites d'infection racinaires des jeunes plantes de luzerne.

### 3.1.3.1.3 - Conclusion

Ici encore l'influence de la mobilité et du chimiotactisme paraît bien claire. La souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup> inoculée 3 heures après les mutants Ve 26 mob<sup>-</sup> ou Ve 26 che<sup>-</sup>, arrive encore à être très compétitive, elle forme davantage de nodules, et cela est surtout du à sa mobilité.

### 3.1.3.2 - Elimination du mutant Ve 26 mob<sup>+</sup>, à différents temps, après inoculations mixtes avec le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup> ou le mutant Ve 26 che<sup>-</sup>.

Dans cette étude, les deux souches sont inoculées en même temps, la souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup> est ensuite éliminer par addition d'antibiotiques (ampicilline et kanamycine quant elle est en mélange avec le mutant Ve 26 che<sup>-</sup> et tétracycline quant elle est en mélange avec le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>) 1, 2 et 3 heures après l'inoculation.

Les souches sont en proportions égales dans l'inoculum.

temps (H) \ souche isolée	Ve 26 mob <sup>+</sup>	Ve 26 mob <sup>-</sup>	Ve 26 mob <sup>+</sup> + Ve 26 mob <sup>-</sup>
1	9	41	0
2	34	8	8
3	42	7	1

TABLEAU 12 - Etude de l'infectivité en "mini-serre". Inoculation mixte avec le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> et le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>. Le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> est éliminé 1, 2 et 3 heures après l'inoculation par addition de tétracycline (le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup> étant résistant à cet antibiotique).

50 nodules ont été testés.

temps (H) \ souche isolée	Ve 26 mob <sup>+</sup>	Ve 26 che <sup>-</sup>	Ve 26 mob <sup>+</sup> + Ve 26 che <sup>-</sup>
1	6	44	0
2	23	21	6
3	31	16	3

TABLEAU 13 - Etude de l'infectivité en "mini-serre". Inoculation mixte avec le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> et le mutant Ve 26 che<sup>-</sup>. Le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> est éliminé 1, 2 et 3 heures après l'inoculation par addition d'ampicilline et de kanamycine (le mutant Ve 26 che<sup>-</sup> étant résistant à ces deux antibiotiques).

50 nodules ont été testés.

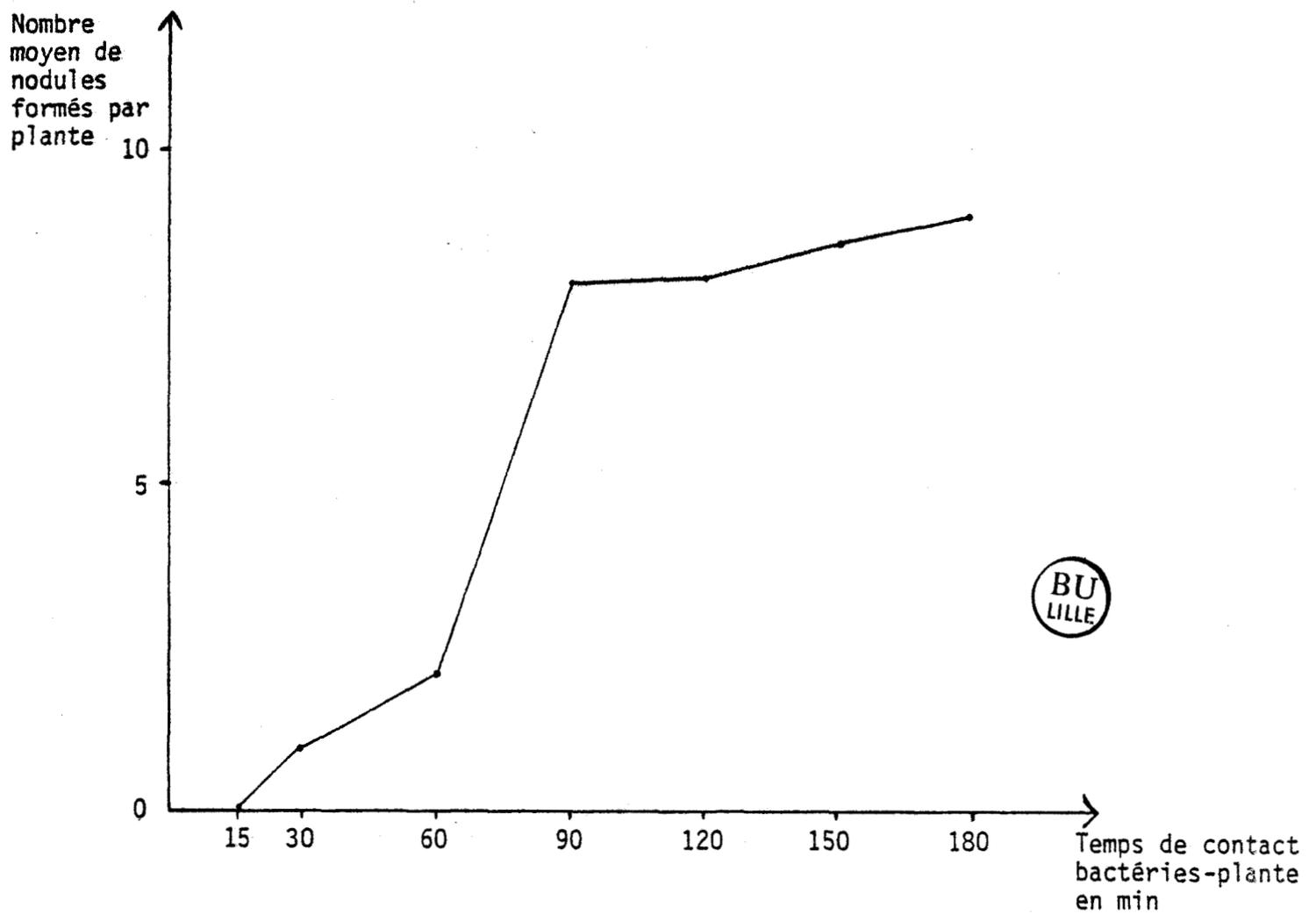


FIGURE 6 - Nombre de nodules formés par de jeunes plantes de luzerne inoculées avec le mutant Ve 26  $mob^+$ , en fonction du temps de contact bactéries-plante.  
Etude effectuée sur 10 plantes.

### 3.1.3.2.1 - Inoculation mixte par le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> et le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>.

D'après les résultats du tableau 12, on constate que l'élimination de la souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup>, 3 heures après l'inoculation mixte avec le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>, ne provoque pratiquement pas de modification de son pouvoir nodulant. Tandis que si on l'élimine 1 heure après l'inoculation, la plupart des nodules sont occupés par la souche Ve 26 mob<sup>-</sup>.

### 3.1.3.2.2 - Inoculation mixte par le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> et le mutant Ve 26 che<sup>-</sup>.

Les résultats du tableau 13 montrent que si l'élimination de la souche Ve 26 mob<sup>+</sup> se pratique 3 heures après l'inoculation, la majorité des nodules sont infectés par la souche Ve 26 mob<sup>+</sup>. Alors que si l'élimination s'effectue 1 heure après, la souche mutante Ve 26 che<sup>-</sup> forme le plus de nodules.

### 3.1.3.2.3 - Détermination du temps nécessaire à l'adsorption de la souche mutante de R. meliloti Ve 26 mob<sup>+</sup> à la surface des poils racinaires

Pour essayer d'interpréter les résultats des tableaux 12 et 13, nous avons essayé de déterminer le temps nécessaire à la souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup> pour infecter et pénétrer à l'intérieur des poils racinaires.

