

50376
1985
173

50376
1985
173

N° d'ordre :1273

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spécialité : Biochimie

Option : Microbiologie

par

Corinne LEPREVOST



ETUDE DE LA MODIFICATION DES CARACTERES DE RHIZOBIUM MELILOTI APRES TRANSFORMATION GENETIQUE

Soutenue le 26 juin 1985 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

MM.

J.

GUILLAUME

Président

J.C.

DERIEUX

Rapporteur

J.

KREMBEL

Examineur

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille. sous la direction de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME.

Je lui exprime toute ma gratitude pour son accueil et ses conseils qui m'ont permis de découvrir le monde de la recherche.

Je remercie également Monsieur le Professeur J.C. DERIEUX d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse.

Toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur J.KREMBEL pour l'honneur qu'il me fait de juger ce travail.

Je remercie également Madame J. COURTOIS d'avoir orienté mes travaux et permis de participer à son sujet de recherche.

Toute ma sympathie à l'ensemble des membres du Laboratoire et particulièrement à Monsieur M. BECHET pour ses conseils techniques qui m'ont été très précieux.

Enfin j'adresse tous mes remerciements à tous ceux que j'omets de mentionner mais que je n'oublie pas.

TABLE DES MATIERES

	<u>PAGES</u>
AVANT PROPOS	1
 GENERALITES	
I - INTRODUCTION	4
II - LES ETAPES DE LA SYMBIOSE RHIZOBIUM LEGUMINEUSE .	5
2.1. Infectivité et spécificité d'hôte	5
2.1.1. Reconnaissance et attachement des Rhizobia aux poils racinaires	5
2.1.1.1. Rôle de la plante hôte au niveau de la reconnaissance	6
2.1.1.2. Rôle de microsymbionte dans la reconnaissance	9
2.1.2. Infection et nodulation	11
2.2. Etat bactéroïde et efficacité	13
2.2.1. Le bactéroïde	13
2.2.2. L'efficacité	14
III - ETUDE DU GENOME DE RHIZOBIUM	16
3.1. Le génome de Rhizobium	16
3.1.1. le chromosome	16
3.1.2. Les éléments extrachromosomiques	16
3.1.3. Le génome de la forme endosymbiotique	18
3.2. Etude et manipulation du génome chez Rhizobium..	19
3.2.1. L'isolement des mutants	19
3.2.2. La transduction	20
3.2.3. La conjugaison et le clonage chez Rhizobium	21
3.2.4. La transformation chez Rhizobium	23

IV - LA TRANSFORMATION	24
4.1. Historique et applications	24
4.2. Conditions de transformation	25
4.2.1. L'ADN transformant	25
4.2.2. La cellule réceptrice	26
4.2.2.1. La compétence	27
4.2.2.2. Le facteur d'accrochage de l'ADN	27
4.2.2.3. Le transport de l'ADN	29
4.2.3. Les milieux de transformation	31
4.2.3.1. Milieu de compétence	32
4.2.3.2. Milieu de transfert	32
4.2.4. Les étapes de la transformation	33
4.2.4.1. L'association ADN-bactérie.....	33
4.2.4.2. Pénétration de l'ADN	34
4.2.4.3. Recombinaison ADN donneur- receveur	35

MATERIEL ET METHODES

I - LES SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES	37
1.1. Les souches de Rhizobium	37
1.1.1. Rhizobium meliloti	37
1.2. Les souches d'Escherichia coli	37
II - MILIEUX DE CULTURE	38
2.1. Milieu Rhizobium complet RC	38
2.2. Milieu Rhizobium minimum R	38
2.3. Milieu de compétence	39
2.4. Milieu sans phosphate (M-P)	39
2.5. Milieu TY	39

2.6. Milieu de luria	39
2.7. Milieu de Nicol et Thorton	40
2.8. Milieu au bleu d'aniline	40
III - TAMPON DE NON PROLIFERATION (TNP)	40
IV - PREPARATION D'ADN TOTAL	41
4.1. Extraction et purification	41
4.2. Estimation de la quantité d'ADN obtenue	41
4.3. Purification de l'ADN	41
4.4. Conservation de l'ADN	41
V - TECHNIQUE DE TRANSFORMATION	42
5.1. Traitement des cellules	42
5.2. Transformation	42
5.3. Numérations et calcul de fréquence	43
VI - ETUDE DES PROPRIETES INFECTIVES	44
VII - TYPAGE PHAGIQUE	44
VIII - LYSE EN ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE	45
8.1. Lyse cellulaire	45
8.2. Migration électrophorétique	46
8.3. Visualisation des bandes plasmidiques	46
IX - PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE	46
9.1. Lyse et extraction	46
9.2. Purification de l'ADN plasmidique en gradient de CsCl/BrEt	47
9.2.1. Principe	47
9.2.2. Protocole expérimental	48

X.- ELECTROPHORESE HORIZONTALE EN GEL D'AGAROSE.....	
10.1. Principe	48
10.2. Protocole	49
XI - LES ENZYMES DE RESTRICTION	50
11.1. Principe	50
11.2. Protocole	50
XII - MARQUAGE D'ADN IN VITRO.....	53
12.1. Marquage	53
12.2. Comptage	53
12.3. Séparation de l'ADN marqué des bases nucléoti- diques	54
XIII - TRANSFERT ET HYBRIDATION D'ADN	54
13.1. Transfert	54
13.2. Pré-hybridation	56
13.3. Hybridation	56
XIV - HYBRIDATION SUR COLONIES	57
14.1. Préparation de la membrane	58
14.2. Hybridation et révélation	58

RESULTATS

I - TRANSFORMATION	60
1.1. Transformation et fréquences.....	60
1.2. Sélection des clones transformés	62
1.3. Etude physiologique des clones transformés	65
1.3.1. Etude morphologique	65
1.3.2. Etude du caractère muqueux	66

1.3.3. Infectivité	66
1.3.4. Typage phagique	69
II - MODIFICATIONS GENETIQUES SURVENUES LORS DE LA TRANSFORMATION	69
2.1. Etude du contenu plasmidique	69
2.2. Etude comparative des profils de restriction	71
2.3. Recherche d'homologie entre les petits plasmides des clones transformés et les plasmides de la souche d'origine	75
2.3.1. Recherche d'homologie avec le plasmide moyen	77
2.3.2. Recherche d'homologie entre les petits plasmides et l'ADN de la souche d'origine	82
2.4. Hybridation sur colonies	86
2.4.1. Recherche du plasmide moyen chez les clones transformés	86
2.4.2. Recherche de l'origine des petits plas- mides	88
III - ETUDE DES CLONES ISOLES DE NODULES RACINAIRES DE PLANTULES DE LUZERNE INFECTEES PAR DES CELLULES TRANSFORMEES	88
3.1. Etude morphologique	92
3.2. Etude de leur contenu plasmidique	92
3.3. Typage phagique	92
3.4. Recherche d'homologie entre les plasmides réacquis après nodulation et les plasmides de la souche initiale	96
3.5. Effet d'exudats racinaires sur les clones transformés	96

DISCUSSION - CONCLUSION

I - MODIFICATIONS PHENOTYPIQUES DES CLONES TRANSFORMES	99
II - MODIFICATIONS GENETIQUES DES CLONES TRANSFORMES	101
2.1. Contenu plasmidique	101
2.2. Etude des réarrangements génomiques après transformation	104
2.2.1. Origine des petits plasmides	104
2.2.2. Devenir des plasmides endogènes	106
III - EFFET DE LA PLANTE SUR LES CLONES TRANSFORMES	107

BIBLIOGRAPHIE

109

GLOSSAIRE

CLONE :

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

CRYPTIQUE :

Sans marqueur génétique déterminé.

INCOMPTABILITE :

Deux plasmides sont appelés incompatibles s'ils ne peuvent coexister de manière stable dans une même bactérie.

KLEBSIELLA PNEUMONIAE :

Espèce bactérienne fixatrice libre d'azote pour laquelle les gènes Nif ont été clonés.

ABREVIATIONS UTILISEES

EDTA	: acide éthylène diamine tétra-acétique
N.T.G.	: N - Méthyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine
P E G	: Polyéthylène Glycol
S.D.S.	: Sodium Dodecyl Sulfate
Tris	: Tris hydroxy-méthyl-aminométhane
DTT	: dithiothreitol

g	: gramme
μ g	: microgramme (10^{-6} g)
mg	: milligramme
μ l	: microlitre (10^{-6} litre)
ml	: millilitre (10^{-3} litre)
nm	: nanomètre (10^{-9} mètre)
M	: Molaire
mM	: millimolaire (10^{-3} M)
N	: normal
°C	: degré celsius
V	: volt
UV	: ultra violet
D.O.	: Densité optique
dpm	: désintégrations par minute
rpm	: rotations par minute
qsp	: quantité suffisante pour ..
PM	: poids moléculaire

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
pSym	: plasmide symbiotique
pRme	: plasmide de R.meliloti
Dalton	: masse de l'atome d'hydrogène = unité de masse moléculaire (Dal)
Md	: mégadalton = 10^6 dalton
::	: insertion

AVANT-PROPOS

UNE REVOLUTION : LE GENIE GENETIQUE

Depuis le début de ce siècle où GRIFFITH en 1928 a mis en évidence la transformation génétique d'un pneumocoque avirulent en pneumocoque virulent et où AVERY en 1944 a pu établir la véritable nature de l'ADN en tant que support des caractères héréditaires, la biologie moléculaire a avancé à grands pas et le vingtième siècle restera marqué par l'oeuvre des généticiens qui sont parvenus à s'immiscer dans les commandes de la vie.

Hier, le génie génétique était considéré comme technique de Science-fiction; aujourd'hui il s'apprête à faire partie de la vie quotidienne. Le gène est en effet actuellement une véritable entité chimique.

L'originalité de cette technique réside dans le passage "in vitro" de l'information génétique où elle peut être manipulée avant d'être réintroduite dans une cellule.

La découverte d'enzymes spécifiques appelées enzymes de restriction, véritables "bistouris chimiques" coupant l'ADN en des sites bien précis a permis par l'utilisation du clonage, l'isolement des gènes et leur transfert d'une cellule à une autre.

Deux axes essentiels permettent actuellement les applications de la génétique : un axe fondamental et un axe appliqué.

Au niveau fondamental, cela permet l'étude des structures et du fonctionnement des gènes. Actuellement, les recherches se portent essentiellement sur des systèmes procaryotes (les bactéries) ou eucaryotes inférieures (les levures) et l'étude des bactéries principalement offre un modèle pour comprendre ce qui se passe chez les êtres supérieurs.

Sur le plan appliqué, il sera alors possible d'isoler, d'amplifier et de faire s'exprimer un gène responsable d'une molécule déterminée.

L'intérêt technologique du génie génétique pourrait trouver sa place dans divers secteurs industriels, tels la pharmacie, la chimie, l'énergie et la bioconversion des déchets, l'agro-alimentaire.

C'est l'industrie pharmaceutique qui a sû actuellement le plus en tirer profit.

De nombreuses molécules à action thérapeutique ont pu être fabriquées au moyen du génie génétique.

C'est ainsi qu'en 1982, de l'insuline humaine, entièrement produit par des bactéries "recombinées" a été commercialisée aux États-Unis, puis a fait son apparition en France en mars 1984.

Actuellement, les efforts se concentrent pour essayer de commercialiser certains produits, tels les hormones de croissance, l'interféron, certains vaccins, la somastostatine.

Le secteur énergétique pourrait lui aussi, en bénéficier par la fermentation alcoolique et méthanique à partir de micro-organismes et ainsi que la valorisation des déchets (ex : transformation des déchets agricoles en méthane).

Un nouveau secteur semble être touché par cette révolution scientifique. Il s'agit du domaine agricole et agro-alimentaire.

Des bactéries recombinées du genre *Pseudomonas* vont pouvoir prochainement aux U.S.A. permettre la prévention de la formation du gel sur les plans de pommes de terre.

Dans ce domaine, un nouvel axe de recherche a pris une très grande importance en biotechnologie. Cela concerne la fixation biologique de l'azote atmosphérique par certaines plantes.

Cette propriété possédée notamment par les bactéries du genre *Rhizobium* en symbiose avec les légumineuses offre un intérêt agronomique considérable.

L'investigation du génome de cette bactérie a donc pour but de connaître et maîtriser toutes les étapes intervenant au cours de cette symbiose et d'en trouver des applications plus grandes. Cela aurait pour but de supprimer ou réduire la consommation d'engrais azoté et de lutter contre la faim dans le monde.

L'une des techniques de transferts génétiques qui offre un grand intérêt dans cette étude est la transformation, transfert d'ADN isolé "in vitro" d'une bactérie donneuse vers une bactérie réceptrice. C'est cette technologie qui a particulièrement retenu notre attention.

GENERALITES

I -- INTRODUCTION

Les bactéries du genre *Rhizobium* en association symbiotique avec les légumineuses représentent la majorité des bactéries fixatrices d'azote.

Ce sont des bactéries du sol gram négatif, capables d'induire la formation de nodosités sur les racines des plantes et de permettre la fixation de l'azote atmosphérique au niveau de ces nodules.

Les deux partenaires rentrent en contact par un phénomène de reconnaissance qui détermine la spécificité d'hôte, mis en évidence depuis très longtemps. En effet, chaque *Rhizobium* ne peut infecter et entraîner la formation de nodules que chez les légumineuses du groupe lui correspondant et la constitution de groupes d'inoculation croisée pour les légumineuses a conduit à la définition des espèces de *Rhizobium* correspondantes. C'est ainsi par exemple que :

R. meliloti reconnaît la luzerne
R. trifolii reconnaît le trèfle
R. phaseoli reconnaît la haricot
R. leguminosarum reconnaît le pois
R. japonicum reconnaît le soja
R. lupini reconnaît le lupin

et les *Rhizobium* de groupe *vigna* reconnaissent de nombreuses légumineuses tropicales ainsi que les *Rhizobium* du groupe *Cowpea*.

Des études taxonomiques ont permis de séparer ce genre bactérien en deux groupes selon leur taux de croissance.

les souches à croissance rapide (*R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. leguminosarum* et les souches à croissance lente (*R. japonicum*, *R. lupini*, *R. du groupe cowpea*...).

Ces notions de classification posent de plus en plus de difficultés car tout d'abord, on a mis en évidence des souches capables d'infecter de nombreuses espèces de légumineuses hôtes (SHANTHARAM et WONG, 1982) et de plus la séparation entre les deux groupes à croissance lente et rapide a été mise en cause par la découverte de *R. japonicum* à croissance rapide isolé en Chine (HATTORI et JOHNSON, 1984).

Il a été proposé récemment au cours du quatrième symposium international sur la fixation d'azote, de regrouper les espèces à croissance lente sous un genre nouveau : *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1982).

Tout cela rejoint la thèse de BONNIER (1958) de la non spécificité entre les bactéries et les légumineuses ainsi que celle de SHARIFI (1984) sur l'origine parasitique de cette association devenue symbiotique par adaptation au cours de l'évolution.

II - LES ETAPES DE LA SYMBIOSE RHIZOBIUM LEGUMINEUSE.

La symbiose est un processus composé de nombreuses étapes, chacune d'elle ayant pu être mise en évidence par l'inoculation de différents mutants symbiotiques.

VINCENT en 1980 a proposé un modèle où figurent douze étapes dans l'établissement de la symbiose reportées dans le tableau

suivant :

ETAPES	DESCRIPTION	ABBREVIATIONS	
I	Colonisation de la racine	Multiplication du Rhizobia près des racines de la légumineuse	Roc (Root colonization)
II	Adhésion à la racine	Attachement bactérien à la cellule de la plante	Roa (Root adhesion)
III	Présence d'acide nucléique bactérien	ADN bactérien à l'intérieur des cellules du cortex	Nap (Nucleic acid presence)
IV	Branchement des poils	Branchement des poils racinaires	Hab (Hair branching)
V	Courbure des poils	Courbures des poils racinaires	Hac (Hair curling)
VI	Infection	Formation du cordon infectieux	Inf (Infection)
VII	Initiation du nodule	Développement du méristème de la plante	Noi (Nodule initiation)
VIII	Libération des bactéries	Libération intracellulaire des bactéries du cordon infectieux	Bar (Bacterial release)
IX	Développement du bactéroïde	Développement de la forme bactéroïde entière	Bad (Bacteroid development)
X	Fixation de l'azote	Réduction de N_2 en NH_4^+	Fix (Fixation)
XI	Fonctions complémentaires	Fonctions biochimiques et physiologiques complémentaires	(Cof) (Complementary functions)
XII	Persistence des fonctions du nodule	Persistence des fonctions du nodule	Npf (Nodule persistence functions)

TABLEAU I : DESCRIPTION DES DIFFERENTES ETAPES DE LA SYMBOSE RHIZOBIUM - LEGUMINEUSE, SELON VINCENT (1980).

2.1. INFECTIVITE ET SPECIFICITE D'HOTE.

2.1.1. Reconnaissance et attachement des Rhizobia aux poils radiculaires.

Le processus d'infection commence par le développement des Rhizobia dans la Rhizosphère. Après que la bactérie ait migré vers la légumineuse homologue, elle s'accroche aux poils radiculaires et cela constitue l'étape précoce de la préinfection.

Cet attachement des cellules bactériennes aux cellules hôtes semblent être l'une des premières étapes nécessaires à l'interaction conduisant à l'infection et à la nodulation.

Les Rhizobia semblent pouvoir s'attacher à la surface des racines hôtes en quelques secondes voir quelques minutes après l'inoculation (DAZZO et HUBBELL, 1975) et cela de façon polaire aux poils radiculaires (MEIJER et BROUGHTON, 1982).

HALVERSON et STACEY (1984) ont montré que l'infection du soja est limitée à une zone bien précise. Ce serait la zone de préémergence des poils radiculaires au moment de l'inoculation. Cette zone infectible se situerait entre la zone de développement des poils radiculaires (SERH) et l'extrémité de la racine (RT) selon le schéma suivant :

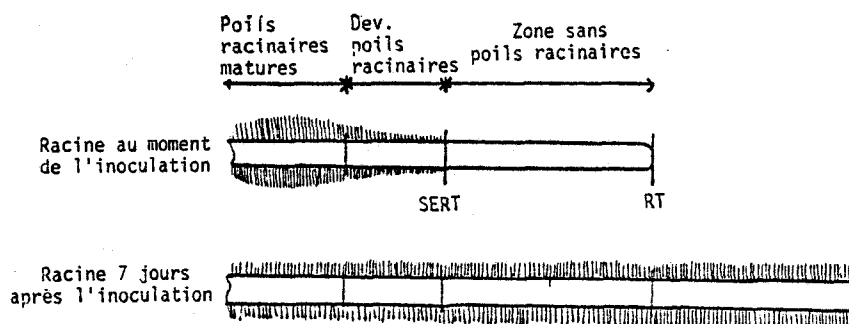


FIGURE 1 - SCHEMA DE LA ZONE INFECTIBLE DE R. JAPONICUM, SELON HALVERSON ET STACEY (1984).

Les cellules radiculaires deviennent donc progressivement moins susceptibles de noduler au fur et à mesure que la racine pousse et que les poils deviennent mûres.

La première réponse observée chez l'hôte après l'inoculation correspond à la courbure et au branchement des poils radiculaires.

Des filtrats stériles de cultures bactériennes peuvent conduire à ce phénomène (SOLHEIM et ROA 1973 ; YAO et VINCENT, 1976), bien qu'il ne soit pas aussi complet qu'avec les cellules de *Rhizobium* vivantes. La substance responsable n'a pas encore été isolée.

Les mécanismes d'attachement, de reconnaissance et d'invasion sont affectés par le changement biochimique des surfaces cellulaires des deux partenaires.

Peu de choses sont connues sur la nature et le fonctionnement des mécanismes de reconnaissance mais l'hypothèse la plus admise est que des glycoprotéines de surface des légumineuses appelées lectines pourraient déterminer la spécificité d'hôte en accrochant des structures hydrocarbonées sur les surfaces du symbionte *Rhizobium*.

2.1.1.1. Rôle de la plante-hôte au niveau de la reconnaissance .

Les lectines serviraient donc de déterminants pour la reconnaissance ou la spécificité d'hôte (BAUER, 1981). Certaines évidences expérimentales suggèrent que les plus vraisemblables déterminants de reconnaissance seraient les lectines de la plante-hôte et la surface polysaccharidique de *Rhizobium*.

Ce sont BOHLOOL et SCHMIDT (1974) qui ont mis en évidence pour la première fois par fluorescence la forte corrélation entre les lectines de graines de soja et les surfaces des *Rhizobium* symbiontes.

Deux systèmes ont été alors plus particulièrement étudiés, celui de la symbiose *R. trifolii* - trèfle et celui de la symbiose *R. japonicum* - soja.

Selon DAZZO (1981), l'attachement initial consisterait en un contact entre la capsule fibrillaire de *R. trifolii* et les agrégats globulaires de la surface extérieure du poil radicaire du trèfle. Par des études immunochimiques et génétiques, il a été démontré que les surfaces de *R. trifolii* et des cellules épidermales du trèfle contiennent un antigène unique qui donnerait immunochimiquement une réaction croisée ce qui suggérerait la relation étroite de structure entre les deux symbiontes.

Cet antigène contiendrait des récepteurs qui accrochent de façon non covalente une lectine multivalente, la trifoliine - A.

De plus, un haptène spécifique inhibiteur de la trifoliine-A, le 2 déoxyglucose a été mis en évidence (DAZZO et HUBBELL, 1975). Cet haptène inhiberait spécifiquement l'attachement de *R. trifolii* aux poils radiculaires du trèfle.

C'est ainsi que ces auteurs ont proposé un modèle simple de lectine multivalente existant à la surface de la plante qui agirait comme "pont" entre les déterminants antigéniques des surfaces de *R. trifolii* et des cellules hôtes, modèle modifié par la suite (DAZZO et TRUCHET, 1983) :

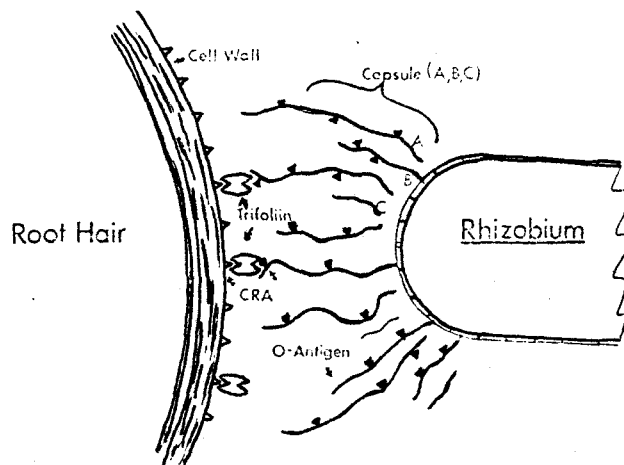


Fig : 2 : SCHEMA DE RECONNAISSANCE DES RECEPTORS DE *R. TRIFOLII* AUX POILS RADICULAIRES DU TREFLE PAR LA TRIFOLIINE-A (DAZZO et HUBBELL, 1975) modifié par DAZZO et TRUCHET (1983).

La trifoliine A a de plus été détectée dans des exudats racinaires de trèfle par immunofluorescence, ce qui pourrait rendre

possible le processus de reconnaissance avant l'attachement du microsymbionte à sa plante-hôte (DAZZO et HRABAK, 1981) et DAZZO et al (1982) ont mis en évidence l'accumulation de cette lectine aux extrémités des poils radiculaires, qui entraînerait une adhésion des poils entre eux par leurs extrémités, ce qui confirmerait le modèle proposé de "pont".

BHUWANESWARI et al (1977) se sont intéressés plus particulièrement à la reconnaissance *R. japonicum* - soja. Ils semblent être en accord avec l'hypothèse de BOHLOOL ET SCHMIDT (1974), en démontrant que la lectine de graines de soja s'accroche spécifiquement et avec une haute affinité à de nombreuses souches de *R. japonicum*

L'accrochage de cette lectine serait inhibé par un haptène, le D galactose ou la N acetyl D - galactosamine. Ils ont de plus, obtenu des courbes d'accrochage souvent biphasiques indiquant que les sites spécifiques d'accrochage de la lectine sembleraient être transitoires plutôt que constitutifs à la surface cellulaire de *R. japonicum*.

LAW et STIJDOM (1984) ont obtenu avec la symbiose entre la légumineuse *Lotononis bainesii* et le *Rhizobium* correspondant des résultats en accord avec cette hypothèse de reconnaissance par la lectine de BOHLOOL et SCHMIDT (1974) et ont observé de même des variations dans l'accrochage de la lectine selon les conditions de culture du *Rhizobium*.

Selon GRAHAM (1981), cette hypothèse du rôle des lectines dans la reconnaissance *Rhizobium* - légumineuse semble attractive car elle représente la première hypothèse claire montrant une base moléculaire de la reconnaissance.

De nombreux auteurs semblent rejoindre cette hypothèse (BAUER, 1981; BHUWANESWARI et al, 1977; LAW et STRIJDOM, 1984).

Selon SOLHEIN (1983), il est évident que les lectines sont impliquées dans l'accrochage de la bactérie à la surface de sa plante-hôte, mais cet accrochage ne serait pas spécifique et ne serait pas impliqué dans les processus d'infection, cependant, les lectines pourraient avoir un rôle dans d'autres étapes du processus infectieux.

L'évidence manque selon PUEPPKE (1983) pour prouver le rôle spécifique et indispensable de la lectine. De plus, HANDELSMAN et al (1984) ont montré que la lectine de luzerne appelée agglutinine ne jouerait aucun rôle spécifique car des souches de *R. meliloti* altérées dans leur interaction avec l'agglutinine étaient plus compétitives.

Cette hypothèse reste donc énigmatique et contradictoire selon BHUWANESWARI et al (1978). la reconnaissance serait un effet cumulatif d'une série de signaux et de réponses à l'interaction (BAUER, 1981).

Comme le cite lui-même DAZZO (1981) : "on ne doit pas supposer que l'accomplissement d'un attachement solide doit

être la clé de l'étape de reconnaissance mais plutôt que c'est l'une des clés qui est nécessaire pour ouvrir les nombreuses portes bloquant le chemin vers le succès de l'infection".

2.1.1.2. Rôle du microsymbionte dans la reconnaissance

La surface du *Rhizobium* comme toute bactérie gram (-) comprend une membrane, une paroi et du matériel extracellulaire composé de lipopolysaccharides (LPS), de polysaccharides exocellulaires (EPS) et de polysaccharides capsulaires (CPS).

Toutes ces molécules pourraient jouer un rôle dans l'attachement spécifique de la bactérie symbionte à la légumineuse hôte. Beaucoup de rapports à ce sujet sont controversés afin de savoir si les récepteurs de la lectine sur le *Rhizobium* se situent au niveau des CPS, EPS, LPS, ou bien même des glycannes de la paroi.

C'est ainsi que de nombreux auteurs s'attachent plutôt au rôle des CPS et EPS dans cet attachement aux lectines.

Certains ont émis cette hypothèse par l'obtention de mutants Nod⁻ où la composition en EPS était très diminuée ou altérée (SANDERS et al, 1978, 1981; CAVIEDES et al, 1982; LAW et al, 1982).

D'autres auteurs se sont contentés d'observer des modifications importantes dans la composition en EPS des *Rhizobium* selon l'âge de la culture (CADMUS et al, 1982), ce qui entraînerait des conséquences sur la fréquence de nodulation de la plante-hôte. Ces changements selon l'âge de la culture seraient à corrélés avec le changement dans l'accrochage des lectines de soja sur *R.japonicum* (BHUVANESWAR et al, 1983), ce qui expliquerait l'obtention de courbes d'accrochage biphasiques (BHUVANESWARI et al, 1977).

La distribution des récepteurs de la lectine dépendrait donc de l'âge de la culture et cela serait liée à l'orientation de l'attachement de la bactérie aux poils racinaires.

Selon SCHERWOOD et al (1984), la capsule serait une structure dynamique et la capacité d'encapsulation de *R.trifolii* serait liée à l'interaction avec les lectines de soja selon l'âge de la culture.

MORT et BAUER (1980, 1982) ont observé des changements de composition en EPS - CPS selon l'âge de la culture chez *R.japonicum* et cela serait à relier avec les propriétés transitoires d'accrochage des lectines selon la phase de croissance du microsymbionte. Cela serait donc en faveur du rôle des CPS dans la reconnaissance.

De plus, de nombreux travaux se sont portés sur l'effet des exudats racinaires de plante sur leur microsymbionte correspondant.

BHUWANESWARI et BAUER (1978) ont observé l'importance de l'environnement de la plante-hôte sur la culture de *R. japonicum*, qui est un facteur très important pour le développement des récepteurs spécifiques de la lectine à la surface de cette bactérie.

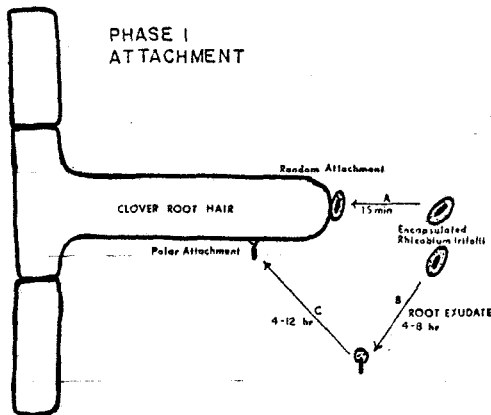
Ces résultats suggèrent que *R. japonicum* possède tout le potentiel génétique pour développer des récepteurs spécifiques pour la lectine et que ce potentiel s'exprime selon les conditions environnementales de culture à proximité des racines de la plante-hôte.