Pour cela nous avons réalisé la manipulation suivante : à de jeunes plantes de luzerne cultivées en condition de serre et inoculées par le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup>, nous avons ajouté à différentes périodes de la tétracycline pour obtenir une concentration finale de 10 µg/ml.

La tétracycline est ajoutée pour éliminer du milieu de culture tous les *Rhizobium*, les bactéries ayant pénétré à l'intérieur de la racine sont protégées de l'effet de l'antibiotique (85). Les résultats de ces tests sont représentés dans la figure 6, et montrent que pour des temps de contacts plante-bactéries supérieurs à 90 min, la souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup> arrive à infecter les poils racinaires et à provoquer une nodulation importante. Par contre, pour des périodes inférieures à 90 min, le pouvoir infectant du mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> se trouve de beaucoup affaibli voire même nul.

PUEPPKE (92b) indique qu'il faudrait, pour une adsorption maximale des souches de *Rhizobium* à l'intérieur des poils racinaires, des périodes de contact plante-bactéries de l'ordre de 120 min. Il indique aussi que cette capacité d'adsorption des *Rhizobia* est indépendante à la fois de la plante-hôte et du pouvoir infectant des bactéries.

#### 3.1.3.2.4 - Discussion et conclusion

L'expérimentation antérieure nous permet de mieux comprendre les résultats des tableaux 12 et 13. En effet, lorsque le mutant Ve 26  $mob^+$  est éliminé 1 heure après l'inoculation mixte, la majorité des nodules est occupée par le mutant Ve 26  $che^-$  ou le mutant Ve 26  $mob^-$ . La présence de nodules contenant le mutant Ve 26  $mob^+$  peut s'expliquer par le fait que l'élimination, pratiquée dans les petites alvéoles de la mini-serre, ne s'effectue pas de façon totale ; un certain nombre de bactéries Ve 26  $mob^+$  a déjà migré dans les grandes alvéoles.

Par contre, si l'élimination de la souche mutante Ve 26  $mob^+$  est effectuée après 2 heures, cela n'a pratiquement pas d'effet. Par sa mobilité importante, le mutant Ve 26  $mob^+$  a bien déjà eu le temps de migrer de la petite vers la grande alvéole, d'être adsorbé et de pénétrer à l'intérieur des racines des plantules de luzerne.

Ceci nous amène à penser que le succès compétitif de la souche mutante Ve 26  $mob^+$  est du principalement à sa mobilité. Cette mobilité lui permet d'être adsorbé et d'occuper les sites d'infection racinaires plus rapidement que les mutants non mobiles ou non chimiotactiques.

### 3.2 - Etude de la compétitivité entre les souches mutantes de *R. meliloti* Ve 26 $mob^+$ et $mob^-$ et la souche de *R. meliloti* 2011

Dans cette étape de notre travail, nous avons étudié l'influence de la mobilité et du chimiotactisme sur la compétitivité lors d'inoculations mixtes en utilisant une autre souche de *R. meliloti* : la souche 2011.

Le choix de cette souche s'est basé sur le fait qu'elle est très peu mobile. De plus, c'est une souche qui est bien étudiée dans notre laboratoire.

nodules	souche isolée		2011	Ve 26 mob <sup>+</sup> +	2011	Total
	Ve 26 mob <sup>+</sup>					
nombre	24		17	9	50	
%	48		34	18	100	

TABLEAU 14 - Etude de l'infectivité en "mini-serre", lors d'inoculation mixte avec la souche de R. meliloti Ve 26 mob<sup>+</sup> et la souche de R. meliloti 2011. Etude réalisée sur 50 nodules.



nodules	souche isolée		2011	Ve 26 mob <sup>-</sup> +	2011	Total
	Ve 26 mob <sup>-</sup>					
nombre	18		21	11	50	
%	36		42	22	100	

TABLEAU 15 - Etude de l'infectivité en "mini-serre", lors d'inoculation mixte avec la souche de R. meliloti Ve 26 mob<sup>-</sup> et la souche de R. meliloti 2011. Etude réalisée sur 50 nodules.

Cette manipulation doit nous permettre de savoir s'il n'y a pas d'autres facteurs que la mobilité, qui joueraient un rôle dans la compétitivité pour l'infection entre souches de *Rhizobium*.

### 3.2.1 - Inoculation mixte par la souche mutante de R. meliloti Ve 26 mob<sup>+</sup> et la souche de R. meliloti 2011

Les deux souches de *R. meliloti* utilisées ont été inoculées à la même concentration. Après 6 semaines de culture de jeunes plantes de luzerne en "mini-serre" et en substrat solide, on a obtenu les résultats figurant dans le tableau 14. On remarque que 48 % des nodules testés ont été infectés par le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup> et 34 % par la souche 2011. Dans 18 % des nodules, on retrouve à la fois la souche Ve 26 mob<sup>+</sup> et la souche 2011.

Ainsi, dans nos conditions expérimentales, la souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup> paraît plus compétitive que la souche 2011. Il est cependant important de noter que le pouvoir compétitif de la souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup> est ici inférieur à celui obtenu quand elle est inoculée avec le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>. La mobilité de la souche 2011 étant très faible, d'autres facteurs doivent certainement intervenir dans la compétitivité entre souches bactériennes de *Rhizobium* et peuvent expliquer le succès compétitif d'une souche sur une autre. Pour essayer de mieux comprendre le phénomène, nous avons ensuite procédé à l'inoculation mixte de la souche mutante Ve 26 mob<sup>-</sup> et de la souche 2011.

### 3.2.2 - Inoculation mixte par le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup> et la souche de R. meliloti 2011

#### 3.2.2.1 - En proportions égales dans l'inoculum

Les résultats de cette inoculation sont rassemblés dans le tableau 15 ; ils montrent qu'il n'y a pas de différence significative de compétitivité entre les deux souches étudiées.

En effet, sur les 50 nodules testés, 18 sont occupés par le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup> et 21 pour la souche 2011.

D'autre part, on remarque qu'un nombre relativement important de nodules contient les deux souches. Cette inoculation a été pratiquée avec un inoculum où les deux souches étaient en proportions égales. A la lumière de ces résultats, nous avons procédé à des inoculations effectuées dans les mêmes conditions mais avec les deux souches en proportions inégales.

### 3.2.2.2 - En proportions inégales dans l'inoculum

Différents rapports de concentrations des souches dans l'inoculum ont été utilisés : 0/100, 10/90, 50/50, 90/10 et 100/0 de la souche mutante Ve 26 mob<sup>-</sup> sur la souche 2011.

Les résultats, regroupés dans la figure 7, montrent qu'il existe une relation proportionnelle entre le nombre de nodules formés par une souche et sa concentration initiale dans l'inoculum, aussi bien pour le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup> que pour la souche 2011.

Il est aussi intéressant de remarquer qu'on retrouve le maximum de nodules infectés par les deux souches Ve 26 mob<sup>-</sup> et 2011 dans le cas où elles sont également présentes dans l'inoculum.

Nous avons ensuite étudié le nombre et le poids frais des nodules formés ainsi que le poids sec des jeunes plantes de luzerne, ceci dans les mêmes conditions expérimentales de culture et de concentrations des deux souches dans l'inoculum.

L'ensemble de ces résultats est représenté dans les figures 8, 9 et 10.

On constate une similitude entre les trois courbes obtenues ; le nombre de nodules formés par plante, leurs poids et le poids sec des jeunes plantes de luzerne varient en fonction de la proportion des deux souches présentes dans

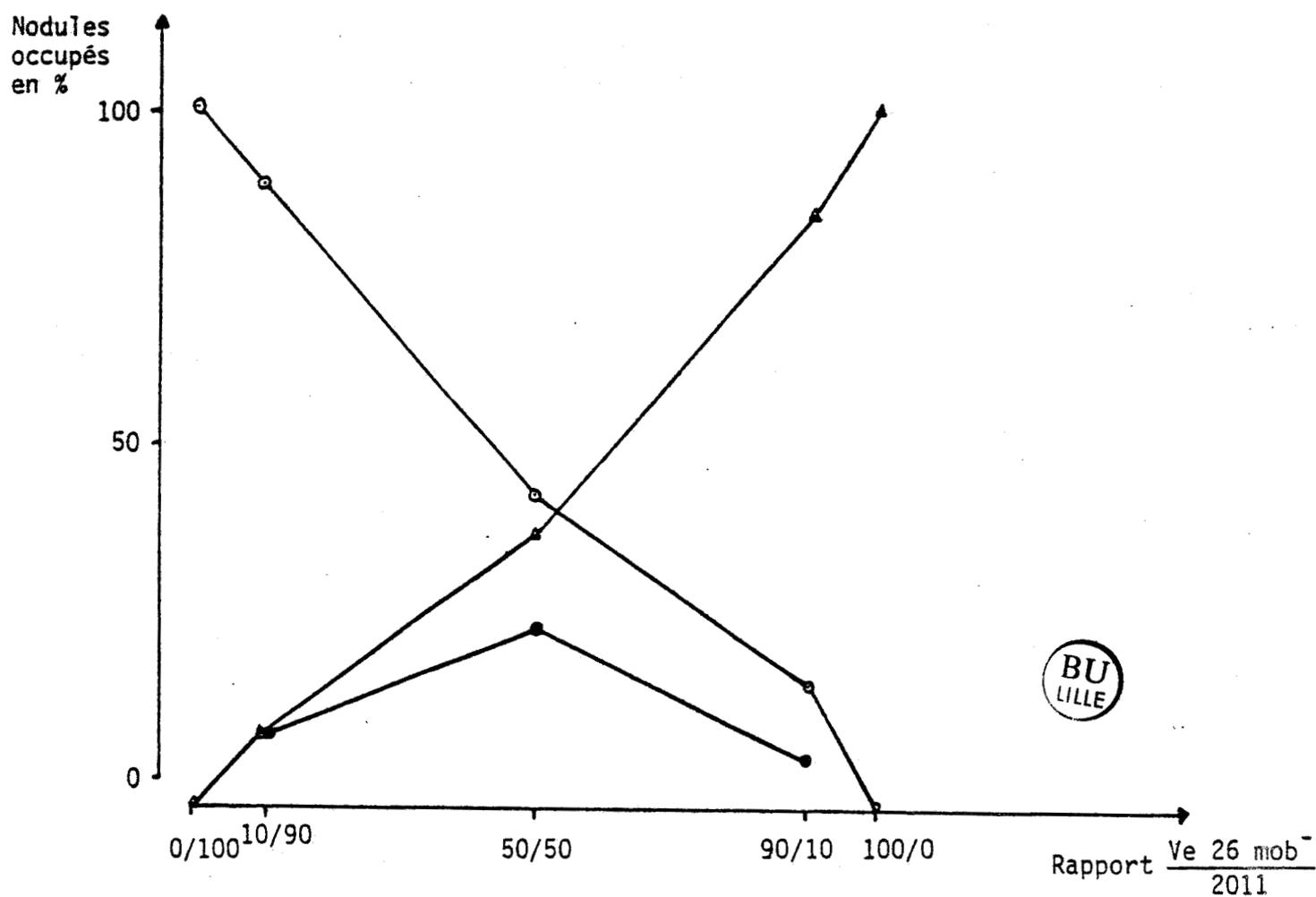


FIGURE 7 - Effet du rapport de concentration des souches de *R. meliloti*  $\frac{Ve\ 26\ mob^-}{2011}$  dans l'inoculum, sur le nombre de nodules occupés par ces deux souches.

Etude effectuée sur 50 nodules.

Légende : ○ : 2011  
 ▲ :  $Ve\ 26\ mob^-$ .  
 ● : 2011 et  $Ve\ 26\ mob^-$ .

Nombre moyen  
de nodules  
par plante

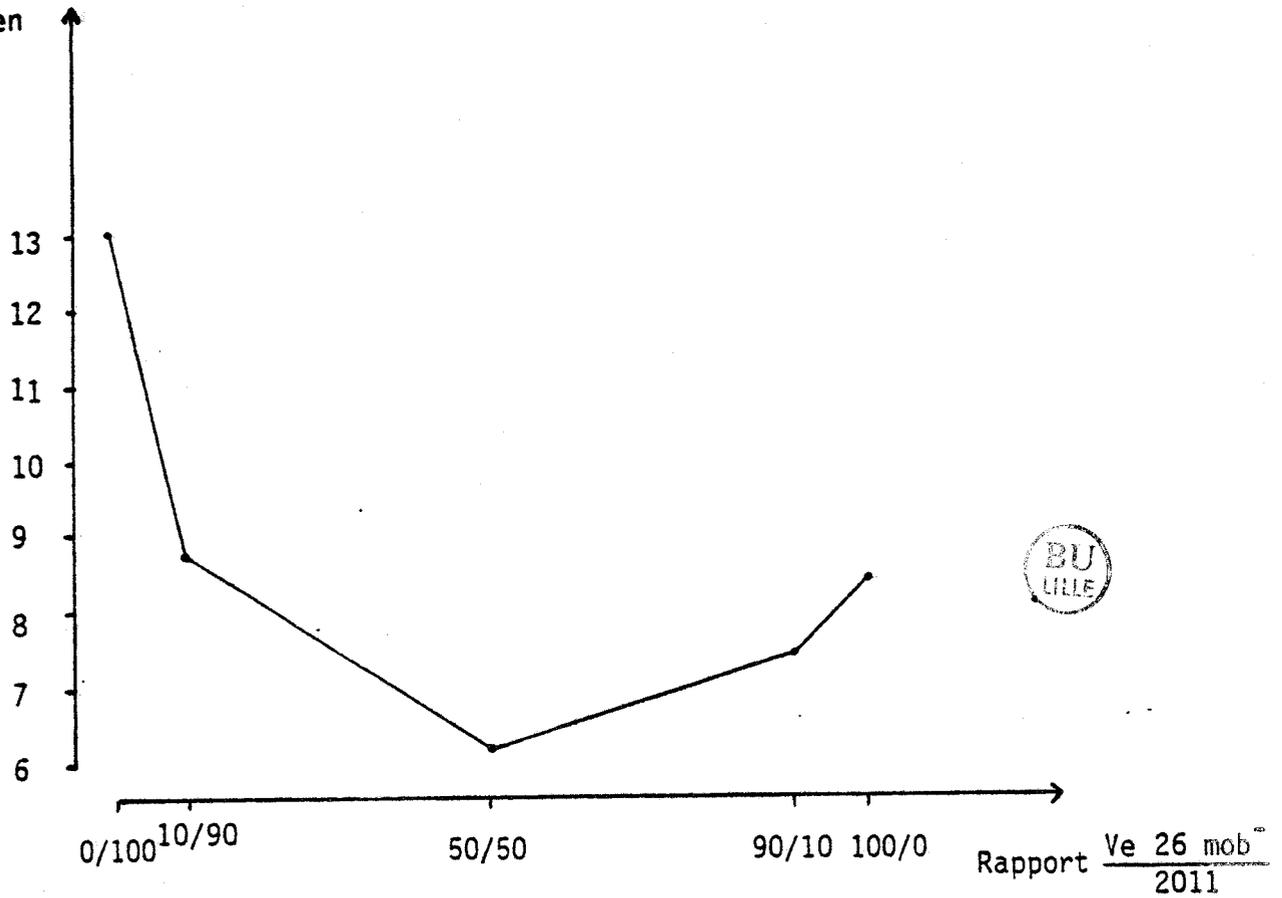


FIGURE 8 - Effet du rapport de concentration des souches de R. meliloti Ve 26 mob dans l'inoculum sur le nombre de nodules formés par plante de luzerne.  
2011  
Etude effectuée sur 10 plantules.