De même, BHAGWAT et THOMAS (1983) ont observé que la présence d'exudats racinaires de plante *cowpea* stimule la synthèse des polysaccharides et développe les récepteurs biochimiques spécifiques de la lectine.

DAZZO et al (1982) ont observé l'effet d'exudats racinaires de trèfle sur *R. trifolii*. Une désorganisation de la capsule a été mise en évidence. Elle commencerait au centre équatorial et progresserait vers les pôles. Les substances qui induiraient ces modifications seraient des enzymes qui altéreraient la capsule et permettraient un attachement polaire de *R. trifolii* aux poils radiculaires du trèfle, mis en évidence par immunofluorescence.

Il existerait un "turn-over" de la surface bactérienne où les enzymes des exudats joueraient un rôle majeur.

C'est ainsi qu'un modèle dynamique décrivant l'attachement de *R. trifolii* aux poils radiculaires du trèfle a été proposé par DAZZO et TRUCHET (1983). :



- 1) Quelques minutes après l'inoculation, la bactérie encapsulée s'attacherait aux extrémités des poils où la trifoliine A s'accumule en grande quantité
- 2) Après 4 à 8 H, la capsule serait altérée par les enzymes hôtes puis en équilibre avec la synthèse de novo de polysaccharides bactériens, des fibrilles à prédominance polaire s'accrocheraient à la trifoliine A

Fig 3 : SCHEMA DE L'ATTACHEMENT DE *R. TRIFOLII* AUX POILS RADICULAIRES DU TREFLE (DAZZO et TRUCHET, 1983).

De plus, l'observation en microscopie électronique de telles fibrilles polaires avait déjà été décrite chez *R.meliloti* (MUTAFTSCHIEV et al, 1982).

YAO et VINCENT (1976) avaient observé la déformation de poils radiculaires par un facteur extrait des cellules de *R.trifolii* mais ce facteur n'a pu être caractérisé. Les EPS ne semblent pas avoir d'effet mais aucun support ne permet de penser aux LPS.

Ainsi de nombreux auteurs se sont penchés sur le rôle des EPS et CPS dans le processus d'attachement mais récemment certains auteurs semblent être plus en faveur du rôle des LPS dans ce processus, bien que ceux-ci soient encore très mal étudiés à cause de leur complexité et de leur hétérogénéité.

Le rôle des LPS dans la symbiose est mal connu mais cette analyse est en progrès, il serait cependant utile de posséder des mutants affectés dans leur composition en LPS (CARLSON, 1984) pour connaître leur rôle dans cette symbiose.

Cependant, HRABAK et al (1981) ont trouvé une relation entre l'attachement des lectines de trèfle et un déterminant unique des LPS de *R.trifolii*. Les LPS subiraient selon eux de profonds changements immuno-chimiques au cours de la croissance. Les déterminants antigéniques seraient alors transitoirement exposés à la surface bactériennes à certaines phases de la croissance.

KAMBERGER (1979) a impliqué de même, les LPS comme site d'attachement des lectines de luzerne pour *R.meliloti* et de pois pour *R.leguminosarum*.

Le présence de récepteurs multiples pour la lectine pour les cellules de *Rhizobia* nous amène à vouloir connaître quel rôle différent ont-ils dans le processus d'infection.

Selon KAMBERGER (1979) le modèle proposé par DAZZO et HUBBELL (1975) doit être modifié. Selon lui, les polysaccharides capsulaires pourraient être responsables de l'attachement d'un grand nombre de cellules *Rhizobiales* sur les poils radiculaires par le système "pont-lectine" et cela constituerait un évènement précoce dans la reconnaissance qui serait suivi par des évènements secondaires de reconnaissance nécessitant l'accrochage spécifique de la lectine de l'hôte située sur les poils radiculaires, aux LPS, ce qui entrainerait l'étape suivante d'invasion.

Ainsi, beaucoup de choses restent encore obscures pour décrire ce processus de reconnaissance qui semble plus complexe que ne l'avaient émis DAZZO et HUBBELL (1975).

2.1.2. Infection et nodulation.

Après la reconnaissance et l'attachement du *Rhizobia* aux poils radiculaires, étape précoce dans le processus d'infection, la courbure des poils racinaires est alors observée, première réponse de l'hôte après l'inoculation, bien que cette étape ne semble pas essentielle pour l'infection.

Après cette phase de préinfection, la bactérie devient enclose dans une sorte de poche dans la paroi cellulaire du poil par invagination de celle-ci, généralement côté concave de la courbure.

C'est alors qu'un cordon infectieux se développe à partir de cet endroit et croît vers l'intérieur de la cellule.

La pénétration du poil radiculaire a donc lieu par dégradation de la paroi de la cellule-hôte à ce point d'entrée suivie de la formation de ce cordon infectieux, qui se poursuit vers la racine. A ce point, les cellules corticales de la racine se différencient, se divisent et forment un méristème qui s'étend et conduit à la croissance extérieure à la surface racinaire d'un nodule.

A l'intérieur de ce nodule, les bactéries sont relâchées du cordon infectieux dans le cytoplasme des cellules-hôtes. Tout ce processus est très bien décrit par WILSON et al (1983) et schématisé par MEIJER et BROUGHTON (1982).

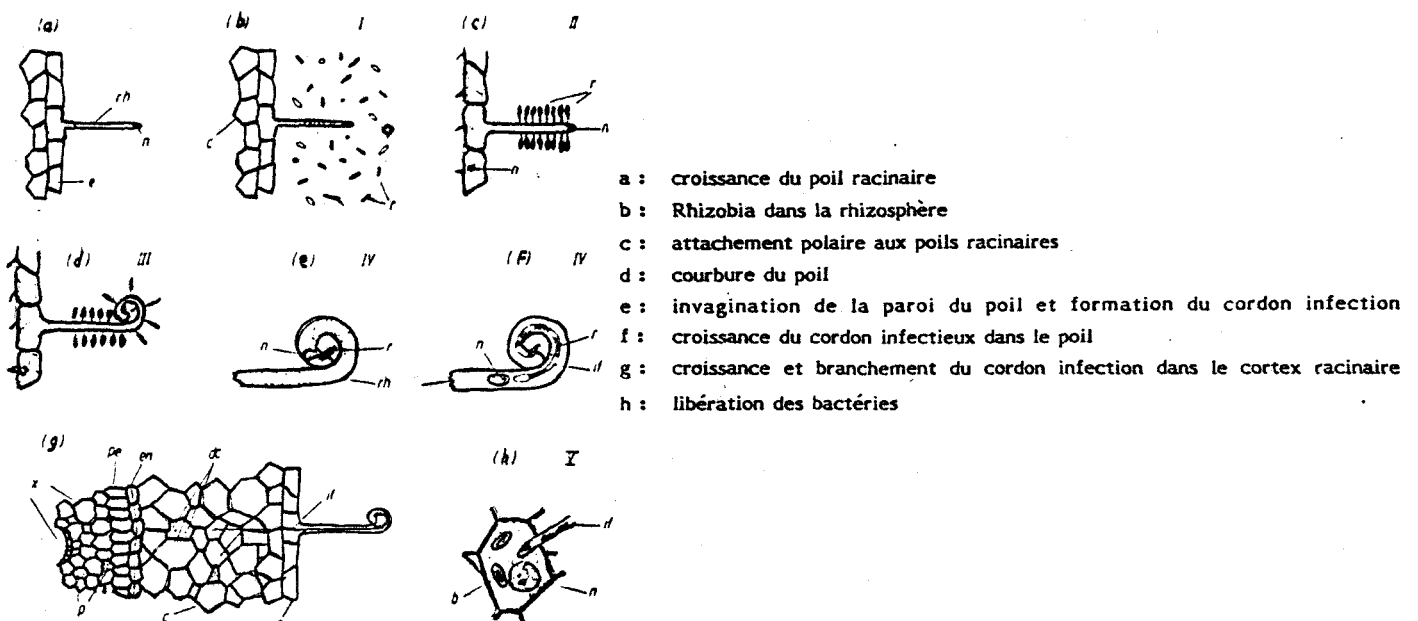


Fig 4 : DIFFERENTES ETAPES DE L'INFECTION (MEIJER et BROUGHTON, 1982).

Après leur libération, les bactéries se divisent activement. Chaque bactérie est alors entourée d'une membrane de séquestration ou membrane pér bactéroïde.

Les bactéries à croissance rapide cesse alors de se diviser et subissent des déformations morphologiques importantes et une augmentation de volume, tandis que les bactéries à croissance lente conserve leur forme de batonnet et peuvent se diviser à l'intérieur des membranes de séquestration conduisant à de petits sacs contenant plusieurs bactéries (pour revue cf DENARIE et TRUCHET (1979)). C'est à ce moment que les bactéries se font appeler bactéroïdes.

2.2. L'ETAT BACTEROIDE ET EFFICIENCE

2.2.1. Le bactéroïde

Le terme de bactéroïde a été tout d'abord introduit par BRUNCHORST en 1885 comme étant une variété de structures et de formes enflées du *Rhizobium* en culture ou présent dans les nodules des légumineuses.

C'est BERGERSEN (1974) qui a suggéré que ce terme était réservé aux formes symbiotiques présentes dans les nodules racinaires sans tenir compte de leur forme et taille. C'est ainsi qu'on nomme actuellement bactéroïde toute cellule de *Rhizobium* présente à l'intérieur des cellules du tissu central des nodules (SUTTON et al, 1981).

En effet, le nodule peut être divisé en quatre zones (WILSON et al, 1983) :

- Une zone distale méristématique
- Une zone symbiotique précoce ou zone d'invasion du cordon infectieux
- Une zone symbiotique tardive contenant les bactéroïdes matures et fixateurs d'azote
- Une zone proximale ou zone senescente.

Les bactéries ainsi déformées, incapables de se diviser deviennent de vrais organes fixateurs d'azote de la plante (VERMA et LONG, 1983).

Au cours de cette transformation en bactéroïde, la bactérie se voit totalement modifiée. On observe tout d'abord une inhibition de la synthèse de la paroi, ce qui entraînerait une perte de rigidité et une grande sensibilité osmotique (SHARIFI, 1984). Cela serait une adaptation de la bactérie à la haute osmolarité du cytoplasme hôte (SUTTON et al, 1977) et pourrait expliquer les problèmes de viabilité de ces cellules qui nécessitent pour leur isolement un milieu de culture apportant des protections osmotiques, décrit d'ailleurs par GRESSHOFF et ROLFE (1978), par addition de mannitol et de sorbitol (milieu PDB). Il obtient de cette façon une complète viabilité.

D'autres modifications ont lieu au sein de cette cellule, telles des altérations du nucléoïde, une augmentation des grains de β polyhydroxybutyrate (PDB), de glycogène et de polyphosphate.

La composition de la membrane plasmique est aussi modifiée par des changements de composition en phospholipides, en acides gras et les membranes semblent plus fluides (MILLER et TREMBLAY, 1983)

Les bactéroïdes sont comme nous l'avons décrit précédemment enclos dans une membrane de séquestration appelée pér bactéroïde. L'origine de cette membrane reste encore mal connue et plusieurs hypothèses ont été soulevées à ce sujet :

- Les cellules Rhizobiales seraient encloses par une membrane plasmique de la cellule hôte par endocytose au moment de leur libération.
- Cette membrane serait dérivée des endomembranes hôtes tels que le reticulum endoplasmique ou l'enveloppe nucléaire.
- Elle serait produite par synthèse de "novo".

De fortes évidences à présent favorisent la première hypothèse grâce à la comparaison entre les deux membranes (densité, sensibilité aux détergents anioniques, composition peptidique).

Tout au cours du développement du nodule, des protéines spécifiques sont synthétisées à la fois par l'hôte et par la bactérie et le contact étroit entre les deux partenaires est véritablement bien concrétisé au cours de la synthèse de la leghémoglobine. En effet, cette protéine qui permet le maintien de la tension en oxygène au niveau du nodule aurait sa partie protéique, la globine synthétisée par la plante-hôte, alors que l'hème serait apportée par la bactérie. Il semblerait qu'il y ait une relation obligatoire entre la présence de la leghémoglobine et la capacité de fixer l'azote.

Cependant, des formes "pseudobactéroïdes" ont pu être obtenues en culture libre dans une variété de milieux dont la haute teneur en thiamine, alcaloïdes ou acides aminés semble importante (SUTTON et al, 1981; KANESHIRO et al, 1983). Les cellules sont plus grandes, déformées et contiennent de nombreux grains de PHB, cependant la structure de la paroi est inchangée.

2.2.2. L'efficience.

Les bactéroïdes présents dans le nodule sont le site primaire de la fixation d'azote. Cela a pu être détecté en suivant la fixation d'azote marqué.

Le produit issu de la fixation d'azote est l'ion ammonium NH_4^+ et cette réaction est catalysée par un complexe enzymatique, la nitrogénase. Cette enzyme serait formée de deux protéines facilement séparables (HAAKER et VEEGER, 1984), une protéine tétramérique ($\alpha_2 \beta_2$) de PM 220 000 appelée M_oF_e protéine (contenant du molybdène et du fer) et une protéine dimérique (γ_2) de PM 64 000 appelée F_e protéine (contenant du fer).

L'ion ammonium ainsi produit est alors assimilé selon deux voies possibles fonction de l'organisme et de la concentration en NH_4^+ .

Ainsi la glutamine et le glutamate sont des acides aminés primaires synthétisés au cours de la fixation d'azote et sont ensuite convertis en autres acides aminés par transamination, qui seront alors disponibles pour la croissance de la plante :

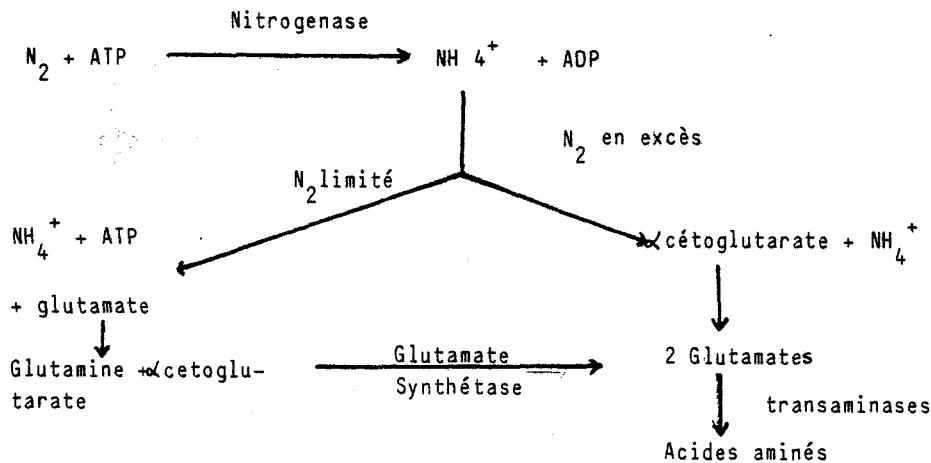


Fig 5 : FIXATION DE L'AZOTE ET ASSIMILATION DE NH_4^+
(SHARIFI, 1984)

Beaucoup d'auteurs pensent que NH_4^+ serait emporté dans le cytosol de la plante et que son assimilation ne serait pas effectuée par les enzymes bactériens (KONDOROSI et al, 1977), d'ailleurs la glutamine synthétase et la glutamate déshydrogénase présentent chez le bactéroïde une plus faible activité que chez la cellule libre (O'GARA et SHANMUGAM, 1976; SUTTON et al, 1981).

La nitrogénase nécessite de plus, beaucoup d'énergie, sous forme d'ATP et de réductants (ANDERSEN et al, 1980).

L'activité de cette enzyme peut être déterminée expérimentalement par la méthode de KEISTER (1975) qui utilise la réduction d'acétylène en éthylène, réaction caractéristique de la nitrogénase. On observe par cette méthode une augmentation de plus de 1000 fois de son activité en 3 à 4 jours pendant la phase de maturation du nodule. Cette augmentation serait due à une synthèse de "novo".

On a longtemps considéré que cette activité était le privilège du bactéroïde, mais depuis 1975, il a pu être mis en évidence des souches lentes de *Rhizobium* pouvant synthétiser la nitrogénase en culture libre (KEISTER, 1975; TJEPKEMA et EVANS, 1975; KANESHIRO et al, 1983). Les conditions expérimentales ont alors été déterminées pour obtenir cette activité. La faible teneur en oxygène semble être la condition essentielle (TJEPKEMA et EVANS, 1975; KEISTER, 1975; AGARWAL et KEISTER, 1983) ainsi que la culture en milieu favorisant le pleiomorphisme, contenant du glutamate, du mannitol et du gluconate (KANESHIRO et al, 1983).

Ainsi ce concept de la nécessité de la plante a-t-il été mis en cause, bien que la dépression de la synthèse de la nitrogénase semble être un processus complexe régulé par des facteurs inconnus et beaucoup de souches ne peuvent être déréprimées (AGARWAL et KEISTER, 1983).

Il existe dans la nature des bactéries qui fixent normalement l'azote atmosphérique en culture libre, dont une enterobactérie *Klebsiella pneumoniae*, très utile pour élucider le mécanisme de ce processus.

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse semble donc être une relation très complexe entre les deux partenaires qui doivent avoir chacun un rôle particulier.

L'analyse génétique de quelques légumineuses a permis de mettre en évidence le rôle des gènes de la plante dans la symbiose, leur nombre et leur répartition. Cependant ces travaux restent très laborieux et trop rares (NUTMAN, 1969).

Quand à la bactérie, elle nécessite la possession de fonctions physiologiques et biochimiques particulières, dont la régulation ne peut être comprise que par l'investigation de son matériel génétique.

III - ETUDE DU GENOME DE RHIZOBIUM

L'association symbiotique Rhizobium-légumineuse ne peut être comprise que par l'étude des relations entre les propriétés symbiotiques de la bactérie et son matériel génétique.

L'analyse du génome est permise par l'utilisation de diverses techniques de manipulations génétiques, bien que les transferts génétiques chez Rhizobium restent très délicats.

3.1. LE GENOME DE RHIZOBIUM

3.1.1. Le chromosome.

Comme toute cellule procaryote, le Rhizobium possède un chromosome diffus dans la cellule dont l'ADN qui le compose est amalgamé par des protéines basiques de type HU et par l'ARN.

Cet ADN est bien sûr le siège de l'hérédité de cette bactérie et code pour les fonctions indispensables à la vie végétative de la cellule.

3.1.2. Les éléments extrachromosomiques.

Les bactéries du genre Rhizobium sont généralement caractérisées par la présence d'éléments génétiques extrachromosomiques appelés plasmides.

Leur nombre et taille varient selon les espèces de Rhizobium. On a pu tout d'abord mettre en évidence que la taille de ces plasmides était comprise entre 50 et 200 Md par la technique de CURRIER et NESTER (1976), mais par des techniques plus fines et plus douces, des plasmides de plus de 250 Md ont pu être décrits (NUTI et al, 1977; BECHET et GUILLAUME, 1978).

Par des techniques de lyse directe sur gel d'agarose (ECKARDT, 1978), un screening des contenus plasmidiques a pu être effectué facilement chez les diverses espèces de Rhizobium.

C'est alors par cette technique que furent découverts de grands plasmides dont le PM atteint 460 Md chez *R. trifolii* (ZURKOWSKI et LORKIEWICZ, 1979) et plus de 300 Md chez *R. meliloti* (ROSENBERG et al, 1981; 1982) appelés alors mégaplasmides.

L'investigation de la présence de grands plasmides chez les diverses espèces de *Rhizobium* a permis de décrire plus de 60 souches à croissance rapide possédant de grands plasmides (DENARIE et al, 1981). Chez la plupart des souches étudiées, un ou plusieurs plasmides ont été détectés.

R. leguminosarum semble porter au moins 3 plasmides de plus de 90 Md (CASSE et al, 1979). Chez *R. meliloti* différentes méthodes d'isolement ont révélé la présence de 2 classes de plasmides, l'une pouvant être isolée par la technique de dénaturation alcaline dont les PM se situent entre 90 et 200 Md et l'autre qui n'a pu être détectée par ce procédé mais seulement par la technique d'ECKARDT (1978) dont les PM sont supérieurs à 300 Md. Un tel plasmide a pu être trouvé chez 27 souches de *R. meliloti* d'origine géographique différente.

Tout récemment, le poids moléculaire exact du mégaplasmide de *R. meliloti* a pu être déterminé grâce à son isolement en lyse très douce et analysé en microscopie électronique (BURKARDT et BURKARDT, 1984). Sa longueur a permis de déterminer un PM d'environ 1000 Md. Ces mégaplasmides avaient eu leur PM estimé par la méthode d'électrophorèse en gel d'agarose, mais le calcul virtuellement impossible était faussé par la relation non logarithmique entre la mobilité et la taille de telles molécules.

Si la présence de tels grands plasmides semble être générale chez les espèces à croissance rapide, il n'en est pas de même pour celles à croissance lente. Des difficultés ont été rencontrées pour détecter et isoler les plasmides de ces souches de façon reproductible, cependant certaines études positives suggèrent leur présence possible chez les bactéries à croissance lente.

Ces plasmides ont longtemps été considérés comme cryptiques, c'est-à-dire de phénotype inconnu. Cependant, on a pu tout d'abord observer l'instabilité des propriétés symbiotiques, par la perte spontanée à haute fréquence de l'infectivité de certaines souches. De plus, cette perte dans certains cas a pu être accélérée par certains traitements à l'acridine orange (HIGASHI, 1967) ou à la chaleur (ZURKOWSKI et LORKIEWICZ, 1978).

De nombreux mutants furent alors mis en évidence, permettant de faire la corrélation entre la présence de plasmides et les propriétés symbiotiques.

Des transferts de caractères symbiotiques ont pu être effectués à plus hautes fréquences que celles trouvées pour les marqueurs chromosomiques, HIGASHI (1967) transféra ainsi à une souche de *R. phaseoli* la capacité de noduler le trèfle, puis les travaux de JOHNSTON et al, (1978) confirmèrent la présence de gènes de spécificité d'hôte sur un plasmide en transférant un plasmide marqué par le Tn 5 de *R. leguminosarum* à *R. trifolii* et *R. phaseoli*. Les transconjugants obtenus à haute fréquence (10^{-2}) étaient tous capables de former des nodules sur le pois ainsi que sur leur hôte habituel respectivement le trèfle et la haricot .

Les évidences ne s'arrêtent pas là. En effet, de nombreuses expériences ont prouvé que les gènes Nif de nombreuses espèces de *Rhizobium* sont localisés sur l'ADN extrachromosomique. C'est en clonant les gènes structuraux de la nitrogénase chez *Klebsiella pneumoniae*, les gènes nif H D K dans un petit plasmide amplifiable appelé pSA 30 (CANNON et al, 1977) et par hybridation avec cette sonde marquée que l'on a pu identifier des séquences homologues à ces gènes de *K.pneumoniae* codant pour la nitrogénase sur les grands plasmides de divers *Rhizobium*.

La présence de gènes nif homologue à ceux de *K.pneumoniae* a pu ainsi être déterminée sur l'ADN plasmidique de *R.leguminosarum* (NUTI et al, 1979; RUVKUN et AUSUBEL, 1980), de *R.phaseoli* (HOMBRECHER et al, 1981), de *R.trifolii* (RUVKUN et AUSUBEL, 1980; HOOYKAAS et al, 1981), de *Rhizobium* du groupe Cowpea (MORRISON et al, 1983), de même chez *R.meliloti*, la présence de tels gènes a pu être localisée sur le mégaplasmide (BANFALVI et al, 1981; ROSENBERG et al, 1981) et non sur le plasmide moyen, bien que celui-ci porte des séquences d'homologies entre des souches de *R.meliloti* d'origines diverses (JOUANIN et al, 1981). Ces séquences communes codent certainement pour des fonctions biologiques qui restent encore inconnues.

Il en est ainsi pour certaines souches de *R.japonicum* à croissance rapide isolées de Chine où les gènes Nod semblent être situés sur le grand plasmide (SADOWSKY et BOHLOOL, 1983) ainsi que les gènes Nif (MASTERSON et al, 1982), alors que ces gènes chez les souches à croissance lente, ne sont pas visualisés sur les plasmides (MASTERSON et al, 1982; HAUGLAND et VERMA, 1981).

Ainsi, le rôle des plasmides dans la symbiose semble confirmé pour les souches à croissance rapide et plus particulièrement pour *R.meliloti* où les gènes codant pour les fonctions principales de spécificité d'hôte, et d'infectivité et d'efficacité sont portés par les plasmides.

FORRAI et al, (1983) ont cependant observé des déficiences symbiotiques engendrées par des mutations chromosomiques. Cela permet de supposer que des gènes symbiotiques peuvent avoir un support chromosomique aussi bien que plasmidique.

3.1.3. Le génome de la forme endosymbiotique.

Beaucoup de travaux se sont attachés à déterminer d'éventuelles différences de contenu génétique entre les formes végétatives et endosymbiotiques de *Rhizobium*.

De nombreux auteurs ont observé que le contenu en ADN du bactéroïde était quantitativement égal ou supérieur à celui de la forme libre. Cela a été décrit par BISSELING et al (1977) chez *R.meliloti*, *R.trifolii* et *R.phaseoli*, ainsi que par PAAU et al (1977; 1979) et par REIJINDERS et al (1975) chez *R.leguminosarum*.

Cela pourrait être dû à une amplification des gènes symbiotiques essentiels pour la fixation d'azote ou à une accumulation de l'ADN due au manque de division cellulaire bactéroïde. La seconde hypothèse semble la plus vraisemblable.

DILWORTH et WILLIAMS (1967) suggèrent que la quantité d'ADN serait la même voir diminuée chez le bactéroïde. Cela a été observé par PAAU et al, (1978) mais chez le bactéroïde immature ou senescent de *R.meliloti*.

AGARWAL et MEHTA (1974) ont observé une diminution de la température de dénaturation et du GC % de l'ADN du bactéroïde, impliquant ainsi un changement de l'ADN cellulaire au cours de la transformation physiologique.

De plus, l'activité de la DNA polymérase semble être diminuée selon PAAU et COWLES (1975) ainsi que la quantité d'ARN (DILWORTH et WILLIAMS, 1967) alors que la synthèse protéique augmente au cours du changement de forme (SUTTON et al, 1981).

L'activité de la nitrogénase, mesurée par la réduction d'acétylène peut augmenter de plus de 1000 fois en 3 à 4 jours au cours de la maturation. Cela serait assuré par la synthèse de "novo" et réservé à la forme symbiotique bien qu'existant chez certaines souches à l'état libre (KEISTER, (1975); TJEKEMA, 1975).

De plus, les ARNm de cette enzyme ont été mis en évidence pour la première fois chez *R.meliloti* à l'intérieur de la plante et en particulier dans le bactéroïde mûre (PAAU et BRILL, 1982). Une forte expression des gènes *Nif* a été décrit aussi chez le bactéroïde de *R.leguminosarum* par rapport à la bactérie libre où ces gènes ne s'expriment peu ou pas du tout (KROL et al, 1980; 1982). Aucune amplification de ces gènes n'a pu être décelée. Il s'agit donc vraisemblablement d'une augmentation de la traduction de ces gènes qui serait donc essentiels pour l'association symbiotique.

Ainsi, l'étude du génome du bactéroïde ne semble pas très évidente et reste délicate, les bactéroïdes purs étant difficiles à obtenir. beaucoup de résultats semblent donc contradictoires et incomplets et des travaux doivent approfondir ces études afin de comprendre le fonctionnement des modifications qui surviennent entre le passage de la forme végétative à la forme symbiotique.

Il est cependant certain que le contact de la plante agit fortement sur l'expression du génome de son symbionte.

3.2. ETUDE ET MANIPULATION DU GENOME CHEZ RHIZOBIUM.

L'intérêt augmentant de la fixation biologique de l'azote atmosphérique a favorisé l'étude de cette bactérie grâce aux énormes progrès des méthodes d'analyse génétique mises au point récemment. De nombreuses techniques de biologie moléculaire et de transfert ainsi développées, nous permettent l'investigation du génome de *Rhizobium*.

3.2.1. L'isolement de mutants.

Pour l'étude génétique de toutes bactéries, il est très important voir essentiel d'obtenir des mutants. Les mutations ont principalement deux buts, d'une part l'obtention de marquages sélectifs sur un élément génétique donné, telles que la résistance à un antibiotique, une auxotrophie ou d'autre part, l'obtention de souches déficientes dans une étape donnée d'un processus déterminé telle que la fixation de l'azote pour *Rhizobium*. Cela permet de différencier les stades précis composant la fonction étudiée et de localiser les gènes responsables.

Les divers moyens de mutation peuvent être physiques (rayonnement UV, traitement à la chaleur), chimiques (traitement par le NTG, l'éthylméthylsulfonate EMS, l'acide nitrique, l'acridine orange, le bromure

d'éthidium, le SDS...) ou biologiques (utilisation d'éléments génétiques transposables appelés transposons).

C'est HIGASHI (1967) qui évoqua la relation entre les plasmides et les propriétés symbiotiques de *Rizobium* en traitant par l'acridine orange une souche de *R. trifolii* qui perdit ses propriétés d'infection. Ce traitement était déjà connu pour ses propriétés d'élimination des plasmides ou "cure".

Depuis, l'utilisation d'agents chimiques et physiques a été très employée pour obtenir des mutants symbiotiques tant sur le caractère d'infectivité (ZURKOWKI et al, 1973; MAIER et BRILL, 1976; STACEY et al, 1982; SKORUPSKA et al, 1984) que sur le caractère d'efficacité (BERINGER et al, 1977; SKOGEN-HAGENCON et ATHERLY, 1983).

Cela a permis aussi l'obtention de mutants altérés dans leur composition en polysaccharides et déficients dans leur relation symbiotique (PALOMARES et al, 1978; SANDERS et al, 1978; 1981; STACEY et al, 1982).

Par ce procédé, l'étude de différentes voies métaboliques a pu être précisée grâce à l'obtention de mutants auxotrophes (KONDOROSI et al, 1977; ZLOTNIKOV et al, 1984).

La méthode de mutagenèse la plus utilisée actuellement et en particulier pour l'étude de plasmides concerne l'insertion d'éléments génétiques transposables ou transposons dont principalement le Tn5.

Cette méthode permet en particulier le marquage des plasmides grâce à la résistance à la kanamycine que confère le Tn5 (JOHNSTON et al, 1978; BREWIN et al, 1980; BUCHANAN - WOLLASTON et al, 1980).

Les transposons servent aussi à l'obtention de mutants symbiotiques (CEN et al, 1982; ZIMMERMAN et al, 1983; HAHN et HENNECKE, 1984; DALENOEL et al, 1984) ainsi qu'à l'obtention de mutants auxotrophes (CEN et al, 1982; FORRAI et al, 1983; ALI et al, 1984) très utiles pour déterminer les différentes voies métaboliques chez *Rhizobium*.

Récemment, il a été découvert que le Tn7 possède la propriété de s'insérer spécifiquement dans le mégaplasmide de différentes souches de *R. meliloti*. Cela procure un outil génétique très intéressant pour la manipulation du mégaplasmide de cette bactérie (BOLTON et al, 1984).

La mutagenèse permet donc d'élucider le rôle des plasmides dans le processus symbiotique et d'obtenir des clones intéressants qui seront précieux pour l'étude du génome de *Rhizobium*.

3.2.2. La transduction.

La transduction est l'une des voies de transfert génétique dont le vecteur est phagique qui est appliquée à *Rhizobium*. Elle n'a été utilisée que pour très peu de souches de *Rhizobium* et concerne principalement l'étude de *R. meliloti*.

C'est KOWALSKI (1967) qui décrit pour la première fois une transduction chez *R. meliloti*. Chez cette bactérie, une grande proportion de phages tempérés est capable de transduction de caractères de résistance à la streptomycine, d'auxotrophie et d'efficacité (KOWALSKI, 1970).

La cotransduction de marqueurs a été observée chez *R. meliloti*. Des mutants exigeants en leucine (Leu^-) et inefficace (Fix^-) ont été transduits pour le caractère leu^- et ont retrouvé leur caractère Fix^+ . (KOWALSKI et DENARIE, 1972).

Les transductions ont aussi été effectuées chez *R. leguminosarum* et de *R. leguminosarum* à *R. trifolii* par BUCHANAN-WOLLASTON et al, (1979) qui ont réussi à transférer des gènes chromosomiques et plasmidiques par l'intermédiaire de phages virulents.

HASSANI (1983) a de même cotransduit le gène *Leu* avec le *Tn5* chez une souche de *R. meliloti* ainsi que le gène responsable du caractère Méthionine (Met^+) d'une souche prototrophe vers une souche auxotrophe.

Cette technique semble intéressante mais reste très limitée et peu employée. Cependant, son application peut être utile pour l'établissement de carte génétique.

3.2.3. La conjugaison et le clonage chez *Rhizobium*.

La plupart des études génétiques concernant *Rhizobium* sont actuellement basées sur le transfert par conjugaison où le matériel génétique passe directement d'une cellule donnatrice vers une cellule réceptrice.

La conjugaison peut provoquer un échange de plasmides entre diverses bactéries et cela permet dans la nature une adaptation des microorganismes. Elle fût décrite pour la première fois chez *Rhizobium* par HIGASHI (1967) qui transféra le caractère de spécificité d'hôte de *R. trifolii* à *R. phaseoli* puis par HEUMANN (1968) impliquant un transfert chromosomique chez *R. lupini*.

Des études plus récentes ont porté sur le transfert de plasmides de groupe d'incompatibilité Inc P₁ portant des caractères de résistance aux antibiotiques (BERINGER, 1974 ; MEADE et SIGNER, 1977).

Des cartes génétiques ont pu être effectuées ainsi chez *R. leguminosarum* (BERINGER et al, 1978) et *R. meliloti* (KONDOROSI et al, 1977; MEADE et SIGNER, 1977).

Des essais de transfert morceau par morceau de chromosome de *R. trifolii*, *R. phaseoli* et *R. leguminosarum* n'ont abouti à aucun transfert de spécificité d'hôte suggérant que les gènes impliqués doivent être extrachromosomiques (BERINGER et al, 1980).

Chez *Rhizobium*, cette technique concerne principalement le transfert direct des plasmides conjugatifs permettant quelquefois le transfert de caractères symbiotiques (JOHNSTON, 1978; BEYNON et al, 1980; HOOYKAAS et al, 1981; DJORDJEVIC et al, 1983).

Ces transferts ont été principalement observés pour les souches de *R. leguminosarum*, *R. trifolii* et *R. phaseoli*, dont les plasmides symbiotiques (pSym) sont autotransmissibles donc capables d'être introduits chez d'autres espèces de *Rhizobia*. Les transconjugants obtenus sont capables d'association symbiotique avec le nouvel hôte, ce qui rend

évident la présence de gènes symbiotiques sur ces plasmides.

Cependant, chez *R. meliloti*, l'autotransmissibilité du pSym n'a pas encore été observée. Les études portant sur ce mégaplasme sont extrêmement difficiles à cause de l'importance de sa taille et aucun transfert direct n'a jusqu'à ce jour pu être possible.

Pour transférer ce mégaplasme pSym de *Rhizobium meliloti*, il faut donc avoir recours à des techniques plus complexes de clonage et l'utilisation des plasmides Inc P1 ou de leur dérivés a permis la mobilisation de ce pSym.

En effet, l'utilisation de tels plasmides dont le RP₄ a permis l'insertion de la région *mob* dans le mégaplasme de *R. meliloti* 41 (pRme 41b), le rendant susceptible d'être mobilisé vers d'autres bactéries où l'expression des fonctions symbiotiques de cette souche a pu être obtenue. (KONDOROSI et al, 1982; WONG et al, 1983).

L'obtention de plasmides Rprime par insertion *in vivo* de grands fragments du pSym dans ces plasmides Inc P1 (tel le RP₄ donnant ainsi le RP'₄) a conduit de même au transfert de caractères de ce pSym, notamment de caractères Nod et Nif du pRme 41b (KONDOROSI et al, 1983) et du pSym de *R. meliloti* 2011 (JULLIOT et al, 1984). Ce dernier transfert a pu en particulier être effectué vers *Agrobacterium tumefaciens* (TRUCHET et al, 1984) conduisant à la formation de nodosités sur la luzerne par les transconjugants.

Par l'utilisation de plasmides Rprime, KONDOROSI et al, (1984) ont pu étudier les gènes Nod et Fix du mégaplasme. Les gènes Nod semblent être séparés en deux groupes, les gènes Nod "communs" existant chez divers *Rhizobium* et impliqués dans la courbure des poils et les gènes Nod responsables de la spécificité d'hôte.

Les gènes Nod "communs" ont été clonés par SHMIDT et al (1984) permettant l'expression de huit protéines impliquées dans les étapes précoces de la nodulation.

L'étude des gènes Nif de *R. meliloti* a pu être déterminée par clonage et hybridation et ceux-ci semblent être transcrits dans le sens Nif H- D- K qui est le même que pour *K. pneumoniae* (RUVKUN et al, 1982).

Ces techniques de transfert ont pu être réalisées chez *R. trifolii* pour l'étude des plasmides non autotransmissibles (SCOTT et RONSON, 1982 ; WATSON et al, 1983).

L'utilisation de telle technologie a permis de renforcer l'étude des gènes Nif jusqu'à leur régulation par homologie avec celle de *K. pneumoniae*, identifiant ainsi les séquences homologues de la région promoteur des gènes Nif conservées chez diverses espèces de *Rhizobium* (BETTER et al, 1983).

Le système de régulation chez *Rhizobium* semble similaire à celui de *K. pneumoniae* (DE BRUIJN et AUSUBEL, 1983; DIXON et al, 1983) qui a pu être schématisé ainsi (AUSUBEL ET AL, 1982) :

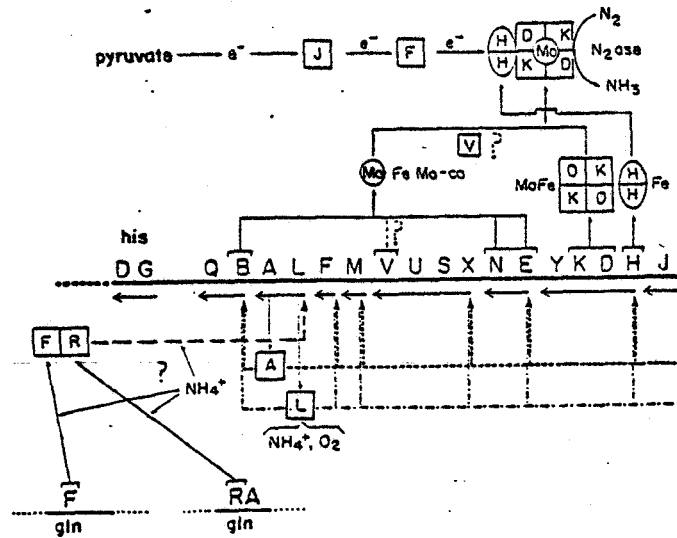


FIGURE 5 - REGULATION DES GENES NIF CHEZ K. PNEUMONIAE (AUSUBEL et al., 1982).

Cependant chez *Rhizobium*, les gènes Nif ne sont exprimés qu'en symbiose avec la plante. Tous ces gènes seraient sous le contrôle d'un système central de régulation symbiotique (SUNDARESAN et al, 1983 a; 1983 b; SZETO et al, 1984).

Ainsi l'étude des gènes symbiotiques que ce soit pour *R.meliloti* ou pour d'autres *Rhizobia* nécessite souvent l'intervention de technologie lourde et complexe, et la manipulation de gènes isolés n'est pas toujours possible.

En effet, il faudrait pouvoir disposer pour cela, de techniques de transfert plus simples et en particulier l'utilisation de la transformation de cellules réceptrices par de l'ADN isolé in vitro.

3.2.4. La transformation Chez *Rhizobium*

La transformation a été la base du premier rapport de transfert génétique chez *Rhizobium* (KRASILNIKOV, 1941) décrivant le transfert de la capacité de noduler par culture d'une souche de *Rhizobium* en plusieurs passages dans un milieu contenant un filtrat stérile d'une autre souche. Ce transfert a alors été attribué à la présence d'ADN dans les filtrats de culture.

Les travaux portant sur la transformation par de l'ADN purifié chez *R.meliloti*, *R.lupini*, *R.japonicum* ont principalement été effectués par BALASSA R., portant sur le transfert de capacité de nodulation, de marqueurs d'auxotrophie et de résistance aux antibiotiques. Tous ces travaux ont été revus par BALASSA G. (1963).

En 1965, BALASSA R. transféra le caractère de dépendance à la streptomycine à des souches de *R.lupini* mais les fréquences étaient faibles.

D'autres auteurs reportèrent aussi des transferts de gènes par transformation, chez *R.lupini* (GABOR, 1965) *R.* du groupe *cowpea* (RAINA et MODI, 1972) *R.trifolii* (DROZANSKA et LORKIEWICZ, 1978).

De même, des transformations entre *Rhizobium* et d'autres genres bactériens ont été décrites.

SEN et al (1969) ont pu ainsi transformer deux souches d'*Azotobacter* avec de l'ADN de *R.leguminosarum*, *R.meliloti*, *R.japonicum* et *R.trifolii* selon un marqueur de résistance à la streptomycine.

A l'inverse, une souche de *R.trifolii* a pu être transformée par un facteur R codant pour la résistance à la kanamycine, l'ampicilline et le chloramphénicol issus de *Pseudomonas aeruginosa* (DUNICAN et TIERNEY, 1973).

Récemment, une technique de transformation chez *R.trifolii* utilisant de la glycine pour rendre la bactérie plus transformable a été décrite par DROZANSKA et al, (1982).

De même pour *R.meliloti*, une technique de transformation a été mise au point au laboratoire (COURTOIS, 1982), aucune technique efficace n'ayant été encore décrite pour cette souche.!!!! *les souches Solo*

Depuis peu, quelques techniques de transformation par de l'ADN plasmidique ont été décrites chez *R.meliloti* par SELVARAJ et IYER (1981) et par KISS et KALMAN (1982) utilisant de l'ADN de plasmides Inc P1 et chez *R.leguminosarum* par BULLERJAHN et BENZINGER (1982) par de l'ADN plasmidique du pR 68.45 de *R.leguminosarum*.

Cette technique de transfert, bien qu'elle reste encore difficilement reproductible et qu'elle n'implique que peu de marqueurs ne manque pas d'intérêt.

En effet, elle offre la possibilité de transférer de l'ADN préalablement isolé *in vitro*, donc manipulable chimiquement.

L'utilisation de la transformation pour l'introduction de vecteurs de clonage potentiels chez diverses souches de *Rhizobium* est donc attendue, et cela serait un outil important pour introduire des plasmides non transférables par conjugaison, ainsi que des plasmides construits *in vitro*, dans une cellule réceptrice.

IV - LA TRANSFORMATION

4.1. Historique et applications.

C'est en 1928 que ce premier transfert fût évoqué par GRIFFITH qui décrit l'acquisition de capsule exopolysaccharide par des pneumocoques avirulents non capsulés, devenant alors virulents, par simple contact avec des pneumocoques virulents tués par la chaleur.

Ce n'est qu'en 1944 que la véritable nature chimique responsable de ce transfert fût identifiée comme étant l'ADN par AVERY et al.

Cette technique de transfert a été ensuite appliquée avec plus ou moins de succès à de nombreux genres bactériens, autant à gram négatif que positif ainsi qu'à certaines cellules eucaryotes dont les levures (KLEBE et al., 1983 ; ORR-WEAVER et al, 1983) et les algues inférieures (STEVENS et PORTER, 1980).

Elle a été décrite pour des genres divers, tels que *Clostridium perfringens* (KEEPNER et al, 1984), *Haemophilus influenzae* (BREMER et al, 1984), *Azotobacter vinelandii* (PAGE ET TIGERSTROM, 1979; DORAN et PAGE, 1983), *Pseudomonas putida* (MYLROIE et al, 1978), *Pseudomonas stutzeri* (STEWART et al, 1983), *Bacillus sphaericus* (ORZECH et BURKE, 1984), de même pour *Rhizobium* précédemment décrit.

Ce transfert génétique a surtout été particulièrement bien décrit et étudié pour trois espèces bactériennes, chez *Escherichia coli* (COSLOY et OISHI, 1973; VAN DIE et al, 1983) notamment avec de l'ADN issu de genre bactérien différent (SANCHEZ et al, 1976), et surtout chez *Diplococcus pneumoniae* (SETO et TOMASZ, 1975; LACKS et al, 1975; VIJAYAKUMAR et MORRISON, 1983 ; MORRISON et al, 1983..) et chez *Bacillus subtilis* (WEPPNER et LEACH, 1978 ; CHAUSTOVA et al, 1980 ; RANDEN et VENEMA, 1981; MULDER et VENEMA, 1982; SMITH et al, 1983..).

Depuis la purification des plasmides, des transformations ont pu être réalisées avec de l'ADN extrachromosomique ce qui offre un intérêt considérable, ces molécules pouvant être modifiées in vitro.

Cela a pu être décrit chez un grand nombre de bactéries, dont *Bacillus sphaericus* (ORZECH MAC DONALD et BUAKE, 1984), *Escherichiacoli* (COHEN et al, 1972); COUETDIC et al, 1983; HIMENO et al, 1984) et *Rhizobium meliloti* (SELVARAJ et IYER, 1981; KISS et KALMAN, 1982), *Yersinia enterocolitica* (RODRIGUEZ-SOLORZANO et al, 1984).

4.2 . Conditions de transformation.

De nombreux paramètres influent sur la transformation et pour obtenir des fréquences de transfert acceptables, il faut savoir se placer dans les meilleures conditions possibles qui sont souvent très variables d'une espèce à l'autre.

Trois facteurs sont essentiels pour contrôler ces conditions : l'état de l'ADN purifié, de la cellule réceptrice et le milieu de transformation.

4.2.1. L'ADN transformant.

Chez certaines espèces bactériennes, la transformation peut s'effectuer par simple contact entre une culture de cellules donnatrices et une culture de cellules réceptrices, où l'ADN donneur est spontanément excrété par les bactéries, mécanisme d'ailleurs possible dans la nature.

C'est en observant des fréquences de transfert supérieures par simple contact cellulaire que par addition d'ADN purifié chez *Pseudomonas stutzeri*, que STEWART et al (1983) ont suggéré la forte contribution de l'ADN donneur au cours de la transformation. L'Etat de cet ADN est donc un facteur primordial pour permettre le transfert.

Beaucoup d'auteurs ont aussi remarqué que l'ADN donneur doit être de haut poids moléculaire, supérieur à 10 Md. Selon RAINA et MODI (1972), l'ADN dénaturé par la chaleur est incapable de s'accrocher sur la cellule réceptrice de *R.japonicum*. MYLROIE et al, (1978) ont de même observé une haute fréquence de transformation chez *Pseudomonas putida* avec de l'ADN de haut poids moléculaire double brin, qui semble biologiquement actif. Une dénaturation abolit complètement le transfert.

Ce rôle biologiquement actif de l'ADN donneur a été aussi décrit chez *Streptococcus pneumoniae* (VIJAYAKUMAR et MORRISON, 1983) qui doit être de haut poids moléculaire et non dénaturé (double brin).

Un autre paramètre qui semble important pour la transformation concerne la concentration en ADN donneur. Il semble cependant nettement différent selon les diverses espèces bactériennes. La concentration optimum varie ainsi de 1 µg/ml chez *Clostridium perfringens* (SMITH et al, 1983) de 5 à 10 µg/ml chez *Pseudomonas putida* (MYLROIE et al, 1978), de 20 à 50 µg/ml chez *Rhizobium* (RAINA et MODI, 1971).

L'origine de l'ADN a aussi son importance. Plus l'homologie entre l'ADN donneur et celui de la cellule réceptrice est grande, plus la fréquence est grande. Cela pourrait se situer au niveau des premières étapes de la transformation, mais c'est probablement après la pénétration que l'ADN, s'il est trop différent de celui de la cellule hôte est soumis à l'action des endonucléases de restriction. Afin d'éviter cela, il est très intéressant de posséder des bactéries restriction moins.

Le succès de la transformation de *Azotobacter* par de l'ADN de *Rhizobium* a été rendu possible, grâce à la composition proche en GC % des deux bactéries qui semblent étroitement proches l'une de l'autre (SEN et al, 1969).

Cependant, selon VAN RANDEN et al (1982), une simple petite région d'homologie suffit entre l'ADN d'*E.coli* et celui de *B.subtilis* pour initier la recombinaison et aboutir à un complexe instable ADN donneur-receveur, bien que la formation de complexe stable n'ait jamais été observée entre l'ADN d'*E.coli* et celui de *B.subtilis*.

En conclusion, pour être en condition favorable de transformation, l'ADN ajouté doit être double brin, de haut poids moléculaire, à une concentration optimum, et d'origine la plus proche possible de celui de la cellule réceptrice:

4.2.2. La cellule réceptrice.

De nombreuses espèces bactériennes ne sont pas capables en condition naturelle de culture de subir la transformation génétique.

Par l'utilisation de protoplastes, chez divers bactéries TICHY et al, 1968; ORZECH et BURKE, 1984; NOACK et al, 1984), ce transfert a pu être possible donnant de hautes fréquences, supérieures à celles obtenues avec des bactéries intactes (CHANG et COHEN, 1979).

Les difficultés posées par cette méthode ne compensent pas son efficacité et des techniques plus récentes utilisant le chlorure de calcium (CaCl_2) ont été décrites d'après la méthode standard de MANDEL et HIGA (1970).

4.2.2.1. La compétence.

Une bactérie réceptrice normale, pour recevoir et incorporer dans son génome cet ADN transformant doit en général se trouver dans un état particulier appelé compétence ou transformabilité, bien que certains auteurs décrivent des transformations bactériennes par simple incubation d'un mélange d'une culture de cellules réceptrices et d'une solution d'ADN (SEN et al, 1969).

Cet état de compétence est défini comme la perméabilité des cellules à l'ADN et se trouve lié à de nombreux facteurs, tels que la composition du milieu, l'état physiologique des cellules, les conditions physico-chimiques du transfert (BALASSA, 1963).

Les conditions requises pour atteindre cet état ne sont pas toujours très bien comprises. Pour de nombreuses espèces bactériennes, il semble que cela soit lié à l'état physiologique de la bactérie, donc à l'âge de la culture.

Haemophilus influenzae, *Diplococcus pneumoniae* et certains *Bacillus* atteignent l'état de compétence en fin de phase exponentielle de croissance, alors que *Neisseria* l'atteint en début de phase exponentielle ainsi que certaines espèces de *Rhizobium* (RAINA et MODI, 1971), bien que certaines souches de *Rhizobia* présentent le maximum de compétence en fin de phase exponentielle tel *R.japonicum* (RAINA et MODI, 1972).

4.2.2.2. Le facteur d'accrochage de l'ADN.

La compétence semble être un phénomène de surface qui implique l'accrochage de l'ADN et son transport.

Cet état peut être augmenté ou favorisé par addition de facteurs nutritifs dans le milieu de croissance, tels que l'extrait de levure et du casamino acide pour *Rhizobium* (RAINA et MODI, 1969; 1971; 1972) et récemment la glycine semble présenter un intérêt important pour favoriser la compétence de cette bactérie (DROZANSKA et al, 1982).

L'addition de calcium semble être généralement un facteur indispensable pour induire la transformation.

Au cours de cet état de compétence, l'ADN étranger doit s'associer à la surface externe de la bactérie. RAINA et MODI (1972),

ont étudié expérimentalement chez *R.japonicum*, l'accrochage d'ADN marqué au ^{32}P pendant la phase logarithmique de la compétence. 10% de cet ADN marqué semble s'accrocher irréversiblement alors que de l'ADN dénaturé marqué est incapable de s'accrocher dans les mêmes conditions.

Cette adsorption de molécules d'ADN à la surface bactérienne semble être spécifique de polydéoxyribonucléotides. Cette capacité d'accrochage est perdue par lavage à l'eau distillée de pneumocoques compétents (SETO et TOMASZ, 1975) et de *Azotobacter vinelandii* (DORAN et PAGE, 1983).

Une inactivation plus ou moins complète de cette capacité d'accrochage de l'ADN a été observée au cours de la formation de protoplastes ou pendant l'incubation brève de bactéries compétentes dans certains tampons ou solutions de sucres hypertoniques.

Cet accrochage de l'ADN semble être lié à un facteur noté BF (Binding factor) qui a pu être détaché de pneumocoques compétents conduisant alors à des pneumocoques incompétents. Il semble être de nature protéique et garde après solubilisation les propriétés de récepteurs à l'ADN des pneumocoques transformables (SETO et TOMASZ, 1975).

Le détachement de ce BF de cellules compétentes peut refléter la fragilité de ce phénomène chez la bactérie.

In vitro la réaction BF-ADN présente un pH optimum et requiert des temps et températures d'incubation précis.

Une glycoprotéine d'enveloppe relâchée par lavage à l'eau distillée a été identifiée chez *A.vinelandii*. Cette protéine de PM 60 000 semblerait liée à la compétence (DORAN et PAGE, 1983).

Chez *B.subtilis*, une protéine membranaire de PM 18 000 absente chez des mutants incompétents, semble de même être impliquée dans l'accrochage de l'ADN (SMITH et al, 1983).

L'induction de la compétence est souvent amenée par augmentation ou diminution de la température du milieu de transformation. LOPEZ et al (1983) ont remarqué chez *B.subtilis* que l'induction ou l'inhibition de la transformabilité par changement de température sont parallèles à la capacité des cellules à accrocher l'ADN transformant.

Par addition de chloramphénicol, ils ont obtenu une inhibition du développement de la compétence. Ce composé inhibant la synthèse protéique leur a permis de conclure qu'une synthèse protéique en continu est nécessaire pour le développement de cet état. Selon ces auteurs, cette protéine d'accrochage ne serait pas synthétisée pendant la phase de précompétence.

D'après WEPPNER et LEACH (1978), l'attachement initial de l'ADN transformant à des cellules de *B.subtilis* compétents ne dépend pas de la température entre 25°C et 45°C, mais en dessous de 15°C, une nette diminution de la quantité d'ADN accroché est observée. Le changement de température induirait une altération de la membrane ou paroi bactérienne, modification nécessaire pour la transformation et les sites d'attachement initiaux pour l'ADN auraient des conformations variables

selon la température.

Ces travaux sont à relier de ceux de VANDIE et al (1983) qui ont amené une culture d'*E.coli* à l'état de compétence par chocs thermiques de 0°C à des températures de 30°C et 42°C. L'efficacité du transfert a semblé alors dépendre de la température des chocs thermiques qui selon eux coïncide avec la zone de température où a lieu la phase de transition des lipides membranaires.

La composition en lipides membranaires semble donc influencer sur la température optimale d'induction de la compétence. Au cours de cette transition membranaire, des discontinuités en lipides ont lieu, pouvant être considérés comme des sites où l'ADN passerait au travers de la membrane.

D'autres études ont été faites sur les moyens d'exacerber la compétence, notamment chez *Rhizobium* par DROZANSKA et al (1982). Ces auteurs, après avoir eu des difficultés à effectuer des transformations reproductibles chez cette bactérie, ont mis au point une technique en mesurant l'effet de certains acides aminés, telles l'alanine, la glycine, et la sérine sur le transfert.

Ils ont alors observé une augmentation significative de la fréquence d'environ 10 fois supérieure par addition de glycine dans le milieu de croissance. Ils ont déduit de leurs travaux que la glycine agirait en compétition avec l'alanine au niveau des sites enzymatiques qui permettent l'incorporation de précurseurs dans le peptidoglycane, constituant principal de la paroi.

La glycine inhiberait donc la synthèse du peptidoglycane, ce qui aurait pour effet un relâchement de sa structure, et l'accès alors possible aux structures plus profondes de la paroi cellulaire.

Beaucoup de travaux tendent de même à relier la compétence cellulaire à un changement de structure de la paroi. La cellule compétente pourrait ainsi être considérée comme un sphéroplaste temporaire.

4.2.2.3. Le transport de l'ADN.

La présence de facteurs responsables de l'accrochage de l'ADN aux cellules compétentes n'est pas seule responsable du transport de l'ADN à l'intérieur de la bactérie.

Le mécanisme d'entrée de l'ADN transformant a été remarquablement bien étudié chez *S.pneumoniae* par LACKS et al, qui ont établi qu'une endonucléase membranaire est nécessaire pour l'entrée de l'ADN dans le pneumocoque compétent.

Ces auteurs ont obtenu des mutants de pneumocoque déficients en transformation dont l'activité de l'endonucléase était fortement réduite ou abolie. Ces mutations semblent bloquer l'entrée de l'ADN dans la cellule, alors qu'il reste accroché en grande quantité à l'extérieur. L'addition d'EDTA, agent inhibiteur de désoxyribonucléase (DNase) à des cellules sauvages produit le même effet (LACKS et al, 1975a).

Cette enzyme membranaire de type endonucléase I est nécessaire à la conversion de l'ADN donneur en ADN simple brin permettant l'entrée d'un des brins alors que le second est dégradé en oligonucléotides à l'extérieur (LACKS et NEUBERGER, 1975b). L'Enzyme agirait comme une translocase à ADN attaquant et dégradant un brin tout en facilitant l'entrée du brin complémentaire dans la cellule.

D'autres enzymes dont l'amylomaltase, des exonucléases, une déoxyribonucléase ATP dépendante et une endonucléase de type de restriction sont situés dans le cytosol de la bactérie. Aucune de ces enzymes ne semblent avoir une localisation périplasmique.

Des enzymes autolytiques permettant l'obtention de sphéroplastes spontanés semblent être impliqués dans ce processus.

Les travaux de LACKS se sont poursuivis par l'obtention d'autres mutants de *S.pneumoniae* déficients en nucléase membranaire et déficiente dans l'entrée de l'ADN. L'ADN cependant est accroché aux cellules et semble avoir subi des coupures simple brin alors que l'ADN accroché aux cellules sauvages ne présente que des coupures double brin (LACKS, 1979).

Les rapports de LACKS et al ont permis à d'autres auteurs d'étudier ce même mécanisme chez *B.subtilis*.