FIGURE 9 - Effet du rapport de concentration des souches de R. meliloti Ve 26 mob 2011 dans l'inoculum sur le poids frais moyen des nodules formés par les plantes de luzerne.  
Etude effectuée sur 10 nodules.

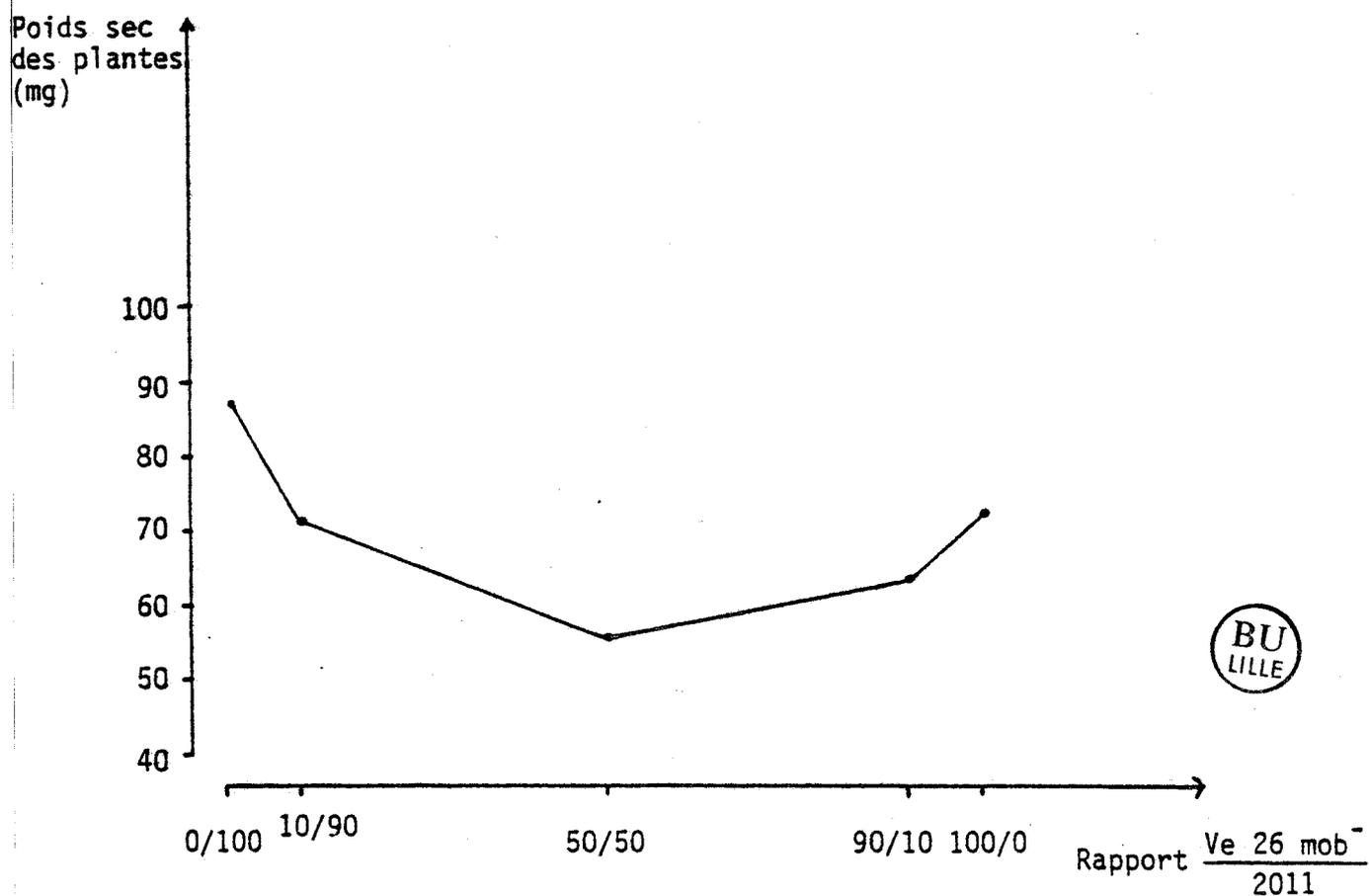


FIGURE 10 - Effet du rapport de concentration des souches de R. meliloti  $\frac{Ve\ 26\ mob^-}{2011}$  dans l'inoculum sur le poids sec des jeunes plantes de luzerne.

Etude effectuée sur 10 plantes.

l'inoculum. Le nombre de nodules, leurs poids ainsi que le poids des plantules les plus faibles sont obtenus quand les deux souches sont en proportions égales dans l'inoculum.

RICE et coll. (93b) obtiennent des résultats analogues avec deux autres souches de *R. meliloti* isolées au Canada, l'une à l'Est et l'autre à l'Ouest.

MAQBUL et al. (76b) signalent que la colonisation de la rhizosphère par des souches de *R. japonicum* dépend de l'effet antagoniste de certains microorganismes.

### 3.2.2.3 - Discussion et conclusion

L'ensemble de cette étude sur la compétitivité entre le mutant de *R. meliloti* Ve 26 mob<sup>-</sup> et la souche de *R. meliloti* 2011, laisse penser qu'un "effet d'antagonisme" se manifeste entre les deux souches.

En effet, les résultats les plus faibles sont obtenus quand les deux souches inoculées sont à concentration égale ; ils augmentent au fur et à mesure que la concentration de l'une ou de l'autre souche augmente dans l'inoculum. Par contre, quand la souche 2011 se trouve en présence de la souche mutante Ve 26 mob<sup>+</sup>, cet "effet d'antagonisme" est masqué par l'effet de la mobilité, principale différence existant entre les deux souches.

Le rôle de la mobilité dans les phénomènes de compétition et de nodulation entre souches bactériennes du genre *Rhizobium* vis-à-vis de jeunes plantes-hôtes est donc de toute première importance.

## CONCLUSION

Dans la première partie de notre travail, nous avons cherché à isoler des mutants affectés sur les caractères de mobilité et de chimiotactisme, à partir d'une souche de Rhizobium meliloti Ve 26 reconnue mobile et possédant une fonction chimiotactique (27). Trois types de mutants ont pu être isolés : un mutant non mobile :  $mob^-$ , un autre non chimiotactique :  $che^-$  et enfin un mutant hypermobile :  $mob^+$ . Nous n'avons pas réussi à isoler de phénotype hyperchimiotactique. A notre connaissance, aucun auteur n'a pu à ce jour mettre en évidence de tels mutants.

Nous nous sommes ensuite intéressés à étudier leurs propriétés symbiotiques en milieu liquide. La formation de nodules sur les racines de jeunes plantes de luzerne par les différents mutants isolés ainsi que leur efficience, sont équivalentes à celles de la souche parentale R. meliloti Ve 26. Ceci nous laisse penser qu'en milieu liquide la mobilité et le chimiotactisme ne seraient pas nécessaires dans ces processus. NAPOLI et coll. (82) d'une part, et AMES et coll. (7) d'autre part, obtiennent des résultats similaires respectivement sur R. trifolii et sur R. meliloti. Ces auteurs montrent également que les flagelles ne sont pas utilisés par les souches de Rhizobium pour leur attachement sur les points d'infection racinaires.