Chez cette bactérie, l'ADN donneur est de même converti en brin unique accompagné par une partielle solubilisation acide de l'ADN (obtention d'oligonucléotides). Le mécanisme d'entrée de l'ADN peut aussi être inhibé par adjonction d'EDTA.

La similitude entre les deux systèmes a permis de suggérer qu'une nucléase membranaire peut aussi être impliquée dans l'entrée de l'ADN chez *B.subtilis*.

C'est par l'obtention de mutants faiblement compétents et par comparaison avec la bactérie sauvage que MULDER et VENEMA (1982) ont révélé l'existence de trois activités nucléasiques associées à la compétence de PM 13 000, 15 000, et 26 000. Ces trois activités dépendent de la présence de Mn^{2+} ou Mg^{2+} et sont spécifiquement présentes dans une fraction de cellules compétentes. Par l'examen de divers mutants, les résultats ont permis de constater que la molécule de PM 26 000 est un dimère de celle de 13 000 et que ces nucléases sont impliquées dans l'entrée de l'ADN.

Par contre, en essayant de purifier la protéine d'accrochage de *B.subtilis* de PM 18 000 (cf précédemment), SMITH et al (1983) ont isolé en même temps un complexe contenant cette unité de PM 18000 accompagnée d'un autre polypeptide de PM 17 000 ayant un pHi différent.

Ces deux sous-unités, isolées selon le même procédé se trouvent dans le même profil d'élution dans un pic correspondant à une protéine de PM 75 000. Cela suggère que ces deux protéines forment un complexe dans la membrane des cellules compétentes.

L'accrochage de l'ADN serait l'une des propriétés de cette protéine récepteur au cours de la transformation. La seconde propriété du complexe protéique purifié a été déterminée comme étant une activité nucléasique, active en présence de cations divalents, inhibée par l'EDTA.

Il semble intéressant de croire que les sites d'accrochage multimoléculaires chez *B.subtilis* servent en même temps de site d'entrée.

L'idée d'un complexe protéique impliqué à la fois dans l'accrochage et l'entrée de l'ADN donneur a été fortement supportée par des expériences récentes indiquant que la deuxième sous-unité du complexe est absente chez des mutants de *B.subtilis* déficients dans l'entrée de l'ADN.

Contrairement à ces hypothèses, LOPEZ et al (1983) pensent qu'au moins deux complexes spécifiques de la compétence semblent être nécessaires pour les premières étapes de la transformation chez *B.subtilis* : un composé capable d'accrocher l'ADN donneur et une nucléase membranaire dont l'activité semble être impliquée dans l'entrée de l'ADN, situation similaire à celle de *S.pneumoniae*.

L'action du chloramphénicol, inhibant l'accrochage de l'ADN sans altérer l'activité nucléolytique a permis à ces auteurs de conclure que le facteur d'accrochage est synthétisé en continu au cours du développement de la compétence, alors que le facteur responsable de l'activité nucléolytique lié à l'entrée de l'ADN est déjà synthétisé au moment de l'induction de la compétence.

L'accrochage de l'ADN par les cellules compétentes de *B.subtilis* peut donc expérimentalement être séparé de l'activité nucléolytique membranaire.

D'autres auteurs ont observé qu'un traitement à 42°C de cellules de *B.subtilis* inhibe le transport de l'ADN marqué à l'intérieur de la bactérie alors que celui-ci reste accroché à l'extérieur en grande quantité (DORAN et PAGE, 1983). Le transport de l'ADN est donc sensible à la chaleur mais la compétence est réacquise à 30°C.

Ils en déduisent qu'une synthèse protéique est nécessaire au cours de la compétence et plus particulièrement pour le transport de l'ADN, ce qui semble en désaccord avec les résultats de LOPEZ et al (1983).

Ainsi, la compétence semble être liée à deux facteurs, l'attachement de l'ADN à la bactérie, puis son entrée dans la cellule au travers de la membrane, mais beaucoup de travaux restent encore à faire pour élucider ce mécanisme.

Cet état semble peu stable et correspondre à une courte période de la croissance en générale étroitement liée à la structure de la paroi de la bactérie. Les conditions de culture ont donc certainement un rôle primordial pour induire ce phénomène.

4.2.3. Les milieux de transformation .

Il faut tout d'abord distinguer deux choses : d'une part, les conditions nécessaires à l'induction de la compétence permettant la transformation et d'autre part, celles nécessaires au transfert lui-même.

Il est cependant quelquefois difficile de distinguer le rôle de chaque paramètre dans les différentes étapes qui conduisent à la transformation.

4.2.3.1. Milieu de compétence.

Beaucoup d'auteurs se sont attachés à définir les conditions optimales conduisant à cet état de compétence, conditions qui semblent variables selon les espèces bactériennes.

Il semble cependant assez fréquent que l'adjonction de facteurs nutritifs aminés permette un tel phénomène.

Chez *Rhizobium*, la plupart des méthodes de transformation décrites utilisent comme milieu de compétence, un milieu synthétique minéral additionné de casamino acide et d'extrait de levures (RAINA et MODI, 1969; 1971; COURTOIS, 1982).

L'utilisation d'un milieu ressemblant à cela a été décrit pour *S.pneumoniae* par GRIST et BUTLER (1981) où le casamino acide semble être un paramètre influant sur le développement de la compétence.

L'addition de glycine dans le milieu de culture de *R.trifolii*, a permis par contre une augmentation de dix fois de la fréquence de transformation (DROZANSKA et al, 1982).

L'hypothèse soulevée est que la compétence est un phénomène de surface où la structure de la bactérie joue un rôle primordial. Au cours de la croissance, cette structure subit des modifications qui permettraient le passage de l'ADN pendant les phases de transition.

Le pH du milieu semble aussi être un paramètre très important pour l'induction de la compétence. Des cellules de *Bacillus brevis* traitées par un tampon trishydrochloride à pH alcalin incorporent l'ADN à une très haute fréquence (TAKAHASHI et al, 1983).

4.2.3.2. Milieu de transfert.

Les conditions du transfert lui-même semblent être primordiales pour aboutir au succès de la transformation.

Déjà le rôle du calcium (Ca^{2+}) et du magnésium (Mg^{2+}) avait été observé pour la transformation chez *Rhizobium* permettant un développement de la compétence, alors que d'autres ions tels Fe^{3+} , Mo^{2+} et Zn^{2+} inhibaient au contraire le phénomène (RAINA et MODI, 1971).

C'est alors qu'une méthode standard de transformation a été décrite par MANDEL et HIGA (1970) utilisant un traitement par le CaCl_2 . Cette technique reprise par COHEN et al (1972), chez *E.coli* a été appliquée avec succès chez cette bactérie par COSLOY et OISHI (1973), CHANG (1982) et VAN DIE et al (1983) et chez d'autres espèces bactériennes dont *Pseudomonas putida* (MYLROIE et al, 1978).

Selon VAN DIE et al (1983), le rôle possible de Ca^{2+} serait de faciliter le transport de l'ADN dans les cellules soit par la formation d'un complexe Ca^{2+} - ADN neutre ou soit par l'interaction des ions Ca^{2+} avec les phospholipides membranaires chargés négativement, affectant ainsi la stabilité des doubles couches.

Au cours de la phase de transition, le Ca^{2+} faciliterait la formation de pores existant temporairement au niveau des membranes que pourrait alors traverser l'ADN.

La transformation est un processus qui nécessite de l'énergie (CHAUSTOVA et al, 1980), le Ca^{2+} pourrait à ce niveau avoir un rôle dans le mécanisme énergétique lié à l'ATP.

L'ion Mg^{2+} de même semble avoir pour certaines espèces bactériennes, un rôle essentiel pour la transformation, notamment pour *E.coli* (VAN DIE et al, 1983; CHANG, 1982). Cela a particulièrement bien été étudié chez *Azotobacter vinelandii* où aucune transformation n'a lieu sans magnésium (PAGE et VON TIGERSTRON, 1979). Selon ces auteurs, le Ca^{2+} ne peut remplacer le Mg^{2+} . Ce dernier ion aurait un rôle dans l'accrochage ou le transport de l'ADN.

MULDER et VENEMA (1982) ont observé que l'activité des endonucléases liées à l'entrée de l'ADN était dépendante de la présence d'ions manganèse ou magnésium, ainsi l'adjonction de MgCl_2 dans le milieu de transformation serait un facteur important pour l'action des nucléases au cours des premières étapes de transformation.

Ces deux ions Ca^{2+} et Mg^{2+} semblent en général palier aux exigences particulières permettant le transport de l'ADN dans la cellule réceptrice.

Cependant récemment, diverses techniques utilisant du polyéthylèneglycol (PEG) ont été rapportées comme favorisant la transformation chez *E.coli* (KLEBE et al, 1983; HIMENO et al, 1984) en l'augmentant d'un facteur de 5, ainsi que chez une très grande variété de microorganismes dont *Clostridium perfringens* (HEEFNER et al, 1984) et *B.sphaericus* (ORZECH et BURKE, 1984).

Cette technique est généralement associée à un traitement par CaCl_2 .

HIMENO et al, (1984) suggèrent que le PEG permettrait la condensation des molécules d'ADN, prévenant ainsi l'attaque par les exonucléases et facilitant leur pénétration dans la cellule.

Lorsque les conditions optimales sont présentes, l'ADN est ajouté aux cellules compétentes. Il ne reste plus qu'à transférer~~X~~ et sélectionner le phénotype recherché.

4.2.4. Les étapes de la transformation.

La transformation d'une bactérie réceptrice est l'aboutissement d'une série d'étapes conduisant à la recombinaison génétique entre l'ADN donneur et receveur qui permet à la cellule hôte d'acquérir un phénotype nouveau.

4.2.4.1. L'association ADN - bactérie.

L'ADN entre en contact avec la cellule compétente et s'associe à celle-ci au niveau du facteur d'accrochage. Cette association semble fragile mais peut devenir irréversible.

Un changement de température peut induire des altérations membranaires et favoriser cet accrochage permettant peut être une réorien-

tation des sites d'attachement de l'ADN sur la bactérie (WEPPNER et LEACH, 1978).

L'attachement s'effectue pratiquement en moins de dix minutes après contact des cellules avec l'ADN (LACKS et GREENBERG, 1976) et l'ADN accroché à l'extérieur est sous forme bicaténaire et encore accessible aux agents externes.

4.2.4.2. Pénétration de l'ADN.

Dès que l'ADN est stablement associé à la cellule réceptrice, les nucléases interviennent et permettent la pénétration de l'ADN dans la cellule-hôte.

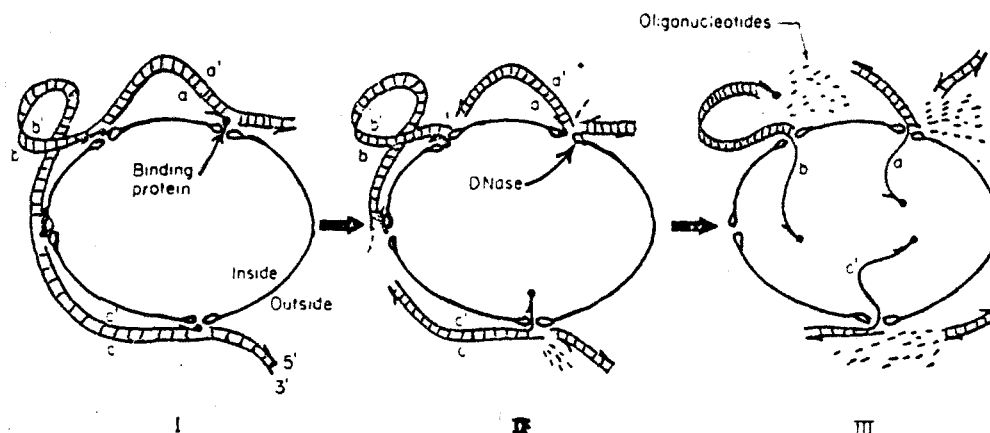
Au niveau où l'ADN est attaché aux protéines d'accrochage (Binding Protein), des coupures ont lieu sur l'un des brins.

La protéine d'accrochage devient alors attachée à l'extrémité 5' de la coupure. Pour initier l'entrée, une désoxyribonucléase membranaire adjacente à la protéine d'accrochage coupe le brin opposé à partir de la coupure d'origine (LACKS et GREENBERG, 1978).

L'entrée commence par passage du brin accroché à la protéine, dans la cellule alors que le brin opposé est coupé et dégradé à l'extérieur en oligonucléotides (LACKS et NEUBERGER, 1975; LACKS, 1979; MULDER et VENEMA, 1982).

Ainsi, l'endonucléase agirait comme une translocase, attaquant et dégradant l'un des brins de l'ADN et facilitant l'entrée du brin complémentaire dans la cellule.

Un modèle moléculaire de l'accrochage et entrée de l'ADN chez *D.pneumoniae* a été proposé par LACKS et GREENBERG (1976).



- I : formation de coupures simple brin au niveau de l'attachement de l'ADN à la protéine d'accrochage
- II : formation de coupures double brin et initiation de l'entrée de l'ADN
- III : entrée de l'ADN catalysée par la DNase membranaire qui dégrade un brin de l'ADN en oligonucléotides tout en conduisant le brin complémentaire dans la cellule.

Fig.6 : Modèle moléculaire des étapes de la transformation chez *D.pneumoniae* (LACKS et GREENBERG, 1976).

Selon ces auteurs, l'endonucléase ferait partie d'un complexe protéique qui traverse la membrane et forme un canal aqueux par lequel le brin d'ADN s'introduit dans la cellule.

Au cours de son transport, l'ADN voit son activité biologique annulée, l'activité transformante des brins uniques étant beaucoup plus faible que celle de l'ADN natif. Cette phase est nommée phase d'éclipse au cours de laquelle le brin donneur est associé aux composés cellulaires pour former une structure appelée complexe d'éclipse.

Ce complexe contient au moins une protéine de PM 19 500 chez *S.pneumoniae* qui synthétisée spécifiquement pendant la compétence, aurait un rôle dans le transport, la protection contre les nucléases ou la promotion de la recombinaison (VIJAYAKUMAR et MORRISON, 1983).

Il semble évident selon ces auteurs que l'ADN associé à ce complexe protéique d'éclipse serait le précurseur de la réaction d'intégration.

La pénétration de l'ADN dans la cellule rencontre différentes barrières, mais le mécanisme n'a jamais encore été décrit.

L'ADN semblerait traverser la membrane externe par l'intermédiaire de "Binding Protein" intervenant dans le transport de substrats dans la cellule.

La traversée du peptidoglycane constituant la paroi serait possible au niveau des sites de croissance de cette structure (DROZANSKA et al, 1982).

Lorsque l'ADN a franchi ces barrières, il se trouve libéré dans le cytoplasme où il va pouvoir se recombinaison avec l'ADN receveur de la cellule-hôte.

4.2.4.3. Recombinaison ADN donneur-receveur.

L'ADN donneur qui a pénétré dans la cellule se trouve sous forme monocaténaire.

Juste après son entrée, ce brin d'ADN donneur forme un complexe instable avec l'ADN receveur où un appariement de bases non covalent s'effectue au départ.

Le complexe se trouve ensuite lié covalentiellement et devient stable (VAN RANDEM et VENEMA, 1981). Cet appariement est impliqué dans les premières étapes de la recombinaison, et une grande homologie est généralement nécessaire pour l'obtention de ce complexe stable.

Des protéines semblent impliquées dans l'ouverture de la double hélice de l'ADN receveur et stabilisent ces régions ouvertes chez *B.subtilis* (VAN RANDEM et al, 1982).

Cette possibilité est intéressante d'autant plus que l'on sait qu'une protéine rec A chez *E.coli* facilite l'appariement de brins uniques

au niveau des régions homologues.

Chez *S.pneumoniae* des mutants capables de transporter l'ADN à l'intérieur de leur cytoplasme mais incapables de l'intégrer dans leur génome ont été obtenus par MORRISON et al, (1983). Ces mutants appelés Rec⁻ sont incapables de conduire à la formation d'hétéroduplex recombinant ADN donneur-receveur.

MEJEAN et CLAVERYS (1984) ont de même étudié l'intégration d'ADN marqué radioactivement dans la région homologue du chromosome chez cette même bactérie. Juste après son entrée, seule une petite partie de l'ADN s'intègre dans le chromosome alors que la plupart du matériel donneur est dégradé en fragments de moins de 2 Kb de long.

Ainsi, la transformation bien qu'apparemment simple dans son principe est un phénomène complexe où de nombreux facteurs interviennent et sont nécessaires à l'intégration et à l'expression de cet ADN donneur dans la cellule-hôte.

MATERIEL ET METHODES

I - LES SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES

1.1. LES SOUCHES DE RHIZOBIUM

1.1.1. Rhizobium meliloti

- La souche $M_5N_1 m_1$ exigeante en isoleucine et en valine ($M_5N_1 Ile^-Val^-$) est utilisée comme souche réceptrice pour la transformation. Elle a été obtenue par l'action de la N- Méthyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (N.T.G.) sur la souche M_5N_1 sauvage.

- La souche $M_5N_1 Ile^+Val^+$ (ILV^+) est un révertant spontané prototrophe de la souche $M_5N_1 Ile^-Val^-$. Les transformations sont réalisées à partir de l'ADN extrait de cette bactérie.

- La souche 444
Elle est utilisée comme témoin négatif lors des tests d'hybridation.

- La souche 2009
Même utilisation que la souche 444.

1.2. LA SOUCHE D'ESCHERICHIA COLI

- La souche CNCM 7624
Elle est utilisée comme témoin négatif lors des tests d'hybridation.

SOUCHES	ORIGINE	ISOLEMENT	PHENOTYPE
R.meliloti			
M_5N_1	U.S.T. Lille 1 Lab.de Microbiologie	M.sativa de Lille	sauvage
M_5N_1	"	"	Ile^-Val^-
444	G. TRUCHET Marseille	non connu	sauvage
2009	P. PICHINOTY R.C.R. (Rothamstet col- lection of Rhizobium)	Non connu	sauvage
E.coli CNCM 7624	Centre National de collections microbiennes		sauvage

TABLEAU 2 : SOUCHES UTILISEES

II - MILIEUX DE CULTURE

2.1. MILIEU RHIZOBIUM COMPLET RC

Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Extrait de levure	1 g
Eau distillée qsp	1 l
pH 7,2 à 7,5	
Stérilisation à 120°C pendant 20 mn	

Le glucose constituant la source de carbone est ajouté à la concentration de 1%. Il peut être remplacé par du mannitol à la même concentration, celui-ci permettant l'expression du caractère de mucosité.

Le milieu additionné d'agar à 15 g/l (RCG) permettra l'isolement, la conservation et les numérations des colonies de *R.meliloti*.

2.2. MILIEU RHIZOBIUM MINIMUM R

MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NH ₄ NO ₃	0,5 g
Eau distillée qsp	1 l
pH 7,2 à 7,5	
Stérilisation à 120°C pendant 20 mn	

Ce milieu peut être utilisé tel quel pour les dilutions ou additionné de glucose à 1%, de biotine à 0,05 µg/ml et de thiamine à 0,01 µg/ml pour les cultures (R Glc H B₁).

Additionné d'agar à 15 g/l, il permettra les numérations des bactéries transformées.

2.3. MILIEU DE COMPETENCE

Ce milieu mis au point pour le développement de la compétence des bactéries réceptrices est utilisé additionné de glucose à 1%, d'extrait de levure à 0,1 % et d'hydrolysate de caséine à 0,1% (COURTOIS, 1982).

2.4. MILIEU SANS PHOSPHATE (M-P).

KNO_3	0,6 g
Na_2SO_4	0,6 g
NH_4SO_4	0,1 g
Eau distillée qsp	1 l
pH 7,2	

Ce milieu est utilisé comme milieu de transformation.

2.5. MILIEU TY

Tryptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Eau distillée qsp	1 l
pH 7,2 à 7,5	

Stérilisation à 120°C pendant 20 mn.

Ce milieu est additionné de CaCl_2 à la concentration de 1,3 g/l

Il est utilisé comme milieu riche pour la culture des souches de *Rhizobium*.

2.6. MILIEU DE LURIA

NaCl	5 g
Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Eau distillée qsp	1 l
pH 7,3 à 7,4	

Ce milieu est utilisé pour les cultures des souches d'E.coli.

2.7. MILIEU DE NICOL ET THORTON

K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4$	0,2 g
NaCl	0,1 g
$FePO_4$	1 g
$Ca_3(PO_4)_2$	2 g
$FeCl_3$	1 ml d'une solution mère à 10 g/l
Eau distillée qsp	1 l
pH 7,2		

Ce milieu est utilisé pour la croissance des plantules de luzerne.

2.8. MILIEU AU BLEU D'ANILINE

K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4$	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrait de levure	1 g
Mannitol	20 g
Bleu d'aniline	0,5 g
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1 l
pH 7		

Ce milieu est utilisé pour mettre en évidence la réaction avec le bleu d'aniline (recherche de mutants non muqueux).

III - TAMPON DE NON PROLIFERATION (TNP)

K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4$	0,2 g
Eau distillée qsp	1 l

Ce tampon est utilisé pour les dilutions, lavages ou cultures en non prolifération ne devant pas contenir d'azote.

IV -- PREPARATION D'ADN TOTAL

4.1. EXTRACTION ET PURIFICATION

L'ADN est extrait à partir de la souche intéressée cultivée en fermenteur en milieu TY, selon la technique au phénol de MIURA (1967).

Cette technique est basée sur une déprotéinisation au phénol pH9 suivie de la précipitation de l'ADN par l'éthanol.

La pureté de l'ADN est appréciée par comparaison de la D.O. à 260 nm et de celles mesurées à 230 nm et 280 nm.

4.2. ESTIMATION DE LA QUANTITE D'ADN OBTENUE

Elle est donnée par la valeur de la densité optique à 260 nm sachant qu'une D.O. de 20 correspond à 1 mg/ml d'ADN.

4.3. PURIFICATION DE L'ADN

L'ADN peut être purifié par gel filtration sur une colonne de séphadex G 50 medium éluee par une solution de NaCl 0,15 M pH7.

Ce fractionnement de l'ADN permet de séparer grossièrement l'ADN "long brin" élué en premier de l'ADN "petit brin".

4.4. CONSERVATION DE L'ADN

L'ADN sera amené à une concentration de 0,1 mg/ml, concentration optimale pour la transformation.

Cette solution sera stérilisée par addition de chloroforme et stockée à 4°C.

Le chloroforme sera éliminé au moment de l'utilisation par centrifugation, puis évaporation de la phase aqueuse à 37°C.

V - TECHNIQUE DE TRANSFORMATION

Cette technique a été mise au point récemment au laboratoire par COURTOIS (1982).

La transformation s'effectue par transfert de l'ADN issu de la souche donnatrice $M_5N_1 Ile^+ Val^+$ de *R. meliloli* vers la souche réceptrice $M_5N_1 Ile^- Val^-$.

5.1. TRAITEMENT DES CELLULES

Les cellules réceptrices sont cultivées en milieu de compétence à 30°C en bain marie agité, puis placées trois heures avant la transformation en culture statique à 30°C.

Les cellules sont alors déformées, ce qui facilite leur compétence.

A ce stade est effectuée une numération (temps T_0) sur milieu R Glc HB₁ contenant de l'isoleucine et de la valine à 1%.

Une centrifugation ménagée en présence de saccharose 2M est effectuée sur 10 ml de culture et le culot est repris par 1,6 ml de milieu M-P. Cette suspension est répartie en deux tubes :

- le premier tube constituant le tube réactionnel,
- le deuxième tube constituant le tube témoin.

5.2. TRANSFORMATION

Chacun des deux tubes est alors traité selon les conditions suivantes :

Tube témoin	Tube réactionnel
- 0,8 ml de suspension cellulaire	- 0,8 ml de suspension cellulaire
+ 0,1 ml de $MgCl_2$ 1 M	+ 0,1 ml de $MgCl_2$ 1 M
	+ 0,5 ml d'ADN donneur
mélanges placés 15 mn à 0°C	
+ 0,1 ml de $CaCl_2$ 0,1 M	+ 0,1 ml de $CaCl_2$ 0,1 M
mélanges placés 15 mn à 0°C	
chaque mélange subit alors une série de chocs thermiques.	

5 mn à 37°C

15 mn à 0°C

5 mn à 37°C

puis est incubé en bain marie statique à 30°C pendant un temps T désiré.

5.3. NUMERATIONS ET CALCUL DE FREQUENCE

Des numérations peuvent être effectuées au cours du temps, ce qui permet d'établir une cinétique de fréquence de transformation.

Pour chaque temps, on effectue :

- Une numération du tube réactionnel sur :
 - . milieu RGlC HB₁ Ile Val donnant le nombre de bactéries viables totales.
 - . milieu RGlC HB₁ donnant le nombre de bactéries ayant acquis le caractère Ile⁺ Val⁺
- Une numération du tube témoin, sur milieu RGlC HB₁ donnant le nombre d'éventuels révertants ou mutants spontanés.
- Un étalement de la solution d'ADN afin de vérifier sa stérilité.

Les fréquences de transformation sont déterminées à partir des valeurs des numérations, le nombre de transformés "vrais" étant le nombre de bactéries ayant acquis le caractère Ile⁺ Val⁺ diminué du nombre de révertants ou mutants spontanés.

Ainsi, la fréquence de transformation F sera déterminée selon de calcul suivant :

$$F = \frac{\text{Nombre de transformés "vrais"}}{\text{Nombre de bactéries totales du mélange de transformation}}$$

VI - ETUDE DES PROPRIETES INFECTIVES

Cette propriété se détecte par l'inoculation des souches à tester à des plantules de luzerne cultivées aseptiquement en milieu de Nicol et Thorton (ALI, 1982).

L'isolement des bactéries de ces nodules est décrit par GRESSHOFF et ROLFE (1978).

VII - TYPAGE PHAGIQUE

Cette méthode permet de visualiser la sensibilité ou la résistance d'une souche aux phages.

0,3 ml d'une culture sont mélangés à 3 ml d'une gélose pour bactériophage de composition suivante :

$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 10 \text{ H}_2\text{O}$	0,45 g
$\text{Na}_2\text{SO}_4, 10 \text{ H}_2\text{O}$	0,06 g
KNO_3	0,06 g
FeCl_3	1 ml à 1%
$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0,06 g
MgCl_2	0,10 g
Mannitol	10 g
Agar	7,5 g
Eau distillée qsp	1 l

Stérilisation à 105°C pendant 30 mn.

Le mélange est étalé sur une boîte contenant du RC mannité et après séchage une goutte de suspension phagique à tester est déposée au centre de la boîte.

Une lyse éventuelle des bactéries par les phages entrainera une plage d'inhibition de croissance.

VIII - LYSE EN ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Cette méthode permet de visualiser rapidement le contenu plasmidique des souches de *Rhizobium* et d'*E.Coli* par lyse douce directe des bactéries placées dans une alvéole d'un gel d'agarose.

Elle dérive de la méthode d'ECKARDT (1978) et permet de mettre en évidence les mégaplasmides de *R.meliloti*.

8.1 . LYSE CELLULAIRE

- Les cultures bactériennes sont effectuées jusqu'en phase exponentielle de croissance (D.O. 0,3 à 0,7) dans le milieu TY ou luria

- l'équivalent de 0,5 ml d'une culture à D.O. 0,3 est placé dans un tube "Eppendorf". Un volume de tampon Tris HCl 50 mM, Na₂ EDTA 20mM, pH8 additionné de sarkosyl à 1% est ajouté dans le tube. Le tout mélangé doucement est placé dans la glace. Ce traitement permet de fragiliser les cellules.

- Chaque tube est centrifugé 4 mn à température ambiante dans une centrifugeuse de type Eppendorf. Le surnageant est aussitôt éliminé à l'aide d'une seringue.

- le culot cellulaire est remis en suspension par 60 μ l de tampon d'électrophorèse Tris 89 mM, Na₂ EDTA 2,5 mM, B(OH)₃ 89 mM, pH8,3 contenant du saccharose à 25%, 1 unité de ribonucléase A/ml et 1 mg/ml de lysozyme.

- la suspension est homogénéisée au moyen d'un agitateur "Vortex". Elle est immédiatement déposée dans une alvéole d'un gel vertical à 1% coulé entre deux plaques de verre espacées de 3 mm (Cuve Biorad Proteam cell).

- 90 μ l de tampon d'électrophorèse contenant 1% de SDS, 0,4% d'agarose et 0,05% de bleu de bromophénol sont ajoutés au-dessus du dépôt. Le SDS provoquera la lyse des sphéroplastés.

8.2. MIGRATION ELECTROPHORETIQUE

La migration s'effectue dans du tampon d'électrophorèse sous l'effet d'un champ électrique tout d'abord faible (45 mn à 30 V), puis plus important (1H 30 mn à 130 V). Les molécules plasmidiques vont alors pénétrer puis migrer dans le gel.

8.3. VISUALISATION DES BANDES PLASMIDIQUES

Elle s'effectue pas trempage du gel dans un bain de bromure d'éthidium ((Br Et) à $1 \mu\text{g/ml}$ pendant 30 mn. La fluorescence des bandes est visualisée sur un transilluminateur en UV.

IX - PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE

Nous avons utilisé la méthode de préparation par lyse alcaline décrite par JOUANIN et al (1981) dérivée de la méthode de CURRIER et NESTER (1976).

Cette technique permet la préparation des plasmides de taille importante tel le plasmide moyen de *R.meliloti* M_5N_1 dont le poids moléculaire est de 90 Md.