Par ailleurs, lorsque nous avons procédé à des inoculations mixtes en substrat solide en mini-serre, la mobilité et le chimiotactisme confèrent un avantage incontestable dans les processus d'infection et de nodulation lors des phénomènes de compétitivité entre souches de Rhizobium. En effet, un inoculum contenant 1 bactérie Ve 26  $mob^+$  pour 10 000 bactéries Ve 26  $mob^-$  ou Ve 26  $che^-$ , est très compétitif et permet d'infecter le plus de nodules. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par d'autres auteurs (70, 82, 84).

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons comparé la compétitivité de la souche de R. meliloti 2011, très peu mobile dans nos conditions habituelles d'expérimentation, et celle des mutants de R. meliloti Ve 26 mob<sup>+</sup> et Ve 26 mob<sup>-</sup>. Cette étude nous permet de penser qu'il y a un certain effet "d'antagonisme" pour l'infection entre la souche 2011 et le mutant Ve 26 mob<sup>-</sup>. Cet effet se trouve "masqué" quand la souche 2011 est inoculée en mélange avec le mutant Ve 26 mob<sup>+</sup>. Ceci nous démontre de façon claire le rôle important que peut jouer la mobilité dans les phénomènes de compétition entre souches bactériennes de Rhizobium.

Il est aussi intéressant de noter que la technique de reconnaissance des souches de Rhizobium par marquage aux antibiotiques s'avère assez bien appropriée pour ces travaux de compétitivité et ne provoque pas d'altération des propriétés symbiotiques des souches étudiées. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par certains auteurs (44, 90, 100).

L'ensemble de nos travaux montrent qu'il est intéressant d'utiliser des souches de Rhizobium très mobiles et dotées d'une fonction chimio-tactique pour les inoculations artificielles aux champs des Légumineuses. Ces deux propriétés doivent jouer un rôle important dans les phénomènes de compétition.

**BIBLIOGRAPHIE**

- 1 - ADLER J. (1966)  
Chemotaxis in Bacteria  
Science 153 ; 708 - 716
- 2 - ADLER J. and DAHL M.M. (1967)  
A method for measuring the motility of Bacteria and  
for comparing random and non random motility  
J. Gen. Microbiol. 46 ; 161 - 173
- 3 - ADLER J. (1969)  
Chemoreceptors in Bacteria  
Science 166 ; 1588 - 1597
- 4 - ADLER J., HAZELBAUER G.L. and DAHL M.M. (1973)  
Chemotaxis towards sugars in E. coli  
J. Bacteriol 115 ; 824 - 847
- 5 - ADLER J. (1977)  
Chemotaxis in Bacteria  
J. surpamol. Struct. 4 ; 305 - 317
- 6 - AMARGER N. (1974)  
Competition pour la formation de nodosités sur la  
fevéole entre souches de R. lequinosarum apportées par  
inoculation et souches indigènes  
C.R. Acad. Sci.(Paris) 279 (6) ; 527 - 530
- 7 - AMES P., S.A. SCHLUEDERBERG and BERGMAN K. (1979)  
Behavioral mutants of Rhizobium meliloti  
J. Bacteriol 141 ; 722 - 727
- 8 - AMES P. and BERGMAN K. (1981)  
Competitive advantage provided by bacterial motility  
in the formation of nodules by R. meliloti  
J. Bacteriol 148 (2) ; 728 - 729
- 9 - ARMSTRONG J.B., ADLER J. and DAHL M.M. (1967)  
Non chemotactic mutants of E. coli  
J. Bacteriol 93 ; 390 - 398

- 10 - ARMSTRONG J.B. (1972)  
An S- adenosylmethionine requirement for chemotaxis  
in E. coli  
Can. J. Microbiol. 18 ; 1695 - 1701
- 11 - ASWAD D.W. and KOSHLAND D.E. Jr. (1975)  
Evidence for an S. adenosylmethionine  
requirement in the chemotactic behaviour  
of S. typhimurium.  
J. Mol. Biol. 97 ; 207 - 223
- 12 - BERG H.C. and BROWN D.A. (1972)  
Chemotactic in E. coli analysed by three dimensional  
tracking  
Nature (London) 239 ; 500 - 504
- 13 - BERG H.C. and ANDERSON R.A. (1973)  
Bacteria swim by rotating their flagellar filaments  
Nature 245 ; 380 - 382
- 14 - BERG H.C. (1974)  
Dynamic properties of bacterial flagellar motors  
Nature (London) 249 ; 77 - 79
- 15 - BHAGWET A.A. and THOMAS J. (1982)  
Legume- Rhizobium interaction ; cowpea-root exudates  
elicit faster nodulation response by Rhizobia species  
App. J. environ Microbiol. 43 (3) ; 800 - 804
- 16 - BHUVANESWARI T.V., PUEPQUE S.G. and BAUER W.D. (1980)  
Localisation of infectible root cells.  
Plan. physiol. 66 ; 1027 - 1030
- 17 - BLONDEAU R. (1980)  
Fixation biologique de l'azote atmosphérique  
Thèmes Vuibert Université, sér. Biologie
- 18 - BOLHOOL B.B. and SCHMIDT E.L. (19874)  
Lectines : a possible basis for specificity in the  
Rhizobium - legume root-nodule symbiosis.  
Science Massachussets 185 ; 269 - 271
- 19 - BOON J.P. (1975)  
Theoretical models for bacterial motion and chemotaxis  
Adv. Chem. phys. 29 ; 169 - 173
- 20 - BOWLES D.J. (1982)  
L'enigme des lectines  
La recherche 134 ; 748 - 785

- 21 - BOYD A., A. KRIKOS and M. SIMON (1981)  
Sensory transducers of E. coli are encoded by homologous genes  
Cell. 26 ; 333 - 343
- 22 - BREWIN N.J., J.L. BERINGER and A.W.B. JOHNSTON (1980)  
Plasmide-mediated transfer of host range specificity between two strains of R. leguminosarum  
J. Gen. Microbiol. 120 ; 413 - 420
- 23 - BROCKWELL J, SCHWINGHAMER E.A. and GAULT R.R. (1976)  
Ecological studies of root nodule bacteria introduced into field environments critical examinations of the stability of antigenic and streptomycin-resistance markers for identification of strains of Rhizobium trifolii  
Soil. Biol. Biochem. 9 ; 19 - 24
- 24 - BROMFIELD E.S.P. and JONES D.G. (1979)  
The competitive ability and symbiotic effectiveness of doubly labelled antibiotic resistant mutants of R. trifolii  
Ann. Appl. Biol. 91 ; 211 - 219
- 25 - BROUGHTON W.J., VANEGERANT A.W.S.M. and LIE T.A. (1980)  
Dynamics of Rhizobium competition for nodulation of Pisum sativum c.v. Afghanistan  
Can. J. Microbiol. CAN 26 (4) ; 562 - 565
- 26 - BROUGHTON W.J., SAMREY V. and BOLHOOL B.B. (1981)  
Competition for nodulation of Pisum sativum c.v. Afghanistan requires live Rhizobia and a plant component  
Can. J. Microbiol. 28 (2) ; 162
- 27 - BURG D. (1980)  
Aspects du comportement chimiotactique chez R. meliloti  
Thèse de 3ème cycle U.S.T.L.
- 28 - CALDWELL B.E. and VEST G. (1968)  
Nodulation interaction between soybean genotypes and serogroups of R. japonicum  
Crop. Sci. 8 ; 680 - 682
- 29 - CHATEL D.L., GREENWOOD R.M. and PARKER C.A. (1968)  
Saprophytic competence as an important character in the selection of Rhizobium for inoculation  
9 th Int. Cong. Soil Sci. Trans. II ; 65 - 73