9.1. LYSE ET EXTRACTION

Les bactéries sont cultivées jusqu'en phase stationnaire de croissance, puis lavées par 85 ml de tampon TE (Tris HCl 50 mM, Na_2EDTA 20 mM pH8) pour 1,5 g de cellules.

- la lyse s'effectue en présence de 5 ml de SDS à 20% et de 10 ml de pronase à 5 mg/ml pendant 20 mn à 37°C.

- Le pH est alors réajusté à $12,45 \pm 0,05$ à l'aide d'une solution de NaOH 3N.

- l'addition de 20 ml de tampon Tris HCl pH7 permet de revenir à pH 8,5.

- la suspension est alors laissée 15 mn à 0°C, puis

est additionnée d'une solution de NaCl 5M, afin d'obtenir une concentration finale de 1M. Cela va permettre la précipitation sélective de L'ADN chromosomique et des débris cellulaires. Ce mélange est laissé 1H à 0°C.

- Les protéines et agrégats d'ADN chromosomique sont éliminés par centrifugation (10 mn à 15000 g).

- le surnageant est additionné de polyéthylène glycol 6000 (PEG) à 50% à une concentration de 10%. Une nuit à 0°C va permettre la précipitation des molécules d'ADN plasmidique.

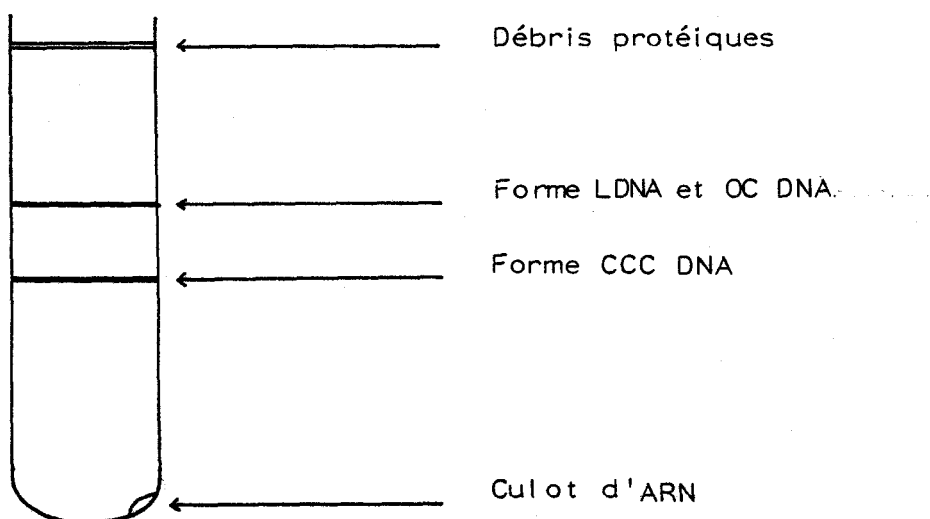
- le précipité est récupéré par centrifugation à basse vitesse (20 mn à 2000 g) puis dissout dans du tampon TE.

9.2. PURIFICATION DE L'ADN PLASMIDIQUE EN GRADIENT DE CsCl/BrEt

9.2.1. Principe

L'ADN plasmidique est purifié par centrifugation dans un gradient de chlorure de césium-bromure d'éthidium.

Le BrEt diminuant la densité de l'ADN, les molécules plasmidiques sous forme superhélicoïdale seront donc plus denses que les molécules linéaires ou circulaires ouvertes et se placeront donc dans la zone concentrée du gradient de chlorure de césium, c'est-à-dire en une bande inférieure visualisée par fluorescence en UV :



9.2.2. Protocole expérimental

- Le culot plasmidique dissout dans le tampon TE est complété par :

CsCl	9,6 g
N Lauryl sarcosinate de sodium		
à 5%	0,3 ml
TE	qsp11,7 ml

Une précentrifugation effectuée dans un rotor 60 Ti 20 mn à 40000 g permettra d'éliminer le maximum de débris protéiques.

La solution purifiée sera additionnée de 0,3 ml d'une solution de BrEt à 10 mg/ml dans du tampon TE, puis centrifugée 48 H à 42000 rpm à 20°C dans un rotor 50 Ti.

- La bande plasmidique visualisée en UV est prélevée à la pipette automatique avec un embout coupé.

- Le bromure d'éthidium est éliminé par adjonction plusieurs fois d'un volume d'isopropanol saturé en CsCl-TE. Une absence de fluorescence en UV de la phase aqueuse indique l'élimination totale du BrEt.

- Les molécules plasmidiques récupérées de cette phase complétée par du tampon TE' (Tris HCl 50 mM, Na₂EDTA 0,5 mM, pH8) sont culotées par centrifugation à 150 000 g pendant 16 H à 20°C dans un rotor 50 Ti.

- Le petit culot d'ADN plasmidique est dissout délicatement dans 100 µl de tampon. Le tampon utilisé sera fonction des manipulations ultérieures.

X - ELECTROPHORESE HORIZONTALE EN GEL D'AGAROSE

10.1.Principe

Cette technique permet de séparer et d'identifier les molécules d'ADN. La migration des molécules d'ADN chargées négativement

grâce à leurs groupements phosphates s'effectue dans un gel d'agarose traversé par un champ électrique.

La vitesse de migration dépend de la masse moléculaire des particules et de leur conformation. Elle est inversement proportionnelle au logarithme décimal de leur masse moléculaire, ce qui permet d'établir une relation :

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

M.R. = Migration relative mesurée sur le gel

M.M. = Masse moléculaire d'une molécule

A et B = Constantes caractéristiques de l'électrophorèse

Cette méthode permettra de visualiser d'une part, les différentes formes d'une molécule plasmidique (CCC DNA, OC DNA, L DNA) et d'autre part, de comparer les poids moléculaires des molécules plasmidiques de même configuration spatiale.

La forme circulaire ouverte des plasmides de PM supérieur à 30 Md reste au niveau du dépôt, ne pouvant pénétrer dans le gel.

La forme superhélicoïdale migre moins vite que la forme linéaire pour des gels de 0,8 à 1,2% en agarose, mais cela est inversé pour des gels de 0,4 à 0,6%.

10.2. Protocole

Pour visualiser les différentes formes de l'ADN plasmidique purifié ou pour comparer son profil de digestion enzymatique, il est préférable d'utiliser l'électrophorèse en gel d'agarose horizontal (plaque Biorad électrophorèse cell 1415).

La solution plasmidique à tester est additionnée de tampon d'électrophorèse contenant du saccharose à 5% et du bleu de bromophénol à 1%.

Le dépôt s'effectue dans l'alvéole du gel recouvert de tampon d'électrophorèse.

La migration s'effectue directement à 130 V pendant 2 à 4H suivant la concentration du gel et le type de manipulation.

La visualisation s'effectue par trempage du gel dans un bain de BrEt à 1 µg/ml pendant 30 mn.

XI - LES ENZYMES DE RESTRICTION

11.1. Principe

Les bactéries possèdent des systèmes de restriction et de modification qui permettent la préservation de la spécificité génétique des espèces.

On nomme endonucléase de restriction ou enzyme de restriction, une enzyme capable de dégrader de façon spécifique tout ADN étranger. La protection de l'ADN de l'hôte contre ses propres enzymes de restriction est réalisée par une modification qui consiste en une méthylation de certaines bases particulières qui sont précisément celles qui interviennent dans les séquences de reconnaissance de l'enzyme de restriction elle-même. Cela protège l'information endogène de l'activité des enzymes de restriction de la cellule.

Les endonucléases de restriction ont donc pour sites de reconnaissance des séquences spécifiques de bases sur l'ADN bicaténaire. Elles coupent (c'est la restriction) à proximité ou au niveau même de ces sites de reconnaissance lorsque cet ADN n'est pas méthylé (modification).

Ces endonucléases sont classées en trois groupes différents :

- type I et type III ayant une activité de restriction et de modification
- type II n'ayant qu'une activité de restriction.

a) les enzymes de type I :

Elles ont leur site de coupure éloigné de leur site de reconnaissance et coupe plus ou moins au hasard.

b) les enzymes de type III

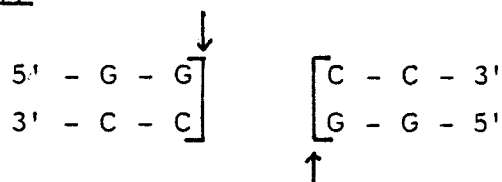
Elles coupent à l'extérieur ou dans leur site de reconnaissance, mais

les deux extrémités complémentaires produites par coupures décalées ne sont spécifiques que d'un site de reconnaissance donné. Une extrémité donnée n'aura pratiquement comme homologue que celle qui se trouvait en face avant la coupure.

- C) Ce sont pratiquement les seules enzymes de restriction utilisées en génétique. Elles reconnaissent l'ADN en des sites particuliers soit dans leurs sites de reconnaissance ou à proximité immédiate d'eux.

Le site de coupure peut correspondre à l'axe de symétrie des deux brins de l'ADN, ce qui aboutit à une coupure franche donnant naissance à des "bouts francs".

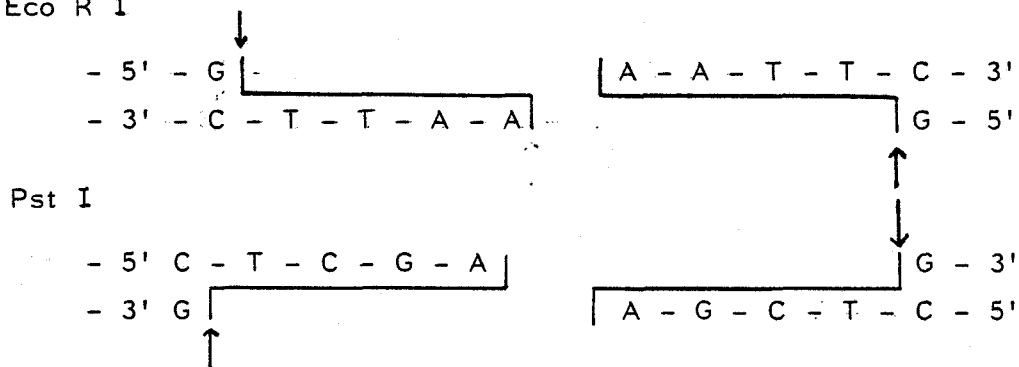
ex : Enzyme Hae III



Lorsque le site de coupure est décalé de part et d'autre de l'axe de symétrie, la coupure est dite cohésive produisant des extrémités cohésives se terminant soit en 5' (Eco RI), soit en 3' (Pst I).

Les extrémités cohésives ont la particularité de pouvoir se réassocier par liaisons hydrogène entre les bases libres ainsi démasquées.

ex : Eco R I



Ces enzymes sont fréquemment utilisées en biologie moléculaire, leur site d'action étant parfaitement connu.

La ligation d'extrémités cohésives produites après digestion des enzymes de restriction permet d'associer les molécules d'ADN d'origine différente. Cette technique est très utilisée dans les expériences de clonage.

11.2. Protocole

Chaque endonucléase de restriction nécessite une condition particulière d'emploi. Pour chaque réaction, il faut donc des tampons de réaction et de dilution de compositions variables et des températures d'incubation spécifiques.

Toutes ces conditions sont données par une fiche technique du fabricant, accompagnant l'enzyme.

Les digestions enzymatiques sont réalisées dans un tube "Eppendorf" stérile sur 0,5 à 1 µg d'ADN pour 1 U. d'enzyme dans un volume final de 20 à 50 µl de tampon de réaction correspondant à l'enzyme. Ces conditions doivent être établies dans chaque cas pour avoir un bon rapport Enzyme-Substrat.

La réaction enzymatique peut être stoppée par une température élevée (65°C) mais généralement, l'arrêt de la réaction s'effectue par addition d'un tampon d'arrêt contenant de l'urée à 4 mole/l, du sucrose à 50%, de l'EDTA, Na₂ 50mM pH7 et du bleu de bromophénol à 0,1% qui permettra de visualiser la migration électrophorétique ultérieure.

Après arrêt de la réaction, le mélange d'incubation est déposé sur un gel d'agarose horizontal et la migration s'effectue pendant 2 à 4H sous tension de 130 V.

Les différents fragments d'ADN obtenus peuvent être comparés à des fragments issus de la digestion enzymatique de l'ADN du phage dont les poids moléculaires sont connus.

Pour nos études, nous avons utilisé quelques unes des endonucléases de la collection :

Enzyme	Origine	Fabricant
Sma I	<i>Serratia marcescens</i> Sb	Boehringer
Xba I	<i>Xanthomonas badrii</i>	"
Kpn I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	"
Hind III	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	"
Bgl II	<i>Bacillus globigii</i>	"

XII - MARQUAGE D'ADN IN VITRO

12.1. MARQUAGE

Les molécules d'ADN peuvent être marquées radioactivement in vitro afin d'être utilisées comme sonde dans les techniques d'hybridation.

La manipulation s'effectue au moyen d'un kit préparé par les laboratoires BRL (Bethesda Research laboratories) qui fournissent le protocole expérimental.

Le marqueur utilisé est le ^{35}S ATP fourni par NEN (New England Nuclear).

Le marquage s'effectue en incubant 1H à 15°C :

- 1 μg d'ADN à marquer
- 6 μl de ^{35}S ATP soit 60 μCi
- 5 μl de tampon Tris HCl 500 mM pH7,8, MgCl_2 50 mM, 2' mercaptoéthanol 100 mM, sérum albumine bovine 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ contenant les trois autres déoxyribonucléotides froids : CTP, GTP, TTP à 0,2 mM.
- 5 μl d'une solution composée de :
0,4 U/ μl de DNA polymérase I
40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de DNase I

dans un tampon Tris HCl 50 mM pH7,5, acétate de magnésium 5 mM, 2' mercaptoéthanol 1 mM, PMSF 0,1 mM, glycérol 50%, Sérum albumine bovine 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

- Eau distillée qsp 45 μl

Le marquage est stoppé par addition de 5 μl de solution d'arrêt composé de Na_2EDTA 300 mM pH8.

12.2. COMPTAGE

Afin de vérifier la bonne incorporation du ^{35}S ATP, le comptage s'effectue en mélangeant :

- 1 μl du mélange d'incubation
- 1 ml d'une solution d'ADN de sperme de hareng à 1 mg/ml
- 1,1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20%.

Ce mélange placé 1H à 0°C est ensuite filtré sur filtre whatman GF/C. Le filtre est rincé par du TCA à 5%, puis par un mélange volume-volume d'éthanol-éther.

Le comptage s'effectue au moyen d'un compteur à scintillation Beckman LS 2000 dans un liquide scintillant Beckman HP.

Pour que le marquage soit correct, il faut que l'incorporation de ^{35}S ATP corresponde à environ 10^7 d.p.m. par microgramme d'ADN.

12.3. SEPARATION DE L'ADN MARQUE DES BASES NUCLEOTIDIQUES

Le mélange d'incubation ayant servi au marquage est additionné d'un demi-volume d'acétate d'ammonium à 7,5 M et de deux volumes d'éthanol glacé (à - 20°C).

Après une nuit à -20°C, l'ADN précipité est récupéré par centrifugation puis repris dans le tampon utilisé pour la suite des manipulations.

XIII - TRANSFERT ET HYBRIDATION D'ADN

La méthode de transfert utilisée pour les tests d'hybridation est une méthode mise au point par les laboratoires NEN utilisant les membranes "Gene Screen".

Il s'agit de la méthode de WAHL et al (1979) dont le transfert est basé sur la méthode traditionnelle de SOUTHERN (1975) par passage de l'ADN du gel sur la membrane par capillarité.

13.1. TRANSFERT

- le gel d'agarose après migration électrophorétique et révélation par le BrEt est placé 10 mn sous lumière UV afin de dénaturer l'ADN incorporé.

- Il est alors placé dans un bain d'HCl 0,25 N pendant 15 mn en légère agitation à température ambiante. L'acide étant rejeté

l'opération est répétée une fois.

- Après un bref lavage à l'eau distillée, le gel est alors agité doucement dans un bain contenant une solution de NaOH 0,2 N, NaCl 0,6 M pendant 30 mn.

- Il est ensuite lavé trois fois dans du tampon phosphate $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,025 M pH6,5 pendant une heure sous légère agitation.

- La membrane gene screen adaptée aux dimensions du gel est agitée 15 mn dans du tampon phosphate pH6,5.

- le transfert s'effectue alors de manière suivante :

. Le gel est placé sur deux feuilles de papier filtre Whatman 3M déposées sur une plaque de verre. Le papier filtre est en contact par ses extrémités avec le tampon phosphate assurant ainsi un transfert du tampon au travers du gel vers la membrane placée sur celui-ci.

. Cinq feuilles de papier Whatman 3M de même taille que le gel et la membrane sont placées au-dessus.

. plusieurs couches de papier absorbant vont ensuite recouvrir le tout, bien maintenues par un poids.

. Ce montage peut être schématisé ainsi :

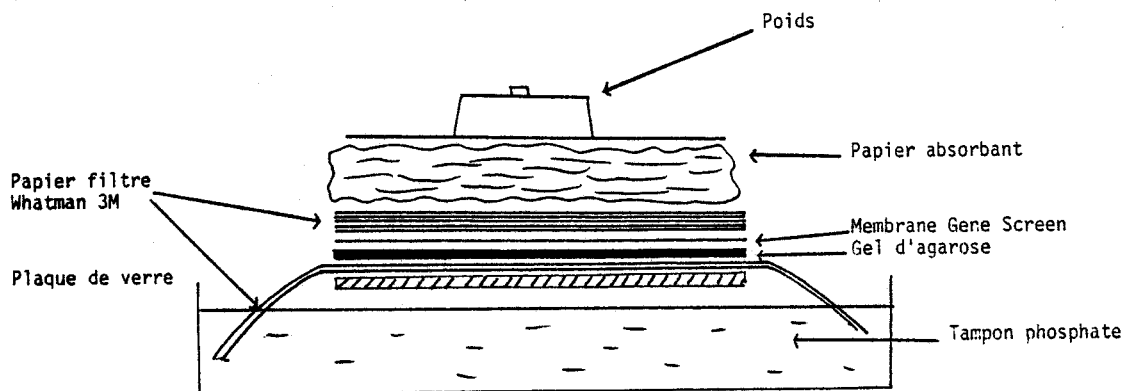


Fig 7 : SCHEMA DU MONTAGE PERMETTANT LE TRANSFERT POUR L'HYBRIDATION.

- Le transfert s'effectue pendant 12 H en changeant fréquemment le papier absorbant.

- Après transfert, la membrane est retirée, lavée par du tampon phosphate afin d'enlever l'agarose résiduel, séchée à température ambiante puis chauffée de 2 à 4 H à 80 - 100°C.

13.2. PRE-HYBRIDATION

La membrane est traitée d'abord par 10 ml du mélange suivant :

Formamide déionisée	50 %
Polyvinylpyrrolidone (PM 40000)	0,2%
Sérum albumine bovine	0,2%
Ficoll (PM 400 000)	0,2%
Tris HCl pH7,5	0,05 M
NaCl	1 M
Pyrophosphate de sodium	0,1%
Sodium dodecyl sulfate	0,1%
Sulfate de dextran	10 %

additionné d'ADN de sperme de hareng dénaturé à concentration supérieure ou égale à 100 µg/ml.

Cette solution est ajoutée dans un sac en plastique contenant la membrane qui sera scellé . L'incubation s'effectue 6H à 42°C sous agitation constante.

13.3. HYBRIDATION

2 à 3 ml de la solution suivante sont ajoutés dans le sac plastique :

Formamide	50 %
Polyvinylpyrrolidone (PM 40000).....	0,2%
Sérum albumine bovine	0,2%
Ficoll (PM 400 000)	0,2%
Tris HCl pH7,5.....	0,05 M
Pyrophosphate de sodium	0,1%
Sodium dodecyl sulfate	0,1%
additionné d'ADN de sperme de hareng (>100 µg/ml)	

dénaturé et de la sonde radioactive utilisée dénaturée par la chaleur (10 mn à 100°C, puis 5 mn à 0°C) à une concentration inférieure ou égale à 10 ng/ml.

Le sac scellé est incubé à 42°C pendant 16 H à 24 H sous légère agitation.

La membrane est alors lavée par :

- 2 fois 100 ml de tampon NaCl 0,3 M, Tris HCl 0,06 M pH8, EDTA Na₂ 0,002 M à température ambiante sous agitation constante pendant 5 mn.
- 2 fois 100 ml du même tampon additionné de SDS à 0,5%, à 60°C sous légère agitation pendant 30 mn.
- 2 fois 100 ml de tampon Tris base 0,03 M à température ambiante sous agitation constante pendant 30 mn.

La membrane est séchée, puis mise au contact d'un film autoradiographique Kodack X-Amat A₁L pendant 4 à 5 jours à -70°C.

13.4. REVELATION DU FILM AUTORADIOGRAPHIQUE

Le développement s'effectue par trempage du film dans un bain de révélateur L X 24 pendant 5 mn.

Après un lavage de 30 secondes sous l'eau courante, la fixation s'effectue par trempage dans un bain de fixateur AL₄ pendant 2 à 4 mn, sous légère agitation de 5 secondes toutes les 30 secondes.

Le film est rincé à l'eau courante pendant 5 mn, puis séché.

XIV - HYBRIDATION SUR COLONIES

Nous avons utilisé une technique d'hybridation basée sur celles décrites par GRUNSTEIN et HOGNESS (1975) et par MASS (1983), modifiées par BECHET et ALI (comm.pers.).

Cette technique permet l'hybridation d'une sonde avec l'ADN total d'une colonie bactérienne cultivée sur une membrane.

14.1. PREPARATION DE LA MEMBRANE

- La membrane "Gene Screen" adaptée à la dimension d'une boîte de pétri est lavée trois fois 1 mn dans de l'eau distillée bouillante, séchée et stérilisée 30 mn à 105°C.

- Des spots à partir des colonies à tester sont effectués sur cette membrane déposée sur un milieu riche TY gélosé contenu dans une boîte de pétri.

- Une incubation à 30°C est effectuée jusqu'à l'obtention de belles colonies sur la membrane (2 mm).

- La membrane est placée dans une boîte de pétri en pyrex contenant du papier Whatman 3M (qui permettra la diffusion des différents tampons au travers des colonies).

- Elle est alors traitée par 15 ml de chaque tampon suivant :
 - . NaOH 0,5 N, NaCl 1,5M en chauffant par de la vapeur d'eau bouillante pendant 6 mn jusqu'à absorption complète du tampon.
 - . NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M pendant 2 mn à température ambiante
 - . Tris HCl 1M pH7,4 pendant 8 mn à température ambiante.
 - . Séchage sous vide dans un dessiccateur pendant 20 mn, jusqu'à ce que les colonies prennent un aspect desséché.
 - . SSC 1M (NaCl 0,15 M, citrate de sodium 0,015 M pH7) contenant 1 mg/ml de protéinase K : incubation 1 H à 37°C

La membrane est alors lavée par 20 ml des solutions suivantes :

- Ethanol à 25% : 1 fois
- Chloroforme : 5 fois
- NaCl 0,3 M : simple trempage pour éliminer les débris cellulaires.

La membrane est ensuite séchée à température ambiante.

14.2. HYBRIDATION ET REVELATION

Le protocole expérimental est le même que celui décrit

précédemment pour les hybridations issues d'un transfert de gel selon la technique décrite par N.E.N.

RESULTATS

I - TRANSFORMATION

La technique de transformation chez *R. meliloti* mise au point récemment au Laboratoire (COURTOIS, 1982) a été étudiée en particulier sur la souche $M_5N_1 Ile^-Val^-$. Cette technique permet le transfert du caractère d'auxotrophie $Ile^+ Val^+$ (ILV^+) à cette souche à une fréquence d'au moins 100 à 1000 fois supérieure au taux de réversion.

Les clones transformés obtenus sont morphologiquement différents de la souche auxotrophe d'origine.

Nos travaux se sont alors portés sur l'étude de ces cellules et sur la détermination d'éventuelles modifications survenues après ce transfert.

1.1. Transformation et fréquences

La souche réceptrice *R. meliloti* $M_5N_1 Ile^-Val^-$ après avoir été amenée à l'état de compétence est transformée par addition d'ADN donneur. Cet ADN est extrait de la souche prototrophe révertante $M_5N_1 ILV^+$ par la méthode au phénol de MIURA (1967) et a pu être utilisé tel quel ou après gel filtration, ce qui permet l'obtention de fragments longs brins séparés grossièrement des brins courts.

Diverses transformations ont ainsi été réalisées. La fréquence optimale obtenue lors de la transformation par de l'ADN filtré a pu atteindre $1,7 \cdot 10^{-6}$ après deux heures d'incubation alors qu'une fréquence maximale de $3,9 \cdot 10^{-5}$ a été obtenue lors de la transformation par de l'ADN brut.

Ces fréquences reprises dans le Tableau 3 sont nettement supérieures au taux de réversion ou de mutation spontanée pour le caractère d'auxotrophie $Ile^+ Val^+$ inférieur au minimum à 10^{-8} (calculé à l'aide d'un témoin).

	Nombre de bactéries par ml	Fréquence de transformation maximale obtenue
Transformation utilisant l'ADN filtré	$1,6 \cdot 10^8$ /ml	$1,7 \cdot 10^{-6}$
Transformation utilisant l'ADN brut	$1 \cdot 10^7$ /ml	$3,9 \cdot 10^{-5}$

TABEAU 3

: ETUDE DE LA FREQUENCE DE TRANSFORMATION DE LA SOUCHE
 $M_{5N_1}^{+} e^{-Val}$ -DE R.MELILOTI SELON LE CARACTERE D'AUXOTROPHIE
 ILV^{+}



1.2. Sélection des clones transformés.

- La première série de transformations effectuées avec de l'ADN filtré nous a permis d'obtenir des clones donnant tous de très petites colonies translucides sur le milieu minimum R Glc HB₁ gélosé.

Ces clones repiqués sur milieu riche RC mannité favorisant l'expression du caractère muqueux ont donné de très petites colonies non muqueuses, morphologiquement différentes des colonies de la souche d'origine auxotrophe muqueuse sur ce milieu (Photos 1 et 2).

Ces clones issus de trois transformations successives ont été numérotés arbitrairement. :

Clones 1,2,3,4 : issus d'une première transformation
 Clones 5,6,7 : issus d'une deuxième transformation
 Clones 8 et 9 : issus d'une troisième transformation

- Nous avons alors effectué des transformations en utilisant la solution d'ADN brute non filtrée après extraction.

Nous avons alors sélectionné 14 clones donnant tous sur milieu RGlC HB₁ de très petites colonies translucides mais donnant après isolement sur milieu RC mannité soit :

. de très petites colonies : clones A,B,C,D,E,F,G,I,M,N
 non muqueuses
 . de grosses colonies : clones H,J,K,L
 muqueuses

- tous ces clones repris dans le milieu de compétence et cultivés à 30°C sous agitation ont été examinés en microscopie optique.

Nous avons pu alors observer que leur morphologie était remarquablement modifiée par rapport à la souche initiale allant de petites cellules allongées, de cellules ramifiées jusqu'à l'obtention de "formes filamenteuses" (Photo 3).