- 30 - CLOONAN M.J. and HUMPHREYD (1976)  
A new method of strain identification of R. trifolii  
in nodules  
J. Appl. Bacteriol 40 ; 101- 107
- 31 COLLINS A.L.T. and STOCKER B.A.D. (1976)  
Chemotaxis mutant of S. typhimurium  
J. Bacteriol 126 ; 754 - 759
- 32 a - CONN H.J., BOTTCHEE E.J. and RANDALL C. (1945)  
The value of bacteriophage in classifying certain soil  
bacteria  
J. Bacteriol. 49 ; ; 359 - 373
- 32 b - CURRIER W.W. and STROBEL C.A. (1976)  
Chemotaxis of Rhizobium spp. to plant root exudates  
Plant. physiol. 57 ; 820 - 823
- 33 - DANSO S.K.A. and ALEXANDER M. (1974)  
Survival of two strains of Rhizobium in soil  
Sol. Scien. Soc. of Ann. Proc. 38 (1) ; 86 - 89
- 34 - DATE R.A. and BROCKWELL (1978)  
Rhizobium strains competition and host interaction for  
nodulation  
Plant Relations in Pastures, Ed J.R. Wilson, Sciro,  
East Melbourne, Victoria
- 35 - DAZZO F.B. (1982)  
Bacterial attachment as related to cellular  
recognition in the Rhizobium-legume symbiosis  
J. Supramol. Struc. and Cell. Biochem. 16 ; 91 - 103
- 36 - DELISI C. (1983)  
A theory of measurement error and its implications for  
spatial and temporal gradient sensing during chemotaxis  
Cell. Biophysics 5 ; 237 - 253
- 37 - DENARIE T.G., TRUCHET G. and BERGERON B. (1976)  
Effects of some mutations on symbiotic properties of  
Rhizobium.  
Symbiotic nitrogen fixation in plants, Ed P.S. Nutman,  
Cambridge Univ. Press. Cambridge ; 47 - 62

- 38 - DEPAMPHILIS M.L. and ADLER J. (1971)  
Attachment of flagellar basal bodies to the cell  
enveloppe : specific attachment to the outer,  
lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane.  
J. Bactériol. 105 ; 396 - 407
- 39 - DIATLOFF A. and BROCKWELL J. (1976)  
Symbiotic properties of Rhizobium-japonicum  
competitive success in nodulation of two glycine max  
cultivars by effective and ineffective strains.  
Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb 16 ; 514 - 521
- 40 - DILWORTH J.M. (1966)  
Acetylene réduction by nitrogen - fixing preparations  
from Clostridium pasteurianum  
Biochim. Biophys. Acta. 127 ; 285 - 294
- 41 - DILWORTH J.M. and WILLIAMS D.C. (1967)  
Nucleic acid changes in bacteroids of Rhizobium lupini  
during nodule development  
J. Gen. Microbiol. 48 ; 31 - 36
- 42 - DUDMAN W.F. (1977)  
Serological methods and their application to dinitrogen  
fixing organisms  
A treatise on dinitrogen fixation IV Agronomy and  
Ecology, Ed. Hardy and Gibson ; 487 - 508
- 43 - EISENBACH M. and ADLER J. (1981)  
Bacterial cell envelopes with functional flagella  
J. Biol. chem. 256 ; 8807 - 8814
- 44 - EL-HALOUI N. (1983)  
Contribution à l'étude in vitro de la compétitivité  
chez R. meloliti  
D.E.A. U.S.T.L.
- 45 - ENGELMAN T.W. (1883)  
Prüfung des diathermanität einiger medien mittelst  
"Bacterium photometricum"  
Pflügers Archiv für gesammte physiologie ; 125 - 128

- 46 - ENGELMANN T.W. (1883)  
"Bacterium photometricum" Ein Beitrag Zurveirgleichenden  
Physiologie des Licht -und Farbensines  
Pflugers Archiv fur gesamnte physiologie ; 95 - 124
- 47 - FYSON A. and SPENT J.I. (1982)  
The development of primary root nodule on vicia faba  
L. growth to two 0° c  
Ann. Bot. 50 ; 681 - 684
- 48 - HADARSON G., HEICHEL G.H., VANCE C.P. and BASNES D.K. (1981)  
Evaluation of Alfalfa and R. meliloti for compatibility  
in nodulation and nodule effectiveness  
Crop. Science 21 ; 562 - 567
- 49 - HAZERBAUER G.L. and PARKINSON J.S. (1977)  
Bacterial chemotaxis in microbial interaction  
J. Reissig ed. (London : Chapman and Hall)
- 50 - HAZELBAUR G.L. and HARAYAMA S. (1979)  
Mutants in transmission of chemotactic signals from  
two independant receptors of E. coli  
Cell. 16 ; 617 - 625
- 51 - HEDBLUM M.L. and ADLER J. (1980)  
Genetic and biochemical properties of E. coli  
mutants with defects in serine chemotaxis  
J. Bacteriol. 144 ; 1048 - 1060
- 52 - HUNTER W.J. and FAHRING C.J. (1980)  
Movement by Rhizobium and nodulation of legumes  
Soil.Biol. Biochem. 12 ; 537 - 541
- 53 - JEFFREY E.S., AKIRA ISHIHARA and HOWARD C. (1985)  
Chemotactic signaling in filamentous cells of E. coli  
J. Bacteriol Janv. 1985 ; 51 - 59
- 54 - JOHNSTON A.W.B. and BERINGER J.E. (1975)  
Identification of the Rhizobium strains in pea  
root-nodules using genetic markers.  
J. Gen. Microbiol. 87 ; 343 - 350

- 55 -- JOHNSTON A.W.B. and BERINGER J.E. (1976)  
Mixed inoculations with effective and ineffective  
strains of R. leguminosarum  
J. appl. Bact. 40 ; 375 - 380
- 56 - JOHNSTON A.W.B., J.L. BEYNON, A.V. BUCHANAN-WOLLASTON,  
S.M. SETCHELL, P.R. HIRSCH and J.E. BERINGER (1978)  
High frequency transfer of Nodulating ability  
between strains and species of Rhizobium  
Nature 1978 276 ; 634 - 636
- 57 - JUN ICHI SCHIOI, R.J. GALLOWAY, N. MITSURU, R.E. CHINNOCK  
and B.L. TAYLOR (1982)  
Requirement of A.T.P. in bacterial chemotaxis.  
J. of Biological Chemistry 257 (14) ; 7969 - 7975
- 58 - KATO G., NARUYANA Y., MARUYAMA M. (1980)  
Role of bacterial polysaccharides in the absorption  
process of the Rhizobium Pea symbiosis  
Agric. Biol. Chem. 44 (12) ; 2843 - 2855
- 59 - KHAN S., MACNAB R.M., DEFRANCO A.L. and  
KOSHLAND J.R. (1978)  
Inversion of behavioral response in bacterial  
chemotaxis : explanation at the molecular level  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 ; 4150 - 4154
- 60 - KHAN S. and MACNAB R. (1980)  
The steady-state counter clockwise/clockwise, ratio  
of bacterial flagellar. Motor is regulated by  
protonmotive force  
J. Mol. Biol. 138 ; 563 - 597
- 61 - KHAN S. and MACNAB R. (1980)  
Proton chemical potential, Proton electrical  
potential and bacterial motility  
J. Mol. Biol. 138 ; 599 - 614
- 62 - KOIWAI O. and HAYASHI (1979)  
Interaction of maltose receptor with a membrane  
bound chemosensing component.  
J. Biochem. TOKYO 86 ; 27 - 34