Cette aptitude qu'ont les cellules à se déformer disparaît après repiquage des clones en milieu complet RC ainsi qu'en milieu de



PHOTO 1 :
ASPECT DE LA SOUCHE M₅N₁
SUR MILIEU RC MANNITE
A 1%

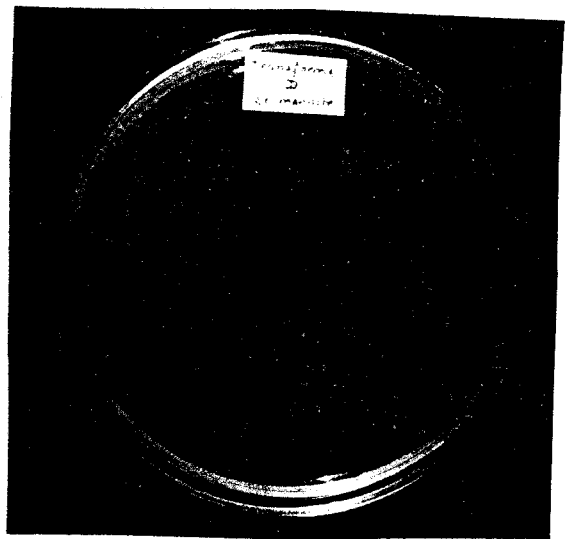


PHOTO 2 :
ASPECT D'UN CLONE TRANSFORME
SUR MILIEU RC MANNITE A 1%

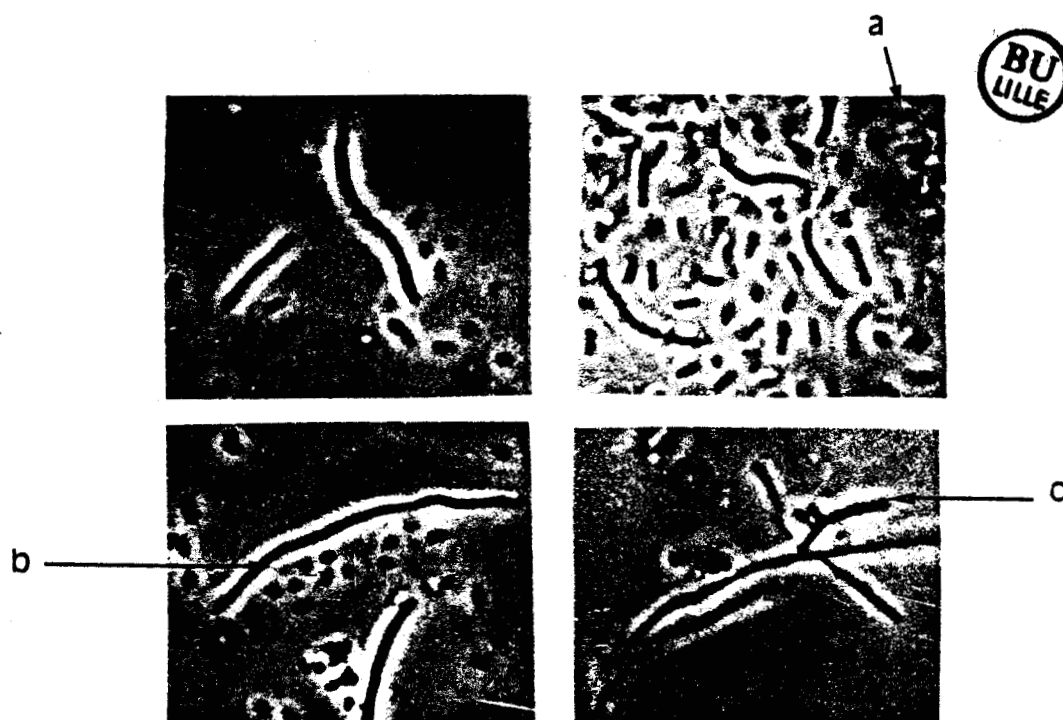


PHOTO 3 : ASPECT DES CLONES TRANSFORMES CULTIVES
EN MILIEU DE COMPETENCE APRES LA
SELECTION.

a : Cellule normale

b : Cellule très allongée ("filamenteuse")

c : Cellule branchée

compétence. il est cependant à noter que pour les clones non muqueux, ce caractère (non muqueux) reste stable au fur et à mesure des repiquages alors que les clones qui étaient très muqueux lors de la sélection expriment moins ce caractère au cours des repiquages successifs.

Ces grandes modifications morphologiques des cellules transformées nous ont conduit à poursuivre l'étude de ces clones afin de savoir à quoi cela était dû.

1.3. Etude physiologique des clones transformés.

1.3.1 Etude morphologique.

Les différents clones transformés obtenus correspondent :

- Pour la majorité des cas à de petites colonies non muqueuses sur milieu RC gélosé mannité.

Clones 1,2,3,4,5,6,7,8,9

Clones A,B,C,D,E,F,G,I,M,N

- Pour quelques cas à des colonies muqueuses sur ce même milieu : clones H,J,K,L.

Cependant ce caractère s'exprime moins bien au cours du temps pour donner des colonies très peu muqueuses (légèrement plus que les premières).

Tous ces clones se développent normalement en milieu RC et TY (milieu très riche) mais se développent assez lentement en milieu minimum Rglc HB₁.

Pour favoriser les études ultérieures, seuls les clones A non muqueux et J muqueux ont été sélectionnés parmi ceux issus de la dernière transformation.

1.3.2. Etude du caractère muqueux.

Cette différence de caractère muqueux obtenue en milieu RC gélosé mannité nous a conduit à effectuer tout d'abord un test rapide.

Le bleu d'aniline formant avec la liaison β -glucosidique 1 \rightarrow 3, un complexe, conduit à l'obtention d'une coloration bleu nuit, ce qui permet de sélectionner sur milieu gélosé contenant ce composé, des mutants non muqueux de *R.meliloti*.

Nous avons testé sur ce milieu les clones transformés et vérifié que la souche auxotrophe donne une réaction positive bleu nuit avec le bleu d'aniline ainsi que les clones transformés légèrement muqueux (ex. clone J) alors que les clones transformés non muqueux (ex. clone A) donnent une réaction négative soit aucune coloration. (Photo 4).

De même un dosage effectué lors de précédents travaux (LEPREVOST, 1982) selon la méthode radiochimique de COURTOIS et al (1982), nous a permis de constater que les cellules transformées synthétisent beaucoup moins d'exopolysaccharides que la souche de départ.

1.3.3. Infectivité.

L'infectivité des plantules de luzerne étant la propriété caractéristique de *R meliloti*, nous avons comparé les propriétés infectieuses des clones transformés 1,2,3,4,5,6,7,8,9, A et J à celles de la souche d'origine. Pour cela, nous les avons inoculés à de jeunes plantules de luzerne aseptiques.

L'apparition des nodules sur la racine des plantules infectées par les clones transformés a été beaucoup plus tardive comparativement à la souche M_5N_1 et n'a pas été observée pour la totalité des clones testés. Ces résultats sont repris dans le tableau 4.

Le plupart des clones testés ont donc gardé leur propriété infectieuse, bien que celle-ci soit très lente à apparaître et que la fréquence de nodulation soit beaucoup plus faible que celle obtenue par la souche d'origine.

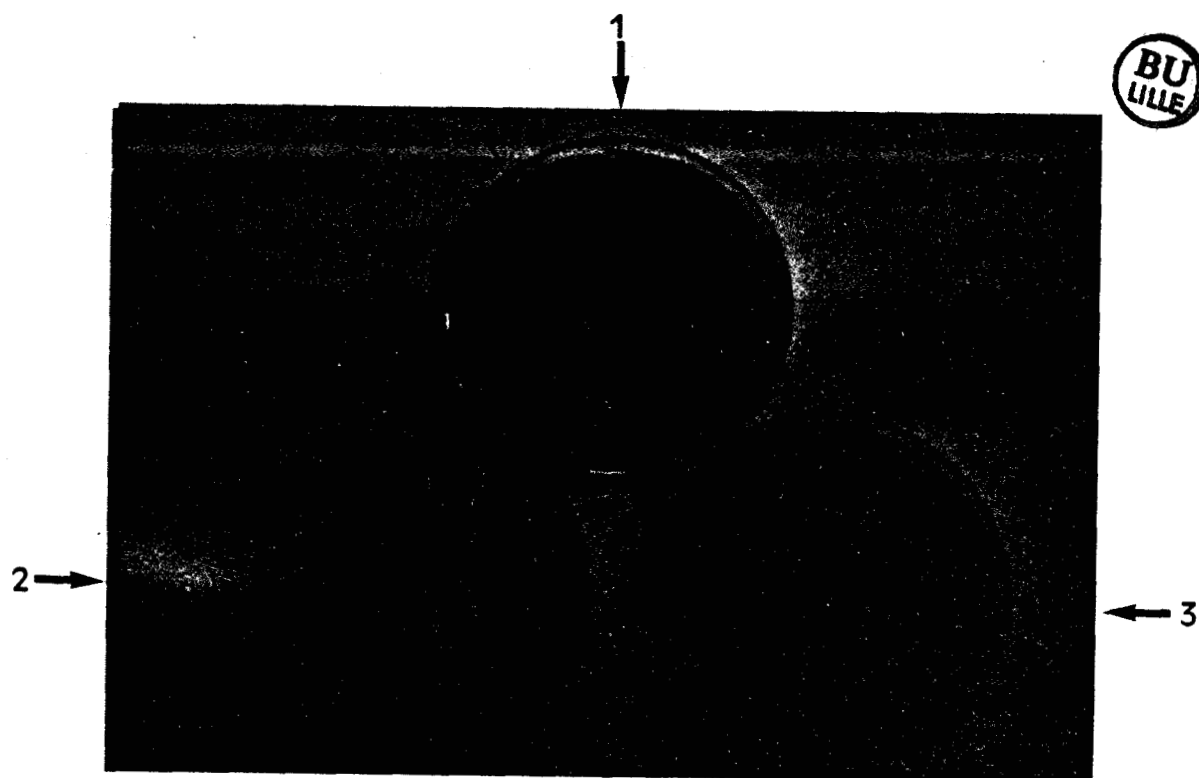


PHOTO 4 : CULTURE SUR MILIEU AU BLEU D'ANILINE DE LA SOUCHE $M_{51}^{N_{116}}$ Val (1), DU CLONE TRANSFORME A (2) ET DU CLONE TRANSFORME J (3).

TEMOIN		CLONES TRANSFORMES										
Clones	M ₅ N ₁ Ile ⁻ Val ⁻	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	J
Nodulation	+++	+	++	+	+	-	++	-	+	+	+	+

TABLEAU 4 : TEST D'INFECTIVITE DES SOUCHES M₅N₁ Ile⁻Val⁻ ET DES CLONES TRANSFORMES.

- +++ : Nodulation positive à 100%
- ++ : Nodulation positive < 100% mais > 10%
- + : Nodulation positive < 10%
- : Nodulation négative



1.3.4. Typage phagique.

La sensibilité à certains phages déterminés étant spécifique pour chaque espèce bactérienne, un typage phagique a pu être utilisé comme test pour prouver l'origine des clones transformés.

Nous avons donc utilisé quelques phages spécifiques de la souche M₅N₁ de *R.meliloti* sélectionnés à partir de la collection du Laboratoire : Ψ_{16} , Ψ_{19} , Ψ_{20} et Ψ_{21} .

Ces résultats sont repris dans le Tableau 5.

Nous avons ainsi observé une perte plus ou moins partielle de la sensibilité aux phages pour les clones transformés. Il est à noter que lorsque celle-ci est positive les plages de lyse obtenue sont beaucoup plus petites que celles obtenues pour la souche parentale.

Toutes les transformations réalisées ont abouti à l'obtention des clones transformés ayant subi d'importantes modifications morphologiques, biologiques et biochimiques.

L'expression de ces caractères étant le reflet de l'information génétique, nous avons cherché à déterminer si des modifications du génome n'étaient pas apparues.

II - MODIFICATIONS GENETIQUES SURVENUES LORS DE LA TRANSFORMATION.

2.1. Etude du contenu plasmidique.

L'étude bibliographique des bactéries du genre *Rhizobium* montre que ces bactéries sont caractérisées par la présence de plasmides. L'espèce *R.meliloti* en particulier est caractérisée par l'existence de grands plasmides.

Nous avons ainsi voulu comparer le contenu plasmidique des clones transformés à celui de la souche d'origine.

Nous avons donc au préalable effectué un screening de ces clones par la méthode d'électrophorèse par lyse directe sur gel d'agarose,

Clones	TEMoin	CLONES TRANSFORMES											
	M_5N_1 Ile ⁻ Val ⁻	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	J	
ψ 16	+++	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	
ψ 19	+++	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	
ψ 20	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
ψ 21	+++	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	

TABLEAU 5. : TEST DE SENSIBILITE AUX PHAGES ψ16, ψ19, ψ20, ψ21,
POUR LA SOUCHE M_5N_1 Ile⁻Val⁻ ET LES CLONES TRANSFORMES



- +++ : Sensibilité donnant une très grande plage de lyse
- + : Sensibilité légèrement positive donnant une petite plage de lyse
- : Sensibilité négative : aucune plage de lyse

(ECKHARDT, 1978). Cette méthode permet par migration électrophorétique de séparer les bandes plasmidiques en fonction de leur poids moléculaire.

Cette technique permet de voir que la souche M_5N_1 Ile⁻Val⁻ de *R.meliloti* possède effectivement deux plasmides : un plasmide géant, le mégaplasmide (1000 Md) et un plasmide moyen (90 Md) (CASSE et al, 1979).

Les résultats obtenus avec les clones transformés ont conduit à les séparer en deux groupes (Tableau 6)

- D'une part chez les clones transformés issus des trois premières transformations (clones 1 à 9), nous n'avons jamais pu mettre en évidence de plasmides qu'il s'agisse du mégaplasmide ou du plasmide moyen, (Photo 5).

- D'autre part, en ce qui concerne les clones issus de la dernière transformation (clones A à N), tous ont présenté un petit plasmide d'environ 30 Md, beaucoup plus petit que le plasmide moyen (90 Md), alors que tous semblent avoir perdu les plasmides de la souche M_5N_1 non transformée, (Photos 6 et 7).

Il est à noter que des "trainées" d'ADN ont pu être visualisées au cours des migrations électrophorétiques réalisées à partir des clones A,B,C,D,E,F,G,I,M,N correspondant aux clones non muqueux alors que ces "trainées" sont toujours absentes pour les clones H,J,K,L.

La souche M_5N_1 de *R.meliloti* a donc lors de la transformation soit perdu son contenu plasmidique totalement (clones 1 à 9) ou soit subi de profonds remaniements de ces éléments extrachromosomiques (clones A à N). Nous avons alors poursuivi l'étude génétique de ces clones transformés.

Nous avons donc effectué l'extraction des petits plasmides des clones A et J selon la technique de lyse alcaline (JOUANIN et al, 1981), ce qui nous a permis de les étudier comparativement aux plasmides de la souche M_5N_1 de *R.meliloti*.

2.2. Etude comparative des profils de restriction.

Dans les conditions classiques actuelles d'extraction, seul le

Clones	Présence du mégaplasmide (1000 Md)	Présence du Plasmide moyen (90 Md)	Présence d'un petit plasmide (30 Md)
M ₅ N ₁ Ile ⁻ Val ⁻	+	+	-
Transformés 1,2,3,4,5,6,7,8,9	-	-	-
Transformés A,B,C,D,E,F,G,H,I, J,K,L,M,N	-	-	+

TABLEAU 6 : ETUDE DU CONTENU PLASMIDIQUE DE LA SOUCHE M₅N₁ Ile⁻Val⁻ ET DES CLONES TRANSFORMES.

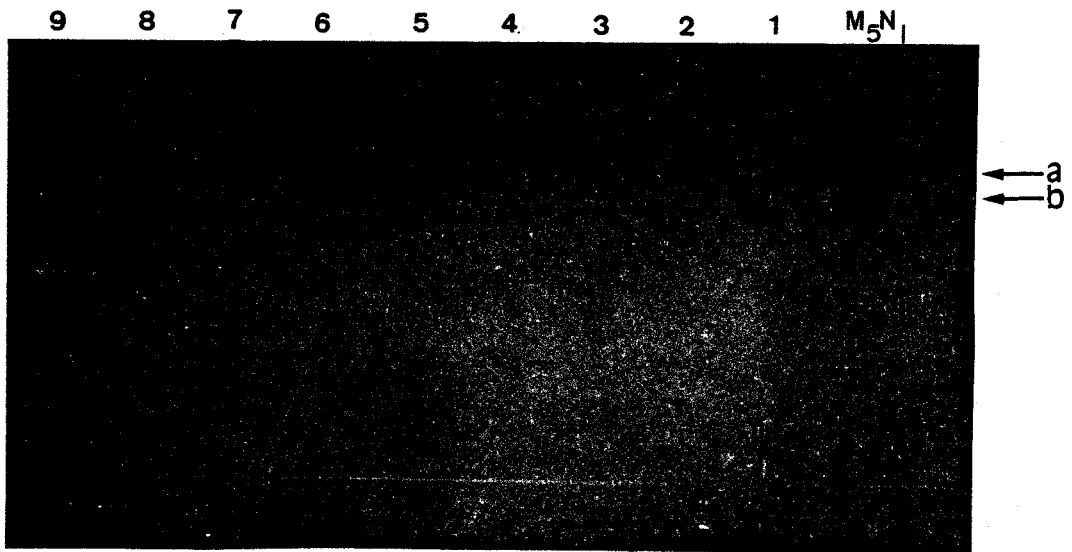


PHOTO 5 : ETUDE DU CONTENU PLASMIDIQUE DE LA SOUCHE
M₅N₁ Ile^rVal^r ET DES CLONES TRANSFORMES 1 à 9

a : mégaplasmide

b : plasmide moyen

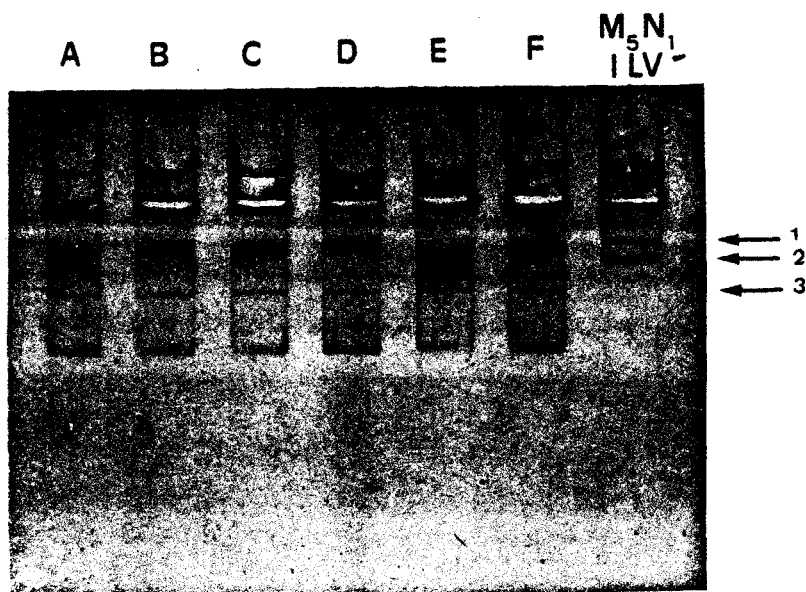


PHOTO 6 : ETUDE DU CONTENU PLASMIDIQUE DE LA SOUCHE M₅N₁ Ile⁻Val⁻ (1 : mégaplasme, 2 : plasmide moyen) ET DES CLONES TRANSFORMES A à F (3 : petit plasmide)

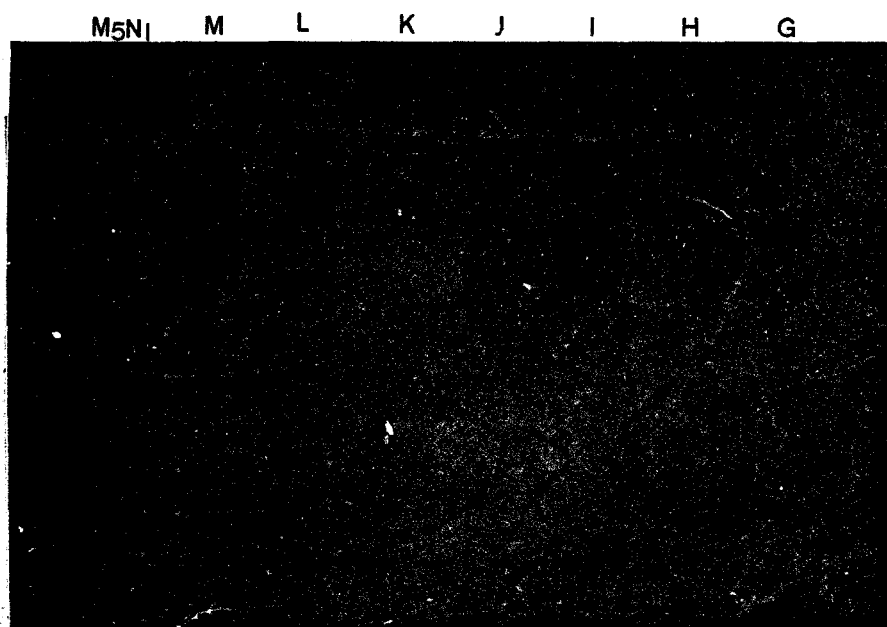


PHOTO 7 : ETUDE DU CONTENU PLASMIDIQUE DE LA SOUCHE M₅N₁ Ile⁻Val⁻ (1 : mégaplasme, 2 : plasmide moyen) ET DES CLONES TRANSFORMES G à M (3 : petit plasmide).

plasmide moyen de *R. meliloti* peut être préparé, le mégaplasmide est très difficile à extraire étant donné sa taille.

L'analyse comparative des petits plasmides extraits à partir des clones transformés n'a donc pu être possible qu'avec le plasmide moyen.

Nous avons effectué différentes digestions enzymatiques avec quelques endonucléases de restriction décrites pour ne produire sur le plasmide moyen de *R. meliloti* qu'un nombre de fragments limité (JOUANIN et al, 1982).

C'est ainsi que les petits plasmides des clones A et J ainsi que le plasmide moyen de la souche M_5N_1 1LV⁻ ont pu être soumis à l'action des endonucléases de restriction Sma I, Bam HI, XbaI, KpnI, Bgl II et Hind III.

Les profils de restriction de ces plasmides obtenus après migration électrophorétique en gel d'agarose horizontal, ont pu être alors comparés.

Les fragments obtenus à partir des petits plasmides sont totalement différents de ceux obtenus à partir du plasmide moyen. (Photos 8 et 9).

Nous pouvons donc supposer que ces petits plasmides ne proviendraient pas du plasmide moyen de la souche M_5N_1 1le⁻Va⁻ de *R. meliloti*.

Afin de confirmer cela et d'essayer d'établir la provenance de ces petits plasmides, nous avons réalisé des expériences d'hybridation entre ces petits plasmides et l'ADN de la souche d'origine.

2.3. Recherche d'homologie entre les petits plasmides des clones transformés et les plasmides de la souche d'origine.

Nous avons effectué alors des expériences d'hybridation avec de l'ADN plasmidique obtenu soit par lyse directe sur gel ou soit par dépôt du plasmide purifié, puis migration électrophorétique en gel d'agarose.

Cet ADN est ensuite transféré sur membrane "gene Screen" selon la technique du SOUTHERN (1975).

A B C D E F G H I J K L M N O

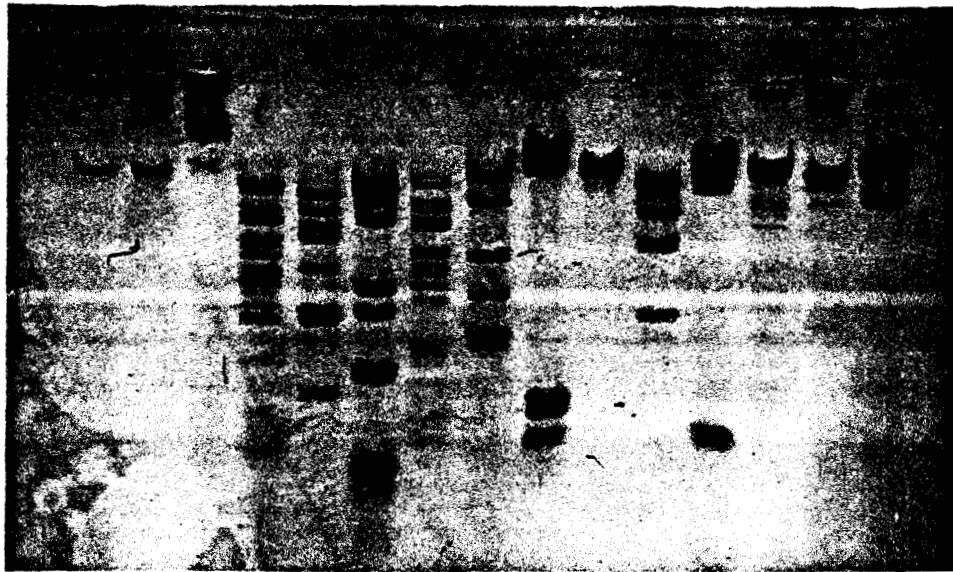


PHOTO 8 : PROFILS DE RESTRICTION DES PLASMIDES DE :

- . La souche M_5N_1 ILV⁻ (plasmide moyen) digéré par Sma I (D), Bam HI (G), Xba I (J), Kpn I (M)
- . Du clone transformé A digéré par Sma I (E), Bam HI (H), Xba I (K), Kpn I (N)
- . Du clone transformé J digéré par Sma I (F), Bam HI (I), Xba I (L), Kpn I (O)

TEMOINS : A (plasmide moyen), B (plasmide du clone A)
C (plasmide du clone J)

I H G F E D C B A

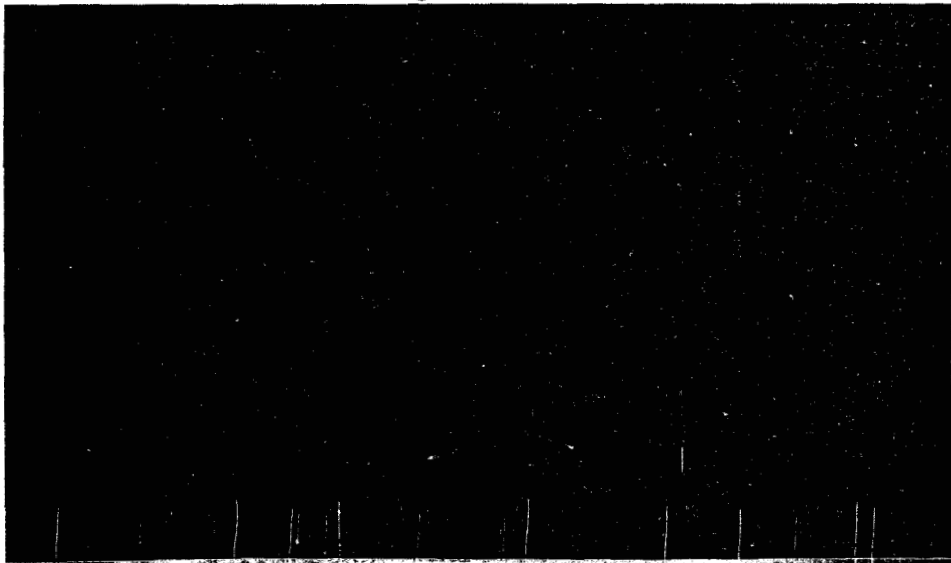


PHOTO 9 : PROFILS DE RESTRICTION DES PLASMIDES DE :

- . La souche M_5N_1 ILV⁻ (plasmide moyen) digéré par Bgl II (D), Hind III (G)
- . Du clone transformé A digéré par Bgl II (E), Hind III (H)
- . Du clone transformé J digéré par Bgl II (F), Hind III (I)

TEMOINS : A (plasmide moyen), B (plasmide du clone A)
C (plasmide du clone J)

2.3.1. Recherche d'homologie avec le plasmide moyen.

Nous avons dans un premier temps utilisé le plasmide moyen purifié comme sonde pour les expériences d'hybridation. Celui-ci après avoir été marqué radioactivement à l'aide de ^{35}S ATP, a été mis en contact avec différentes membranes issues de transfert des gels à étudier. Les éventuelles hybridations recherchées concernent uniquement dans ce cas les clones A à N, les autres ne présentant pas de bandes plasmidiques.

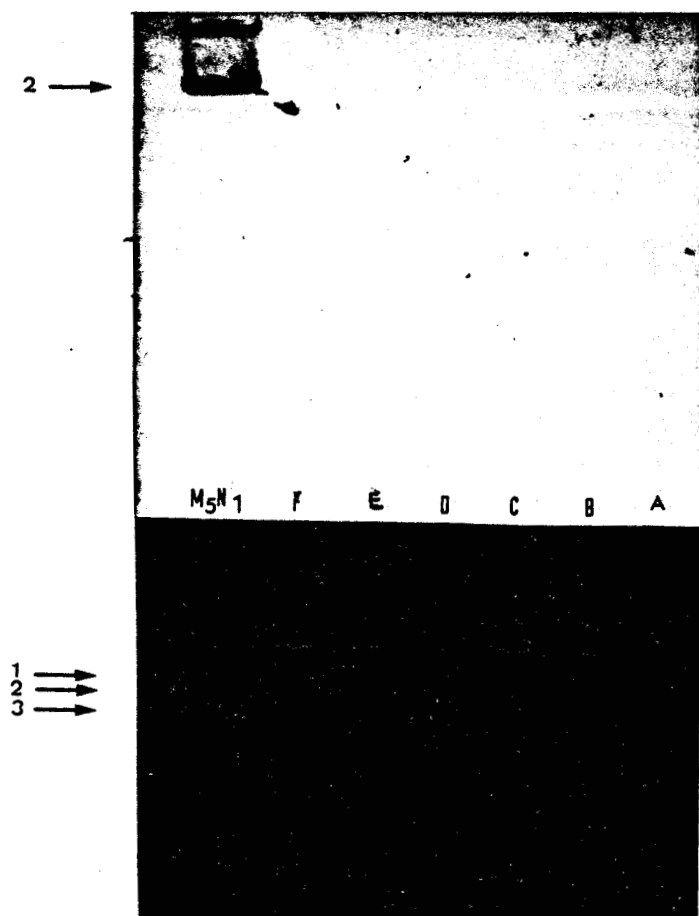
- Une première expérience a tenté d'hybrider ce plasmide moyen avec les bandes plasmidiques issues de lyse directe sur gel des clones transformés A à M (Photos 10 et 11).

Nous avons ainsi observé une hybridation avec le témoin positif plasmide moyen, issu de la lyse directe de la souche $M_5N_1 \text{Ile}^- \text{Val}^-$, mais aucune hybridation n'a été visualisée avec les bandes plasmidiques issues de la lyse des transformés. Il semblerait donc que ces petits plasmides n'aient aucune homologie avec le plasmide moyen.

- Une expérience d'hybridation plus précise a été effectuée en essayant d'hybrider ce plasmide moyen marqué avec les fragments issus de la digestion par l'endonucléase de restriction Sma I, des petits plasmides des clones A et J (Photo 12).