- 63 - KOMEDA Y., SILVERMAN M., MATSUMARA P. and SIMON M. (1978)  
Genes for the hook basal body proteins of the flagellar apparatus in E. coli  
J. Bacteriol. 134 ; 655 - 667
- 64 - KONDOH H., BALL C.B. and ADLER J. (1979)  
Identification of a methyl accepting chemotaxis protein of the ribose and galactose chemoreceptors of E. coli  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76 ; 260 - 264
- 65 - KORT G.N., GOY M.F., LARSEN S.H. and ADLER J. (1975)  
Methylation of a membrane protein involved in bacterial chemotaxis  
PNAS 72 ; 3939 - 3943
- 66 - KOSHLAND D.E. Jr. (1981)  
Biochemistry of sensing and adaptation in a simple bacterial system  
Ann. Rev. Biochem. 50 ; 765 - 782
- 67 - LAGACHERIE B., HUGST R. et AMARGER N. (1978)  
Sélection de souches de R. japonicum d'après leur compétitivité pour l'infection  
Ann. Agron. Fr. 28 (4) ; 379 - 389
- 68 - LARSEN S.H., READER R.W., KOST E.M., TSO W.W. and ADLER J. (1974)  
Change in direction of flagellar rotation in the basis of the chemotactic response in E. coli  
Nature 249 ; 74 - 77
- 69 - LARSEN S.H., ADLER J., GARGUS J.J. and HOGG R.W. (1974)  
Chemomechanical coupling without ATP : the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria  
P.N.A.S. 71 ; 1239 - 1243
- 70 - LAYACHI A. (1983)  
Etude de la mobilité et du chimiotactisme dans la compétitivité chez R. meliloti  
Thèse de 3ème cycle U.S.T.L.

- 71 - LEVIN R.A. and MONTGOMERY M.P. (1974)  
Symbiotic effectiveness of antibiotic resistant  
Mutants of R. japonicum  
Plant. Soil. 41 ; 669 - 676
- 72 - LINDEMANN W.C., HAM L.E. and SCHMIDT E.L. (1974)  
The presence of two strains of R. japonicum in a  
simple soybean nodule  
Abstr. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol. 4 ; 74 - 77
- 73 - MACNAB R. and KOSHLAND D.E. Jr. (1972)  
The gradient sensing mechanism in bacterial chemotaxis  
P.N.S.A. 69 ; 2509 - 2512
- 74 - MACNAB R.M. (1977)  
Bacterial flagella rotating in bundles : a study  
in helical geometry  
Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 ; 221 - 225
- 75 - MACNAB R.M. and ORNSTON M.K. (1977)  
Normal-to-curly flagellar transitions and their  
role in bacterial tumbling. Stabilisation of an  
alternative quaternary structure by mechanical force.  
J. Mol. Biol. 112 ; 1 - 30
- 76 - MAIER R.J. and BRILL W.J. (1978)  
Involvement of R. japonicum antigen in soybean  
nodulation  
J. Bactériol. 133 (7) ; 1295 - 1299
- 77 - MANSON M.D., P. TEDESCO, M.C. BERG, F.M. HAROLD and  
C. VANDERDRIFT (1977)  
A protonmotive force drives bacterial flagella  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S;A. 74 ; 3060 - 3064
- 78 - MANSON M.D., P. TEDESCO and H.C. BERG (1980)  
Energetics of flagellar rotation in bacteria  
J. Mol. Biol. 138 ; 541 - 561
- 79 - MATERON L A. and HAGEDORN C. (1982)  
Competitiveness of R. trifolii strains. Association  
with red clover (trifolium pratense L.) in Missipi soils.  
Appli. Environ. Microbiol. 44 (5) ; 1096 - 1099

- 80 - MEGIAS M., CAVIEDES M.A., PALOMARES A.J. and RUIZ-BERRAGUERO F. (1982)  
Mutagenesis in Rhizobium trifolii  
Microbios 35 ; 39 - 48
- 81 - MESIBOV R. and ADLER J. (1972)  
Chemotaxis toward amino acids in E. coli  
J. Bacteriol. 112 ; 315 - 326
- 82 - NAPOLI C. and ALBERSHEIM P. (1980)  
Infection and nodulation of clover by nonmotile R. trifolii  
J. Bacteriol. 141 (2) ; 979 - 980
- 83 - NICOL L.H. and THORNTON H.B. (1941)  
Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host.  
Proc. Roy. Soc. B. 130 ; 32 - 59
- 84 - OCHIN D., R. TAILLIEZ et J.B. GUILLAUME (1985)  
Etude experimentale de la symbiose entre la luzerne et Rhizobium meliloti. Mise au point d'une mini-serre  
Plant and soil 84 ; 29 - 35
- 85 - OLIVARES, CASADESUS J. and BEDMAR E.J. (1980)  
Method for testing degree of infectivity of Rhizobium meliloti strains  
Appl. Envir. Microbio. 39 ; 967 - 971
- 86 - ØRDAL W.G. (1977)  
Calcium ion regulates chemotactic behaviour in bacteria  
Nature 270 ; 66 - 67
- 87 - PAIN A.N. (1979)  
Symbiotic properties of Antibiotic-resistant and auxotrophic mutants of R. leguminosarum  
J. Appl. Bacteriol. 47 ; 53 - 64
- 88 - PARKER C.A., TRINICK M.J. and CHATEL D.L. (1977)  
Rhizobia as soil and rhizosphere inhabitants  
A treatise on dinitrogen fixation.  
IV Agronomy and ecology Ed. Hardy and Gibson ; 311 - 352

- 89 - PARKINSON J.S. (1976)  
Che A, che B and che C genes of E. coli and their  
role in chemotaxis  
J. Bacteriol. 126 ; 758 - 770
- 90 - PETITJEAN F. (1982)  
Etude in vitro de la compétitivité de souches  
de Rhizobium meliloti  
D.E.A., U.S.T.L..
- 91 - PFEFFER W. (1883)  
Locomotorische Richtungsbewegungen  
durch chemische  
REIZE "Berichte der Deutschen Botanischen gesellschaft  
1 - 524 - 533
- 92 a - PINTO C.U., YAO P.V. and VINCENT J.M. (1974)  
Nodulating competitiveness amongst strains of  
Rhizobium meliloti and Rhizobium trifolii  
AUST. J. Agric. Research 25 ; 317 - 329
- 92 b - PUEPPKE S.G. (1984)  
Adsorption of slow-and Fast Growing Rhizobia  
to soybean and cowpea roots  
Plant Physiol. 75 ; 924 - 928
- 93 a - REINER A.M. (1977)  
Xylitol and D. arabitol toxicities due to derepressed  
fructose, galactitol and sorbitol phosphotransferase  
of E. coli  
J. Bacteriol. 132 ; 166 - 173
- 93 b - RICE W.A., OLSEN P.E. and PAGE W.J. (1984)  
ELISA evaluation of the competitive abilities of  
two Rhizobium meliloti strains  
Can. J. Microbiol. 30 (9) ; 1187 - 1190
- 94 - ROBINSON A.C. (1969)  
Competition between effective and ineffective strains  
of R. trifolii in the nodulation of Trifolium subterraneum  
Aust. J. Agric. Res. 20 ; 827 - 841