Une hybridation a été observée avec le témoin positif composé de la digestion du plasmide moyen ainsi qu'avec le produit de la digestion de l'ADN total de la souche $M_5N_1 \text{Ile}^- \text{Val}^-$ par cette même enzyme. Cependant, aucune hybridation n'a été observée avec les fragments issus de la digestion enzymatique des petits plasmides des clones A et J.

Ces résultats ont été confirmés par une autre manipulation. Le plasmide moyen n'a jamais pu hybrider avec le petit plasmide du clone transformé A, issu soit de lyse directe sur gel ou déposé après extraction coupé ou non par l'enzyme Sma I (Photo 13). Le témoin positif constitué du plasmide moyen lui-même coupé par l'enzyme Sma I ou obtenu par lyse directe sur gel a présenté une hybridation. Une légère homologie avec le plasmide de la souche 444 de *R. meliloti* a été observée, ce qui a déjà été démontré entre diverses souches de *R. meliloti* (JOUANIN et al, 1982).



AUTORADIOGRAPHIE
(Hybridation avec le
plasmide moyen marqué).

ELECTROPHORESE

PHOTO 10 : ETUDE DE L'HOMOLOGIE ENTRE LES PETITS PLASMIDES
DES CLONES TRANSFORMES A à F (3) ET LE PLASMIDE MOYEN
(2) DE LA SOUCHE M_5N_1 Ile⁻Val⁻.

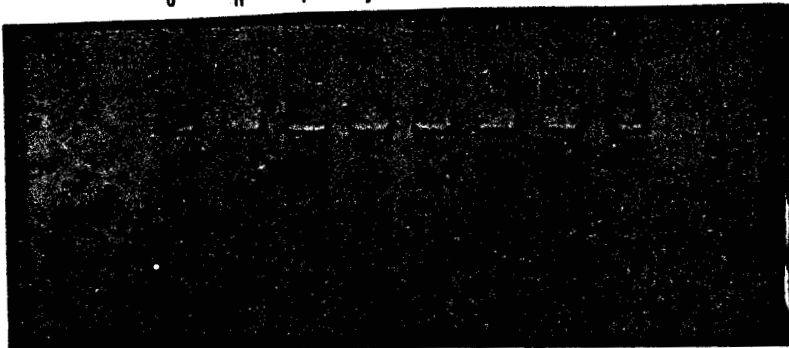
- 1 : mégaplasmide
- 2 : plasmide moyen
- 3 : petit plasmide



2 →



AUTORADIOGRAPHIE
(Hybridation avec
le plasmide moyen
marqué)

G H I J K L M M₅N₁

ELECTROPHORESE

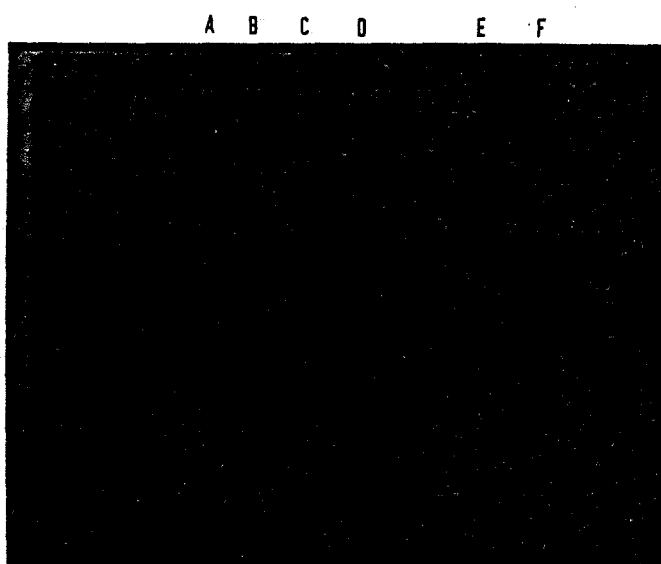
1 →
2 →
3 →

PHOTO 11 : ETUDE DE L'HOMOLOGIE ENTRE LES PETITS PLASMIDES
DES CLONES TRANSFORMES G à M (3) ET LE PLASMIDE
MOYEN (2) DE LA SOUCHE M₅N₁ Ile⁻Val⁻

- 1 : Mégaplasmide
- 2 : Plasmide moyen
- 3 : Petit plasmide



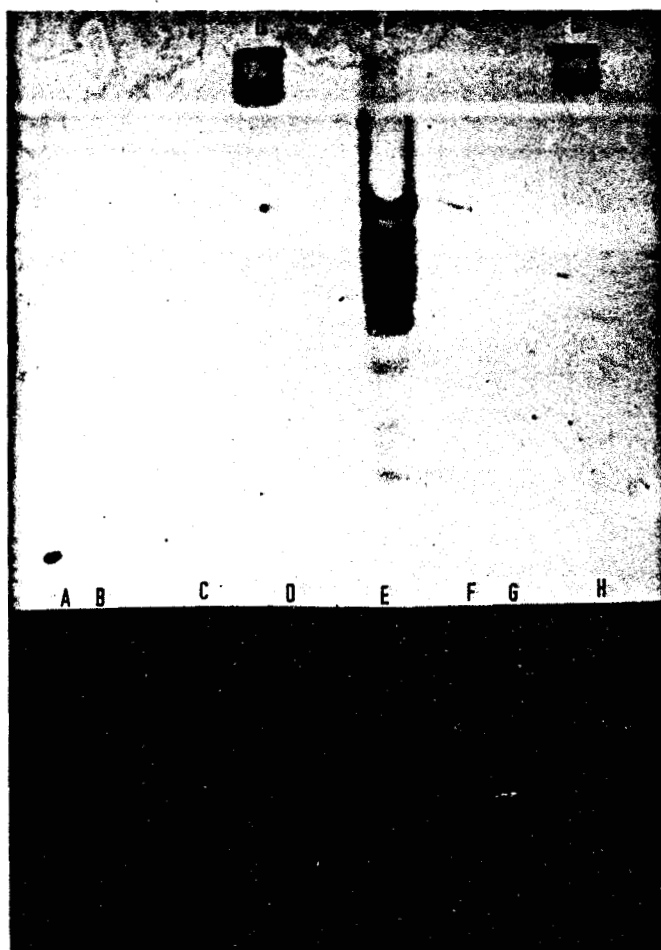
AUTORADIOGRAPHIE
(Hybridation avec
le plasmide moyen)



ELECTROPHORESE

(PHOTO 12 : ETUDE DE L'HOMOLOGIE ENTRE LES PETITS PLASMIDES DES CLONES TRANSFORMES A et J ET LE PLASMIDE MOYEN DE LA SOUCHE M_5N_1 Ile⁻Val⁻ .

- A : Plasmide moyen digéré par Sma I
- B : Petit plasmide du clone A non coupé
- C : Petit plasmide du clone A digéré par Sma I
- D : Petit plasmide du clone J digéré par Sma I
- E : ADN total de la souche M_5N_1 digéré par Sma I
- F : ADN total de la souche 444 digéré par Sma I (témoin négatif)



AUTORADIOGRAPHIE
(Hybridation avec
le plasmide moyen
marqué).

ELECTROPHORESE

PHOTO 13 : ETUDE DE L'HOMOLOGIE ENTRE LE PETIT PLASMIDE DU
CLONE A ET LE PLASMIDE MOYEN DE LA SOUCHE $M_5N_1 ILV^- VaT$

- A : Souche 2009 (lyse directe) : témoin négatif
- B : Petit plasmide du clone A
- C : Petit plasmide du clone A digéré par Sma I
- D : Souche $M_5N_1 ILV^-$ (lyse directe)
- E : Plasmide moyen (M_5N_1) digéré par Sma I
- F : Souche d'E.coli (témoin négatif : lyse directe)
- G : Souche 444 (témoin négatif : lyse directe)
- H : ADN total de la souche 444 digéré par Sma I
(témoin négatif)

Ces petits plasmides contenus par les clones transformés ne semblant pas provenir du plasmide moyen de la souche d'origine, nous avons alors tenté de les utiliser comme sonde pour faire l'expérience inverse.

2.3.2. Recherche d'homologie entre les petits plasmides et l'ADN de la souche d'origine.

- L'utilisation du petit plasmide du clone J comme sonde tout d'abord, ne nous a donné aucune hybridation avec les bandes plasmidiques issues de la lyse directe de la souche $M_5N_1Ile^-Val^-$, que ce soit avec le mégaplasme ou avec le plasmide moyen. Il a cependant été observé que ce petit plasmide issu du clone J hybride légèrement avec le petit plasmide du clone A, ce qui suggère l'existence d'une zone d'homologie entre ces deux plasmides (Photo 14). Aucune hybridation n'a eu lieu avec les témoins négatifs.

- Cette expérience a été mise en oeuvre avec l'utilisation du petit plasmide du transformé A comme sonde. Les mêmes résultats ont été obtenus, soit aucune hybridation avec les bandes correspondant au plasmide moyen et au mégaplasme issu de la lyse directe de la souche $M_5N_1Ile^-Val^-$. Une légère homologie a été retrouvée entre les petits plasmides des clones A et J (Photo 15).

- Des hybridations avec les fragments plasmidiques issus de la digestion par l'endonucléase Sma I ont alors été réalisées.

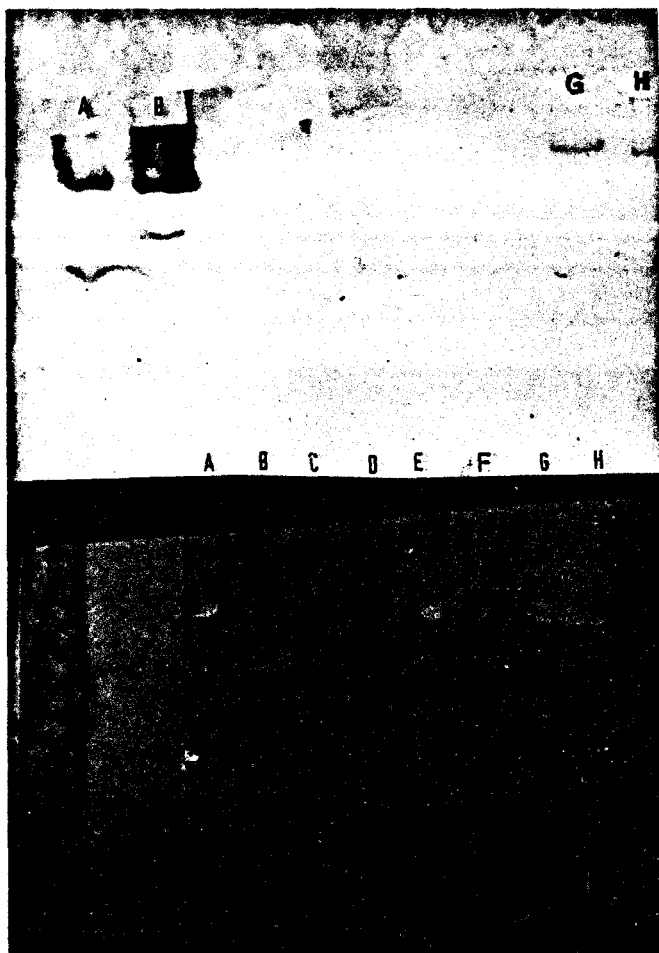
La photo 16 nous montre que l'hybridation a eu lieu :

. entre le plasmide du clone J marqué et les fragments obtenus après la digestion enzymatique de ce plasmide (témoin positif).

. avec quelques fragments issus de la digestion du petit plasmide du transformé A.

Cela confirme l'existence de séquences homologues entre ces deux plasmides.

. Aucune hybridation n'a été obtenue avec les fragments d'ADN issus de la digestion du plasmide moyen de la souche $M_5N_1Ile^-Val^-$, ni

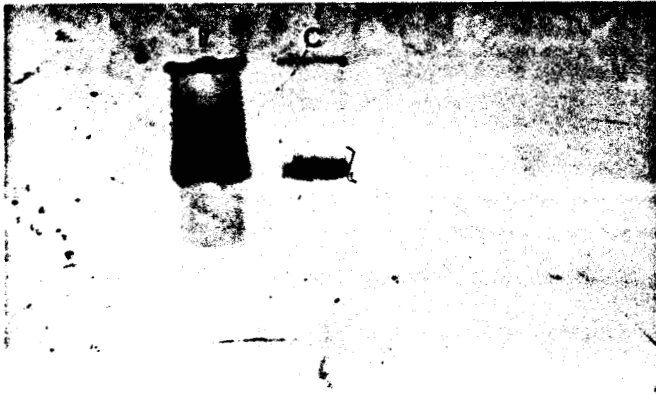


AUTORADIOGRAPHIE
(Hybridation avec le petit
plasmide du clone J)

ELECTROPHORESE

PHOTO 14 : RECHERCHE D'HOMOLOGIE ENTRE LES PETITS PLASMIDES
DES CLONES A et J et L'ADN DE LA SOUCHE $M_5N_1 ILV^- Val^-$

- A : Transformé J (lyse directe)
- B : Petit plasmide du clone J (purifié)
- C : Souche $M_5N_1 ILV^-$ (lyse directe)
- E : Souche 444 (lyse directe) : témoin négatif
- F : Souche 2009 (lyse directe) : témoin négatif
- G : Clone A (lyse directe)
- H : Petit plasmide du clone A (purifié)
- D : Plasmide moyen de la souche M_5N_1 (purifié)



AUTORADIOGRAPHIE
(Hybridation avec le petit
plasmide du clone A)



ELECTROPHORESE

PHOTO 15 : RECHERCHE D'HOMOLOGIE ENTRE LES PETITS PLASMIDES
DES TRANSFORMES A et J ET L'ADN DE LA SOUCHE
 M_5N_1 Ile⁻Val⁻ (lyse directe).

- A : Souche M_5N_1 ILV⁻ (lyse directe)
- B : Clone A (lyse directe)
- C : Clone J (lyse directe)
- D : Souche 444 (lyse directe)
- E : Souche 2009 (lyse directe)



AUTORADIOGRAPHIE
(Hybridation avec le petit
plasmide du clone J marqué)



ELECTROPHORESE

PHOTO 16 : RECHERCHE D'HOMOLOGIE ENTRE LE PETIT PLASMIDE
DU CLONE J ET L'ADN DE LA SOUCHE M_5N_1 Ile⁻Val⁻

- A : Plasmide moyen digéré par Sma I
- B : Petit plasmide du clone A digéré par Sma I
- C : Petit plasmide du clone J digéré par Sma I
- D : ADN total de la souche M_5N_1 digéré par Sma I
- E : ADN total de la souche 444 digéré par Sma I

avec l'ADN total de cette même souche digéré par l'enzyme Sma I.

- Cette expérience a été de même réalisée avec le petit plasmide du clone A comme sonde.

L'hybridation a été réalisée entre ce petit plasmide et le produit de la lyse directe sur gel de la souche M_5N_1 Ile⁻Val⁻. Aucune hybridation n'est observée, ni avec le plasmide moyen, ni avec le mégaplasmide, mais nous pouvons observer un marquage au niveau du dépôt de cette lyse, (Photo 17).

Cette hybridation prouve que le petit plasmide correspond bien à un fragment du génome total de la bactérie d'origine.

Aucune hybridation n'a donc pu être visualisée entre ces petits plasmides des clones transformés et les plasmides existants chez la souche initiale.

Il nous faut à présent, pouvoir confirmer que ces clones sont bien issus de la souche M_5N_1 Ile⁻Val⁻ après transformation et que leurs petits plasmides proviennent bien d'un (ou de plusieurs) segments du génome de cette bactérie.

D'autre part, pour tous les clones transformés obtenus, la disparition des plasmides indigènes de la souche M_5N_1 (plasmide moyen et mégaplasmide) a été observée. Il nous faut donc tenter de déterminer si ces plasmides originaux ont totalement disparus des cellules ou s'ils ont été intégrés dans le génome chez les clones transformés.

2.4. Hybridation sur colonies.

2.4.1. Recherche du plasmide moyen chez les clones transformés.

Des expériences utilisant comme sonde le plasmide moyen marqué ont tenté de visualiser une hybridation avec l'ADN total issu des colonies cultivées puis lysées sur membranes "gene screen".

Cette expérience a été réalisée en hybridant ce plasmide moyen marqué avec l'ADN total issu de la lyse des colonies des clones transformés 1,2,3,4,5,6,7, A et J.



AUTORADIOGRAPHIE
(Hybridation avec le petit
plasmide du clone A
marqué)

ELECTROPHORESE

PHOTO 17 : RECHERCHE D'HOMOLOGIE ENTRE LE PETIT PLASMIDE DU
CLONE A ET L'ADN DE LA SOUCHE M_5N_1 Ile⁻Val⁻

- A : Souche M_5N_1 ILV⁻ (lyse directe)
- B : Clone A (lyse directe)
- C : Petit plasmide du clone A purifié
- D : Petit plasmide du clone A digéré par Sma I
- E : Clone J (lyse directe)
- F : Souche E.coli (témoin négatif)
- G : Souche 2009 (témoin négatif)

Le résultat a été positif autant avec le témoin constitué de la souche $M_5N_1 Ile^-Val^-$ elle-même, qu'avec les clones transformés testés.

Le témoin négatif constitué de la colonie d'*E.coli* CNCM 7624 n'a montré aucune hybridation (Photo 18).

Le plasmide moyen est donc présent chez les clones transformés, bien qu'il n'ait pu être visualisé sous la forme extrachromosomique.

2.4.2. Recherche de l'origine des petits plasmides.

- L'utilisation du petit plasmide du clone A comme sonde tout d'abord, a toujours montré une forte hybridation avec les colonies issues du transformé A et du transformé J.

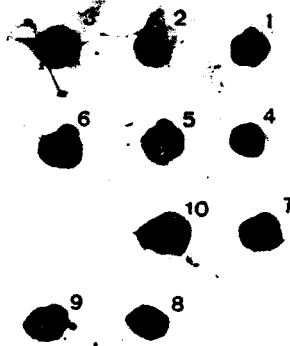
Une légère homologie a été observée avec la colonie de la souche $M_5N_1 Ile^-Val^-$, mais trop légère pour affirmer que l'hybridation soit positive (Photo 19).

- Cette expérience réalisée avec le petit plasmide du clone J a montré de même une hybridation avec les colonies des clones A et J et une plus forte hybridation avec la colonie de la souche $M_5N_1 Ile^-Val^-$ que ne l'avait montré le petit plasmide du clone A, bien que celle-ci reste relativement faible (Photo 20).

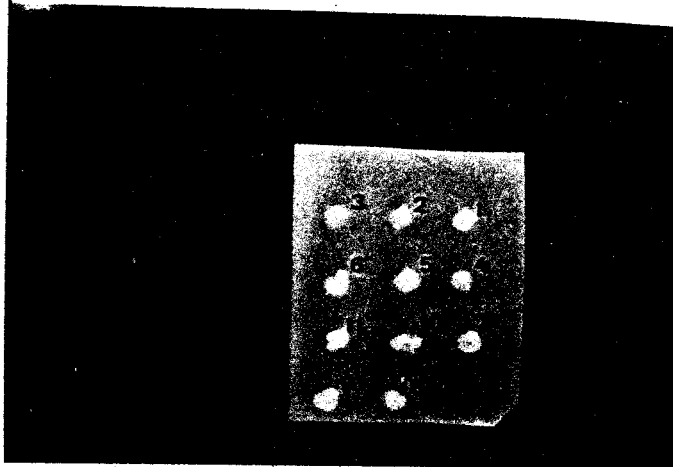
De nombreuses modifications d'ordre morphologique, biochimique et génétique ayant pris place lors de la transformation génétique, il nous a semblé intéressant d'étudier les propriétés infectieuses de ces clones.

III - ETUDE DES CLONES ISOLES DE NODULES RACINAIRES DE PLANTULES DE LUZERNE INFECTÉES PAR DES CELLULES TRANSFORMÉES.

Nous avons tenté d'extraire et de cultiver les bactéries contenues dans les nodules apparus sur les plantules infectées par les clones transformés.



AUTORADIOGRAPHIE
(Hybridation avec le
plasmide moyen
marqué)

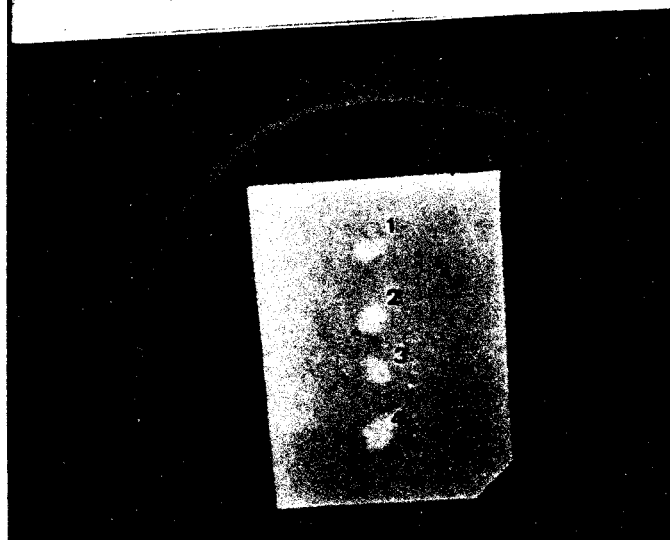


COLONIES CULTIVEES SUR
MEMBRANE GENE SCREEN

PHOTO 18 : RECHERCHE DU PLASMIDE MOYEN CHEZ LES CLONES
TRANSFORMES 1 (1), 2 (2), 3 (3), 4 (4), 5 (5),
6 (6), 7 (7), A (8), J (9), PAR HYBRIDATION SUR
COLONIES AVEC LE PLASMIDE MOYEN ISSU DE LA SOUCHE
 $M_5N_1 Ile^-Val^-$ (10)
TEMOIN NEGATIF : SOUCHE E.COLI CNCM 7624 (11)



AUTORADIOGRAPHIE
(Hybridation avec le petit
plasmide du clone A
marqué)



COLONIES CULTIVEES
SUR MEMBRANE GENE SCREEN

PHOTO 19 : RECHERCHE DE L'ORIGINE DU PETIT PLASMIDE DU CLONE
A PAR HYBRIDATION SUR COLONIES AVEC LA SOUCHE
 M_5N_1 ILV⁻ (1) ET LES CLONES A (2) et J (3)
TEMOIN NEGATIF : SOUCHE D'E.COLI CNCM 7624 (4)



PHOTO 20 : RECHERCHE DE L'ORIGINE DU PETIT PLASMIDE DU CLONE J PAR HYBRIDATION SUR COLONIES AVEC LA SOUCHE M_5N_1 ILV^- (1) ET LES CLONES A (2) et J (3).

TEMOIN NEGATIF : SOUCHE D'E.COLI CNCM (4)

Après extraction en milieu hypertonique , puis culture en milieu riche, peu de bactéries issues de ces nodules ont pu se multiplier. Seuls les clones issus des nodules produits par les transformés 6,8,9 et J ont pu être cultivés (Tableau 7).

3.1. Etude morphologique.

Après isolement sur milieu RC mannité gélosé, nous avons constaté que tous ces clones isolés des nodules donnaient sur ce milieu de très grosses colonies muqueuses identiques à celles de la bactérie auxotrophe d'origine.

Ces bactéries cependant sur milieu RGl_c HB₁ sont restées prototrophes pour leur caractère de sélection Ile⁺Val⁺, donnant de petites colonies.

Ces clones transformés ont donc subi de nouvelles modifications après passage sur plante. Nous avons alors analysé plus profondément ces clones issus des nodules.

3.2. Etude de leur contenu plasmidique.

Nous avons tout d'abord effectué une électrophorèse par lyse directe en gel d'agarose des clones ayant pu être réisolés de ces nodules.

Non seulement ces clones après passage sur plante semblent avoir réacquis les caractères morphologiques de la souche d'origine, (caractère muqueux), mais de plus, ils semblent aussi avoir acquis leur contenu plasmidique initial, soit la présence du mégaplasmide et du plasmide moyen, le clone J semblant de plus avoir perdu son petit plasmide (Photo 21).

Tous ces résultats sont résumés dans le Tableau 8 et nous remarquons que le profil électrophorétique du contenu plasmidique de ces clones après passage sur plante est le même que celui de la souche auxotrophe parentale M₅N₁ ILV⁻.

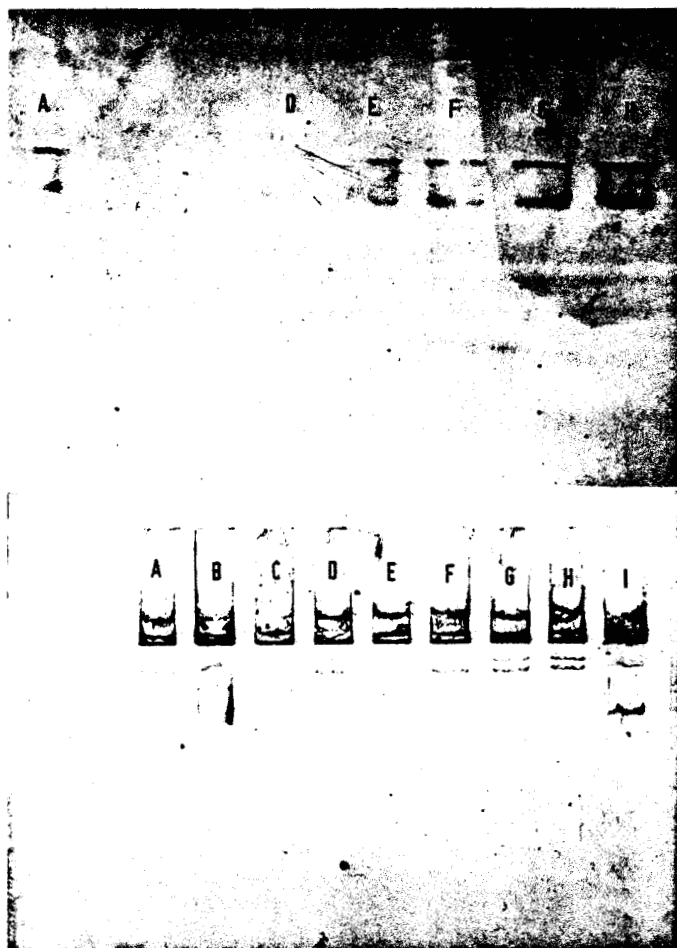
3.3. Typage phagique.

Nous avons alors comparé la sensibilité aux phages des clones

TEMOIN CLONES TRANSFORMES

Clones	M ₅ N ₁	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	J
Nodulation:	+++	+	++	+	+	-	++	e	+	+	+	++
Clones réisolés des nodules	+++	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
Caractère muqueux des clones isolés des nodules	+++						+		+	+		+

TABLEAU 7 : ETUDE DES CLONES AYANT PU ETRE EXTRAITS A PARTIR DES NODULES PRODUITS PAR LES TRANSFORMES



AUTORADIOGRAPHIE
(Hybridation avec le
plasmide moyen marqué)

ELECTROPHORESE

PHOTO 21 : ETUDE DU CONTENU PLASMIDIQUE DES CLONES TRANSFORMES
6,8,9 et J ISOLEES DES NODULES, PAR LYSE DIRECTE

A : Souche M_5N_1 Ile⁻ Val⁻

B : Clone A

C : Clone J

D : Clone J isolé d'un nodule

E : Clone J isolé d'un nodule

F : Clone 6 isolé d'un nodule

G : Clone 8 isolé d'un nodule

H : clone 9 isolé d'un nodule

ET ETUDE DE L'HOMOLOGIE DES PLASMIDES ACQUIS PAR LES
TRANSFORMES APRES PASSAGE SUR PLANTE AVEC LE PLASMIDE
MOYEN MARQUE

TEMOIN NEGATIF : SOUCHE 444 (I)

	TEMOIN	CLONES TRANSFORMES				CLONES ISSUS DES NODULES PRODUITS PAR LES TRANSFORMES			
	M ₅ N ₁ Ile ⁻ Val ⁻	6	8	9	J	Nod 6	Nod 8	Nod 9	Nod J
Présence du mégaplasmide	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Présence du plasmide moyen	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Présence du petit plasmide	-	-	-	-	+	-	-	-	-

TABLEAU 8 : ETUDE DU CONTENU PLASMIDIQUE DE LA SOUCHE M₅N₁ Ile⁻Val⁻ DES CLONES TRANSFORMES 6,8,9,et J ET DES CLONES ISSUS DES NODULES.

extraits des nodules par rapport aux clones transformés eux-mêmes ainsi qu'à la souche auxotrophe initiale sensible, afin de voir si les clones après passage sur plante ont réacquis d'autres caractères de la souche parentale.

Les résultats schématisés dans le Tableau 9, nous montrent que les clones issus des nodules infectés par les cellules transformées ont réacquis la même sensibilité aux phages que la souche auxotrophe.

3.4. Recherche d'homologie entre les plasmides réacquis après nodulation et les plasmides de la souche initiale.

Comme après passage sur plante, les clones transformés semblent avoir réacquis les caractères d'origine de la souche auxotrophe ainsi que son contenu plasmidique, nous avons voulu vérifier si les plasmides réapparus ou tout au moins si le plasmide moyen présent est bien homologue à celui de la souche de départ. Cette vérification n'a pu être effectuée avec le mégaplasmide, toujours à cause de la difficulté de son extraction.

Une expérience d'hybridation utilisant le plasmide moyen comme sonde nous a permis de vérifier que celui-ci hybride effectivement avec les plasmides moyens réapparus après passage sur plante chez les clones transformés (Photo 21).