- 95 - ROTHER W. (1901)  
Beobachtungen und Betrachtungen über tactische  
reizerscheinungen  
"Flora" 88 ; 391 - 421
- 96 - ROVIRA A.D. (1976)  
Diffusion of carbone compound away form wheat roots  
Aust. J. Biol. Sci. 22 ; 1287 - 1290
- 97 - RUIZ A.T., CABRERA E. and SANTAMARIA J. (1977)  
Competitividad entre cepas de R. japonicum  
Ann. Inst. Naccion. Invest. Agr. Ser. gen. 5 ; 11 - 21
- 98 - RUIZ A.T., CABRERA E. and SANTAMARIA J. (1977)  
Influencia de la variedad de soja en la competitividad  
y efectividad de cepas de R. japonicum  
Ann. Inst. Naccion. Invest. Agr. Ser. gen. 5 ; 23 - 30
- 99 - SCHERRER A. and DENARIE J. (1971)  
Symbiotic properties of some anoxotrophic mutants of  
R. meliloti and their prototrophic revertants  
Plant. Soil. Special volume ; 39 - 45
- 100 - SCHWINGHAMER E.A. (1967)  
Effectiveness of Rhizobium as modified by mutation for  
resistance to antibiotics  
Antonie Van leewenhoek 33 ; 121 -136
- 101 - SCHWINGHAMER E.A. (1969)  
Mutation to anoxotrophy a prototrophy as related to  
symbiotic effectiveness in R. leguminosarum and  
R. trifolii  
Can. J. Microbiol 15 ; 611 - 616
- 102 - SCHWINGHAMER E.A. and DUDMAN W.F. (1973)  
Evaluation of spectinomycin resistance as a marker  
for ecological studies with Rhizobium spp.  
J. Appl. Bacterio. 36 ; 263 - 272

- 103 - SCHWINGHAMER E.A. (1977)  
Genetic aspect of nodulation and dinitrogen  
fixation by legumes the microsymbionts  
A treatise on dinitrogen fixation  
III Biologie - Ed Hardy and Gibson ; 577 - 622
- 104 - SHIOI J. IMAE Y. and OOSAWA F. (1978)  
Protonmotive force and motility of Bacillus subtilis  
J. Bacteriol. 133 ; 1083 - 1088
- 105 - SILVERMAN M. and SIMON M. (1972)  
Flagellar assembly mutants in E. coli  
J. Bacteriol. 112 ; 986 - 993
- 106 - SILVERMAN M. and SIMON M. (1974)  
Flagellar rotation and the mechanism of bacterial  
motility  
Nature 249 ; 73 - 74
- 107 - SILVERMAN M., MATSUMURA and SIMON M. (1976)  
The identification of the mot gene product with  
E. coli - lambda hybrids  
P.N.A.S. 73 ; 3126 - 3130
- 108 - SILVERMAN S. and SIMON M. (1977)  
Chemotaxis in E. coli : Methylation of che gene  
products  
P.N.A.S. 74 ; 3317 - 3321
- 109 - SKRDLETA V. (1973)  
Competition between inoculum strains of R. japonicum  
the process of soybean nodulation during 3 planting  
periods.  
Folia Microbiol. 18 ; 341 - 347
- 110 - SNYDER M.A., STOCK J.B. and KOSHLAND D.E.Jr. (1981)  
Role of membrane potential and calcium in chemotaxis  
sensing by bacteria  
J. Mol. Biol. 149 ; 241 - 257
- 111 - SPRINGER M.S., GOY M.F. and ADLER J. (1977)  
Sensory transduction in E. coli : two complementary  
Pathways of information processing that involve methylated proteins  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 ; 3312 - 3316

- 112 - SPRINGER M.S., GAY M.F. and ADLER J. (1979)  
Protein methylation in behavioural control mechanisms  
and in signal transduction  
Nature (London) 280 ; 279 - 283
- 113 - SPRINGER W.R. and D.E. KOSHLAND Jr. (1977)  
Identification of a protein methyltransferase as the  
che R gene product in the bacterial sensing system  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 ; 533 - 537
- 114 - STANG N, MACNAB R.M. and KOSHLAND D.E. Jr. (1973)  
Common mechanism for repellents and attractants in  
bacterial chemotaxis  
Science 181 (4094) ; 60 - 66
- 115 - STANIEWSKI R. (1970)  
Typing of Rhizobium by phages  
Can. J. Microbiol. 16 ; 1003 - 1009
- 116 - STOCK J.B. and KOSHLAND D.E. Jr. (1978)  
A protein methylesterase involved in bacterial  
sensing  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 ; 3659 - 3663
- 117 - STRANGE P.G. and KOSHLAND D.E. Jr. (1976)  
Receptor interactions in a signalling sensing :  
competition between ribose receptor and galactose  
receptor in the chemotaxis response  
P.N.A.S. 73 ; 762 - 766
- 118 - TRUCHET G., ROSENBERG C., VASSE J., J.S. JULLIOT,  
CAMUT S. and DENARIE J. (1984)  
Transfert of R. meliloti pSym genes into Agrobacterium  
tumefaciens : host-specific nodulation by atypical  
infection  
J. Bacteriol. 151 (1) ; 134 - 142
- 119 - TSO W.W. and ADLER J. (1974)  
Negative chemotaxis in E. coli  
J. Bacteriol. 118 ; 560- 576

- 120 - VINCENT J.M. and WATERS L.M. (1953)  
The influence of the host on competition amongst  
clover root-nodule bacteria  
J. Gen. Microbiol. 9 ; 357 - 370
- 121 - VIDOR C., BROSSE E. and PEREIRA J.S. (1979)  
Competition for the site of infection between  
strains of R. japonicum in soybean cultivars  
(glycine max)  
Agron. subriograndense 15 ; 227 - 238
- 122 - VANRENSBURG J.M. and STRIJIDAN B.W. (1982)  
Competitive abilities of R. meliloti strains  
considered to have potential as inoculants  
Appl. Environ. Microbiol. 44 (1) ; 98 - 106
- 123 - WANG E.A. and KOSHLAND J.E. Jr. (1980)  
Receptor structure in the bacterial sensing system  
P.N.A.S. 77 ; 7157 - 7161
- 124 - WANG E.A., MOWRY K.L., CLEGG D.O. and KOSHLAND D.E. Jr. (1982)  
Tandem duplication and multiple functions of a  
receptor gene in bacterial chemotaxis  
J. Biol. Chem. 257 ; 4673 - 4676

-:-:-:-:-

RESUME

**Résumé.** - Dans la première partie du travail, l'influence de la mobilité et du chimiotactisme sur la compétitivité est étudiée après isolement de mutants affectés sur ces caractères et préparés à partir de la souche de **Rhizobium meliloti** Ve26. Trois types de mutants ont été isolés : un mutant non mobile ( $mob^-$ ), un mutant non chimiotactique ( $che^-$ ) et un mutant hypermobile ( $mob^+$ ). Toutes les souches étudiées ont été rendues résistantes à des antibiotiques différents afin de pouvoir les identifier dans les tests biologiques. De tels marquages n'ont pas provoqué d'altération de leurs propriétés symbiotiques.

En milieu liquide, les mutants ne présentent pas de différence de leur infectivité et de leur efficacité par rapport au type sauvage parental.

En substrat solide (essais en mini-serre expérimentale), la mobilité et le chimiotactisme confèrent un avantage compétitif incontestable lors d'inoculations mixtes de souches de **R. meliloti**.

La seconde partie du travail concerne l'étude de la compétitivité d'une autre souche de **R. meliloti** (2011) avec les mutants de la souche Ve26 ( $mob^+$  et  $mob^-$ ). Un effet antagoniste pour la nodulation entre la souche 2011 et le mutant Ve26  $mob^-$  est mis en évidence ; l'importance de la mobilité est de toute première importance puisque cet effet est "masqué" quand la souche 2011 est inoculée avec le mutant Ve26  $mob^+$ .

**Mots-clés :** Mobilité, Chimiotactisme, Compétitivité, Antagoniste, Mini-serre, Rhizobium meliloti.