Le plasmide moyen réacquis après nodulation est donc homologue à celui de la souche auxotrophe d'origine.

3.5. Effet d'exudats racinaires sur les clones transformés.

Certains auteurs ont observé que la présence d'exudats racinaires de la plante stimulent la synthèse de polysaccharides et développent les récepteurs biochimiques spécifiques de la lectine (BHAGWAT ET THOMAS, 1983; OLIVARES et al, 1984).

D'autres ont suggéré que l'expression de ces caractères est liée à un potentiel génétique qui s'exprime selon les conditions environnementales (BHUWANESWARI et BAUER, 1979).

	TEMOIN	CLONES TRANSFORMES				CLONES ISSUS DES NODULES PRODUITS PAR LES TRANSFORMES			
	M_5N_1 ILV ⁻	6	8	9	J	Nod 6	Nod 8	Nod 9	Nod J
$\Psi 16$	+++	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++
$\Psi 19$	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
$\Psi 20$	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
$\Psi 21$	+++	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++

TABLEAU 9 : TEST DE SENSIBILITE AUX PHAGES $\Psi 16$, $\Psi 19$, $\Psi 20$, $\Psi 21$, POUR LA SOUCHE M_5N_1 ILV⁻, LES CLONES TRANSFORMES 6,8,9 et J ET LES CLONES ISSUS DE LEURS NODULES.



Nous avons alors tenté d'expérience de suivre l'effet d'exudats racinaires de plantules de luzerne sur les clones transformés.

Les résultats ont été négatifs, le milieu de Nicol et Thorton ayant le même effet d'exacerber la synthèse de polysaccharides.

Un examen du contenu plasmidique des clones après action des jus racinaires n'a de plus donné aucune modification.

DISCUSSION

CONCLUSION



Une technique de transformation mise au point au Laboratoire chez *R. meliloti* (COURTOIS, 1982), appliquée à la souche M_5N_1 Ile^-Val^- nous a permis de transférer ce caractère d'auxotrophie Ile^+Val^+ au moyen d'ADN extrait de la souche prototrophe M_5N_1 Ile^+Val^+ . Cet ADN est soit purifié par gel filtration, donnant une fréquence optimale de transfert de $1,7 \cdot 10^{-6}$, soit utilisé tel quel donnant alors une fréquence maximale de $3,9 \cdot 10^{-5}$.

Les cellules obtenues à partir des clones prototrophes après ces transformations ont perdu leur caractère muqueux sur milieu RC gélosé mannité et se déforment après leur isolement, en milieu de compétence.

Ces clones semblant ainsi morphologiquement différents de la souche auxotrophe d'origine, ont alors fait l'objet d'une étude comparative plus précise.

I - MODIFICATIONS PHENOTYPIQUES DES CLONES TRANSFORMES

L'étude comparative des caractères portés par ces cellules transformées a révélé de nombreuses modifications des caractères principaux de la souche auxotrophe de départ (Tableau 10).

Nous avons ainsi pu observer dans le cas général la perte du caractère muqueux en milieu gélosé mannité ainsi que sur le milieu au bleu d'aniline et par dosage des exopolysaccharides.

Afin de confirmer que ces clones sont bien issus des bactéries du genre *Rhizobium* et de contrôler leur propriété infectieuse caractéristique de ce genre, l'inoculation à de jeunes plantules de luzerne, nous a révélé une perte importante de leur aptitude à noduler, la fréquence de nodulation étant plus faible voir nulle et l'apparition des nodules plus tardive.

Cela n'est en fait pas surprenant étant donné les modifications qui semblent être survenues au niveau des composés

TABEAU 10 : RECAPITULATIF DES MODIFICATIONS PHENOTYPIQUES SURVENUES APRES TRANSFORMATION

		CLONES TRANSFORMES										TEMOIN		
		M ^S _N 11e_Val_										M ^S _N 11e_Val_		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	J		
Sensibilité aux phages	16	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+++	
	19	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+++	
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	
	21	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+++	
Aspect de la culture en milieu de compétence après isolement			Présence en nombreuses formes longues											
Caractère muqueux sur milieu RC gélosé														
Réaction avec le bleu d'aniline														
		A,B,C,D,E,F,G,I,M,N										H,D,K,L		
		1,2,3,4,5,6,7,8,9												

de surface de ces bactéries, les polysaccharides étant décrits comme ayant un rôle primordial dans la reconnaissance de la plante.

D'autres caractères semblent avoir été partiellement perdus telle la sensibilité aux phages.

Les récepteurs phagiques sembleraient selon certains auteurs être de nature lipopolysaccharidiques (LINDBERG, 1977). La sensibilité aux phages semble être plus faible chez les cellules produisant des exopolysaccharides tel *R.meliloti* (BARNET et HUMPHREY, 1975).

Il est alors possible que les clones transformés aient subi des modifications d'une part au niveau de leurs exopolysaccharides (EPS) et d'autre part, au niveau de leurs lipopolysaccharides (LPS) car ils devraient être au moins autant sinon plus sensibles aux phages que la souche M_5N_1 Ile⁻Val⁻.

L'expression des caractères étant le reflet du potentiel génétique de la bactérie, une étude génétique plus précise a alors été réalisée. En effet, les bactéries du genre *Rhizobium* sont caractérisés par la présence de plasmides et ceux-ci portent certains gènes impliqués dans la symbiose. Un screening du contenu plasmidique des clones transformés a alors été réalisé.

II - MODIFICATIONS GENETIQUES DES CLONES TRANSFORMES.

2.1. Contenu plasmidique.

L'examen du contenu plasmidique après électrophorèse par lyse directe des cellules sur gel d'agarose a révélé deux cas distincts (Tableau 11) :

- D'une part, les clones ayant reçu l'ADN filtré n'ont pas révélé la présence d'éléments extrachromosomiques, les plasmides d'origine n'ayant pu être visualisés.

- D'autre part, les clones ayant reçu l'ADN brut ont présenté un petit plasmide, mais semble avoir perdu tout comme les autres clones, les plasmides d'origine.

		TEMOIN	TRANSFORMES	
		M_5N_1 Ile ⁻ Val ⁻	Clones 1 à 9	Clones A à N
PRESENCE A L'ELECTRO- PHORESE	du mégaplasmide	+	-	-
	du plasmide moyen	+	-	-
	d'un petit plasmide	-	-	+

TABLEAU 11 : ETUDE DU CONTENU PLASMIDIQUE DE LA SOUCHE
 M_5N_1 Ile⁻Val⁻ ET DES TRANSFORMES

La disparition du plasmide moyen et du mégaplasmide semble être survenue après transformation bien qu'il soit toujours possible d'envisager le cas où ces plasmides seraient présents, mais sous forme qui ne pourrait être visualisée par les procédés techniques utilisés.

Cependant, il semble intéressant de relier cette absence apparente de plasmides aux modifications survenues chez les clones transformés en particulier la perte du caractère muqueux et de la sensibilité aux phages, caractères qui d'ailleurs, selon certains auteurs, seraient localisés sur les plasmides (PALOMARES et al, 1978; CORRAL et al, 1978).

On pourrait expliquer cette disparition éventuelle par l'intervention de nucléases qui se seraient manifestées au cours du processus de transformation. On peut envisager ainsi la possibilité d'une intégration de ces éléments extrachromosomiques au sein du chromosome.

Nous pouvons de toute évidence, remarquer que le processus de transformation chez *R.meliloti* a induit de profonds remaniements du génome. Cela n'est d'ailleurs pas un fait exceptionnel, car chez de nombreuses espèces de *Rhizobium*, l'instabilité plasmidique a été fréquemment observée.

Le génome de *R.japonicum* semble lui aussi être capable de subir des réorganisations spontanées de ses composés plasmidiques ou chromosomiques (BERRY et ATHERLY, 1984). Ces auteurs ont de plus observé que la transformation de sphéroplastes de cette bactérie par des plasmides du groupe P, tels le RP₁ et le RP₄, induit de nombreux réarrangements génomiques chez cette bactérie. Cette souche qui possède un grand plasmide a pu être transformée par le RP₁. Ceci a conduit à la transposition d'ADN chromosomique dans le grand plasmide indigène, ainsi qu'à l'intégration du plasmide R dans le chromosome ou le plasmide endogène.

Pour toutes les transformations effectuées, il semble que ce soit toujours une section similaire de l'ADN chromosomique qui soit impliquée dans tous les réarrangements génomiques observés chez les transformés par RP₁ et RP₄.

Des réarrangements plasmidiques ont été de même observés par CANTRELL et al (1982) chez *R.japonicum* par l'obtention de mutants spontanés non réversibles Hup⁻ (Hydrogen Uptake) qui ont acquis deux plasmides non discernables chez la souche parentale. Selon ces auteurs, ces deux plasmides seraient soit issus du réarrangement d'un mégaplas- mide jamais encore visualisé, en deux petits plasmides ou soit générés à partir du chromosome.

L'étude de la stabilité plasmidique a été de même effectuée par DJORDJEVIC et al (1982) chez *R.trifolii*. Après transfert d'un plasmide conjugatif codant pour la nodulation du pois à *R.trifolii*, les transconjugants Nod⁺ Fix⁺ à la fois pour le pois et le trèfle ont subi des passages répétés sur les deux plantes. Une instabilité a été notée sur la capacité de ces hybrides à former des nodules efficaces

sur toutes les plantes testées.

Dans certains cas, ce changement phénotypique a été attribué à une modification du contenu plasmidique.

Des phénomènes de ce type ont déjà été observés au Laboratoire chez *R.meliloti*. En effet, ALI (1982) en étudiant des révertants prototrophes issus de mutants auxotrophes obtenus par transposition par le Tn5 a observé que ces révertants avaient subi des réarrangements plasmidiques. Il a obtenu en effet, des révertants présentant deux plasmides moyens de taille différente de celle du plasmide indigène de la souche sauvage et des mutants auxotrophes correspondants.

De même MAOUI et al (in press.) en essayant de transférer le phénotype Fix^+ par mobilisation du mégaplasmide d'une souche de *R.meliloti* 2011/RP₄ vers un mutant de la souche *R.meliloti* M₅N₁ Fix^- ont obtenu l'exclusion du plasmide moyen de cette souche, suggérant une incompatibilité avec le p Sym de la première souche.

La souche M₅N₁ Ile⁻Val⁻ de *R.meliloti* ayant subi de profonds réarrangements génomiques, il nous a alors fallu essayer d'une part de déterminer le devenir des plasmides d'origine chez les clones transformés et d'autre part, de rechercher l'origine des petits plasmides apparus chez les clones A à N.

2.2. Etude des réarrangements génomiques après transformation.

2.2.1. Origine des petits plasmides.

La transformation ayant induit chez les clones transformés A à N, l'apparition d'un petit plasmide, le problème a été d'essayer d'établir son origine.

- Nous nous sommes tout d'abord intéressés à comparer ces petits plasmides au plasmide moyen de la souche M₅N₁ Ile⁻Val⁻ de *R.meliloti*, seul plasmide isolable dans les conditions classiques d'extraction.

La comparaison des profils de restriction de ces petits plasmides des clones A et J avec le plasmide moyen digérés par quelques unes des enzymes de restriction intéressantes, ne nous a suggéré aucune similitude entre eux.

Ces résultats étant négatifs, des essais d'hybridation ont alors été tentés.

Aucune homologie n'a pu être détectée entre ces petits plasmides et le plasmide moyen, bien que les expériences aient été réalisées soit en hybridant le plasmide moyen avec les petits plasmides ou soit en hybridant à l'inverse ces petits plasmides avec le plasmide moyen.

Malgré les conditions expérimentales prises, (ces expériences ayant été réalisées avec les plasmides purifiés en gradient de chlorure de césium et utilisés à haute concentration au cours des électrophorèses) nous pouvons affirmer qu'aucune homologie n'existe entre ces petits plasmides et le plasmide moyen.

Cependant, aucune homologie n'a été observée avec le mégaplasmide obtenu par lyse directe sur gel. Or cette technique implique une faible concentration d'ADN plasmidique au niveau de la bande correspondante. L'absence d'hybridation pourrait être due à un mauvais rapport de concentration en ADN. Ces résultats négatifs doivent donc être considérés avec beaucoup de précaution.

L'origine des petits plasmides n'ayant pu être déterminée, des expériences d'hybridation sur colonies ont tenté de vérifier qu'ils sont bien issus de l'ADN de la souche parentale.

Seule, une légère homologie a été observée avec l'ADN total de la colonie de la souche $M_5N_1 Ile^-Val^-$ de *R.meliloti*.

Il serait possible d'envisager que ces petits plasmides ne proviennent pas d'un seul segment d'ADN génomique de

la souche parentale, mais qu'en fait ils seraient issus d'un réarrangement de plusieurs segments d'ADN provenant du chromosome ou du mégaplasmide.

L'absence d'homologie pourrait être due à un mauvais rapport de concentration entre ces petits segments et leurs homologues sur les composés génomiques de départ.

2.2.2. Devenir des plasmides endogènes.

Pour tous les clones testés obtenus après transformation, les plasmides indigènes de la souche M_5N_1 Ile⁻Val⁻ de *R.meliloti*, c'est-à-dire le plasmide moyen et le mégaplasmide, n'ont jamais pu être visualisés.

Deux hypothèses ont alors été soulevées, soit leur intégration dans le chromosome, soit leur disparation totale de la cellule.

La première hypothèse semblant la plus intéressante, des essais d'hybridation ont pu alors être effectués. Ces essais positifs ont révélé une homologie entre le plasmide moyen (seul isolable) et l'ADN total des colonies de plusieurs transformés testés, cultivés et lysés sur membrane "gene screen".

L'ADN du plasmide moyen semble donc toujours être présent chez les clones transformés, bien qu'il ne soit pas visualisable sous la forme extrachromosomique.

Ces résultats suggèrent donc l'intégration du plasmide moyen dans le chromosome lors de la transformation, bien que l'hybridation obtenue aurait pu s'effectuer avec des copies du plasmide moyen toujours existantes à l'état intégré normalement dans le chromosome. En effet l'absence de copies de plasmides endogènes intégrés chez *R.meliloti* n'a jamais été démontrée. Cependant, cette réserve semble peu probable vu la taille du mégaplasmide.

III - EFFET DE LA PLANTE SUR LES CLONES TRANSFORMES

Certains clones transformés ont pu être isolés des nodosités apparues sur les plantules de luzerne infectées. Leur étude nous a semblé intéressante.

En effet, ces clones après avoir été extraits des nodules, se sont avérés avoir retrouvé les caractères phénotypiques de la souche de départ, soit le caractère muqueux et la sensibilité aux phages.

L'analyse du contenu plasmidique révélant la réacquisition des plasmides indigènes de la souche auxotrophe, nous a alors permis de confirmer l'hypothèse d'une éventuelle intégration de ces plasmides au cours du processus de transformation, bien qu'il faille toujours tenir compte d'une éventuelle existence de ces plasmides à l'état intégré chez la souche de départ.

Il semble alors concevable qu'au cours de la transformation, les plasmides indigènes de la souche M_5N_1 Ile⁻Val⁻ se soient intégrés et qu'après passage sur plante, ils aient été régénérés à l'état extrachromosomique, (l'éventuelle existence de copies de ces plasmides à l'état intégré dans les cellules parentales n'est pas exclue).

Afin de confirmer que les plasmides réapparus après passage sur plante sont bien les mêmes que ceux qui préexistaient chez la souche parentale, une expérience d'hybridation a été réalisée entre le plasmide moyen de la souche M_5N_1 Ile⁻Val⁻ utilisée comme sonde et les plasmides moyens réacquis par les clones transformés isolés des nodules.

L'homologie étant établie, nous pouvons donc affirmer que les plasmides réapparus après passage sur plante, tout du moins en ce qui concerne le plasmide moyen, sont bien homologues à ceux existants chez la souche parentale.

L'ADN plasmidique aurait donc probablement été intégré dans le chromosome au cours de la transformation en même temps que l'ADN transformant portant les caractères Ile⁺Val⁺. Sous cet état intégré, les gènes portés par l'ADN plasmidique ne pourraient s'exprimer ce qui expliquerait les modifications phénotypiques survenues chez les clones transformés.

Le retour à la forme autonome des plasmides après passage sur plante et la réacquisition des caractères d'origine semblent être liés.

De plus, ce phénomène confirme que la bactérie associée à la plante subit une réorganisation génomique, hypothèse déjà soulevée par l'observation de modifications génétiques au cours de la symbiose chez le bactéroïde.

- . Variation de la quantité d'ADN cellulaire
- . Variation de la composition en bases de l'ADN (GC %)
- . Augmentation de l'expression des gènes codant pour la nitrogénase.

Il serait à présent intéressant de comprendre le mécanisme qui induit les réarrangements au cours de la transformation, ainsi que d'étudier le rôle de la plante dans le retour aux caractères d'origine des clones transformés, ainsi que des plasmides sous leur forme autonome.

En effet, l'étude du mécanisme qui induit cette réorganisation au moment de la symbiose mériterait un très grand intérêt.

BIBLIOGRAPHIE

AGARWAL A.K., and KEISTER D.L., 1983.
 Physiology of ex planta nitrogenase activity in *Rhizobium japonicum*
Appl. env. Microbiol. 45 : 1592 - 1601.

ALI H., 1982.

Obtention de mutants chez *Rhizobium meliloti* par l'insertion du transposon Tn5 et étude de leurs révertants.

Thèse de 3ème Cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille.

ALI H., BECHET M., NIEL C. and GUILLAUME J.B., 1984.

Rhizobium meliloti Tn5 induced auxotrophic mutants responding to different biosynthetic intermediates.

Can J. Microbiol. 30 : 507 - 511.

ANDERSEN K., SHANMUGAN K.T., LIM S.T., CSONKA L.N., TAIT R., KENNECKE H., SCOTT D.B., HOM S.S., HAURY J.F., VALENTINE A. and VALENTINE R. :
 Genetic engineering in agriculture with emphasis on nitrogen fixation. 1980
 TIBS., North Holland Biomed. press : 35 - 39.

BALASSA G., 1963.

Genetic transformation of *Rhizobium* : A review of the work of R. Balassa
Bact. Rev. 27 : 228 - 241.

BALASSA R. and GABOR M., 1965.

Transformation of streptomycin markers in rough strains of *Rhizobium lupini* :
Acta Microbiol., Acad. Sci. Hung., 11 : 329 - 339.

BANFALVI Z., SAKANYAN V., KONCZ C., KISS A., DUSHA I. and KONDOROSI A., 1981.

Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*.

Mol. Gen. Genet. 184 : 318 - 325.

BARNET Y.M., and HUMPHREY B., 1975.

Exopolysaccharide depolymerases induced by *Rhizobium* bacteriophages

Can. J. Microbiol. 21 : 1647 - 1650.

BAUER W.D., 1981.

Infection of legumes by *Rhizobia*.

Ann. Rev. plant. Physiol. 32 : 407 - 449.

BECHET M. et GUILLAUME J.B., 1978.

Mise en évidence d'ADN extrachromosomique chez *Rhizobium meliloti*

Can. J. Microbiol. 47 : 960 - 966.

BEDMAR E.J., BREWIN N.J., and PHILIPPS D.A., 1984.

Effect of plasmid p 1 J 1008 from *Rhizobium leguminosarum* on symbiotic function of *Rhizobium meliloti*.

Appl. Env. Microbiol. 47 : 876 - 878.

BERGERSEN F.J., 1974

Formation and function of bacteroids.

In : *Biol. Nitrogen. Fixat.*, QUISPÉL A. Ed, North-Holland press, Amsterdam : 473 - 498.

BERINGER J.E., 1974

R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*
J.Gen.Microbiol. 84 : 188 - 198.

BERINGER J.E., JOHNSTON A.W.B. and WELLS B., 1977

The isolation of conditional ineffective mutants of *Rhizobium leguminosarum*
J.Gen.Microbiol. 98 : 339 - 343.

BERINGER J.E., HOGGAN S.A. and JOHNSTON A.W.B., 1978

Linkage mapping in *Rhizobium leguminosarum* by means of R.plasmid
 - mediated recombination.
J.Gen.Microbiol. 104 : 201 - 207.

BERINGER J.E., BREWIN N.J. and JOHNSTON A.W.B., 1980

The genetic analysis of *Rhizobium* in relation to symbiotic nitrogen
 fixation.
Heredity 45 : 161 - 186.

BERRY J.O. and ATHERLY A.G., 1984.

Induced plasmid - genome rearrangements in *Rhizobium japonicum*
J.Bact. 157 : 218 - 224.

BETTER M., LEWIS B., CORBIN D., DITTA G. and HELINSKI R., 1983.

Structural relationship among *Rhizobium meliloti* symbiotic promoters.
Cell. 35 : 479 - 485.

BEYNON J.L., BERINGER J.E. and JOHNSTON A.W.B., 1980.

Plasmids and host-range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*.
J.Gen.Microbiol. 120 : 421 - 429.

BHAGWAT A.A. and THOMAS J., 1983.

Legume - *Rhizobium* interactions : Role of cowpea root exudate in
 polysaccharide synthesis and infectivity of *Rhizobium* species.
Arch.Microbiol. 136 : 102 - 105.

BHUWANESWARI T.V., PUEPPKE S.G. and BAUER W.D., 1978.

Role of lectins in plant - microorganism interactions.

I Binding of soybean lectin to *Rhizobia*.

Plant.Physiol. 60 : 485 - 491.

BHUWANESWARI T.V. and BAUER W.D., 1978.

Role of lectins in plant - microorganism interactions.

III influence of Rhizosphere - Rhizoplane culture conditions on the
 soybean lectin - binding properties of *Rhizobia*.

Plant Physiol. 62 : 71 - 74.

BHUWANESWARI T.V. , MILLS K.K., CRIST D.K., EVANS W.R. and
 BAUER W.D., 1983.

Effects of culture age on symbiotic infectivity of *Rhizobium japonicum*
J.Bact. 153 : 443 - 451.

BISSELING T., VAN DEN BOS C., VAN KAMMEN A., VAN DER PLOEG M.,
 VAN DUIJN P. and HOUWERS A., 1977.

Cytofluorometrical determination of the DNA contents of bacteroids
 and corresponding broth - cultured *Rhizobium* bacteria.

J.Gen.Microbiol. 101 : 79 - 84.

- BOHLOOL B.B. and SCHMIDT E.L., 1974.
Lectins : A possible basis for specificity in the *Rhizobium* - legume root nodule symbiosis.
Science 185 : 269 - 271.
- BOLTON E., GLYNN. P. and O'GARA F., 1984.
Site specific transposition of Tn7 into a *Rhizobium meliloti* megaplasmid.
Mol.Gen. Genet. 193 : 153 - 157.
- BREMER W., KOOISTRA J., HELLINGWERF K.J. and KONINGS W.N., 1984.
Role of the electrochemical proton gradient in genetic transformation of *Haemophilus influenzae*.
J.Bact. 157 : 868 - 873.
- BREWIN N.J., BERINGER J.E., BUCHANAN - WOLLASTON A.V., JOHNSTON A.W.B. and HIRSCH P.R., 1980.
Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in *Rhizobium leguminosarum*.
J.Gen.Microbiol. 116 : 261 - 270.
- BUCHANAN - WOLLASTON A.V., BERINGER J.E., BREWIN N.J., HIRSCH P.R. and JOHNSTON A.W.B., 1980.
Isolation of symbiotically defective mutants in *Rhizobium leguminosarum* of the transposon Tn5 into a transmissible plasmid.
Mol.gen.Genet. 178 : 185 - 190.
- BUCHANAN - WOLLASTON A.V., CANNON M.C. and CANNON F.C., 1981.
The use of cloned Nif (Nitrogen fixation) DNA to investigate transcriptional regulation of Nif expression in *Klebsiella pneumoniae*
Mol.Gen.Genet. 184 : 102 - 106.
- BULLERJAHN G.S. and BENZINGER R.H., 1982.
Genetic transformation of *Rhizobium leguminosarum* by plasmid DNA.
J.Bact. 150 : 421 - 424.
- BURKARDT B. and BURKARDT H.J., 1984.
Vizualization and exact molecular weight determination of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid
J.Mol-Biol. 175 : 213 - 218.
- CADMUS M.C., BURTON K.A. and SLODKI M.E., 1982.
Growth - related substituent changes in exopolysaccharides of fast-growing *Rhizobia*.
Appl. Environ. Microbiol. 44 : 242 - 245.
- CANNON F.C., RIEDEL G.E. and AUSUBEL F.M., 1977.
Recombinant plasmids that carry part of the nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74 : 2963 - 2967.
- CANTRELL M.A., HICKOK R.E. and EVANS H.J., 1982.
identification and characterization of plasmids in hydrogen uptake positive and hydrogen uptake negative strains of *Rhizobium japonicum*.
Arch. Microbiol. 131 : 102 - 106.

CARLSON R.W., 1984.

Heterogeneity of *Rhizobium* lipopolysaccharides
J. Bact. 158 : 1012 - 1017.

CASSE F., BOUCHER C., JULLIOT J.S., MICHEL M. and DENARIE J., 1979
identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis.
J. Gen. Microbiol. 113 : 229 - 242.

CAVIEDES M.A., MEGIAS M., GIL A.M., PALOMARES A.J. and RUIZ -
BERRAQUERO F., 1982.
Correlation between extracellular polysaccharide composition and
nodulation ability in *Rhizobium trifolii*.
Arch. Microbiol. 133 : 20 - 22.

CEN Y., BENDER G.L., TRINICK M.J., MORRISON N.A., SCOTT K.F.,
GRESSHOFF P.M., SHINE J. and ROLFE B.G., 1982.
Transposon mutagenesis in *Rhizobia* which can nodulate both legumes
and the nonlegume *Parasponia*.
Appl. Envir. Microbiol. 42 : 233 - 236.

CHANG S. and COHEN S.N. , 1979
High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts
by plasmid DNA.
Mol. Gen. Genet. 168 : 111 - 115.

CHANG S., 1982.
Plasmid transformation and preparation
In : *genet. engeneering techn.*, New-York Acad. Press : 333 - 335.

CHAUSTOVA L.P., GRINIUS L.L., GRINIUVIENE B.B., JASAITIS A.A.,
KADZIAUSKAS J.P. and KIAUSINYTE R.J., 1980.
Studies on energy supply for genetic processes.
Involvement of membrane potential in genetic transformation of
Bacillus subtilis.
Eur. J. Biochem. 103 : 349 - 357.

COHEN S.N., CHANG A.C.Y. and HSU L., 1972.
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria : genetic transformation
of *Escherichia coli* by R-factor DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 69 : 2110 - 2114.

CORRAL E., MONTOYA E. and OLIVARES J., 1978.
Sensitivity to phages in *Rhizobium meliloti* as a plasmid consequence.
Microbios lett. 5 : 77 - 80.

- COSLOY S.D. and OISHI M., 1973.
genetic transformation in *Escherichia coli* K 12
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 70 : 84 - 87.
- COUETDIC G., NICOLAS F. and MICHEL-BRIAND Y., 1983.
Transformation d'*Escherichia coli* et de différentes espèces de
Pseudomonas par un ADN plasmidique isolé de *Pseudomonas testosteroni*.
C.R. Acad. Sci., Paris, 297 : 25 - 28.
- COURTOIS B., HORNEZ J.P., TAILLEZ R., COURTOIS J. et DERIEUX J.C., 1982.
Methode rapide de dosage des exopolysaccharides solubles produits par
Rhizobium meliloti.
C.R. Acad. Sci., Paris, 294 : 95 - 98.
- COURTOIS J., 1982.
Etat de compétence et transformation chez *Rhizobium meliloti*
Thèse de 3ème cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- CURRIER T.C. and NESTER E.W., 1976.
Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight
from bacteria
Anal. Biochem. 76 : 431 - 441.
- DALE NOEL K., SANCHEZ A., FERNANDEZ L., LEEMANS S. and CEVALLOS M.A.,
1984.
Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions
J.Bact. 158 : 148 - 155.
- DAZZO F.B. and HUBBELL D.H., 1975.
Cross - reactive antigens and lectins as determinants of symbiotic
specificity in *Rhizobium* - clover association.
Appl. Microbiol. 30 : 1017 - 1033.
- DAZZO F.B., 1981.
Bacterial attachment as related to cellular recognition
in the *Rhizobium*-legume symbiosis.
J. Supramolec. Struct. Cell biochem. 16 : 29 - 41.
- DAZZO F.B. and HRABAK E.M., 1981.
Presence of Trifoliin A a *Rhizobium*-binding lectin in clover root exudate.
J.Supramolec. Struct. Cell Biochem. 16 : 133 - 138.
- DAZZO F.B., TRUCHET G.L., SHERWOOD J.E., HRABAK E.M. and GARDIOL A.E.,
1982.
Alteration of the Trifoliin A, -binding capsule of *Rhizobium trifolii* 0403
by enzymes released from clover roots.
Appl. Envir. Microbiol. 44 : 478 - 490.
- DAZZO F.B., TRUCHET G.L. and KIJNE J.W., 1982.
Lectin involvement in root-hair tip adhesion as related to the *Rhizobium*-
clover symbiosis.
Physiol. PLant 56 : 143 - 147.

DAZZO F.B. and TRUCHET G.L., 1983.

Interactions of lectins and their saccharide receptors in the Rhizobium-legume symbiosis.

J. Memb. Biol. 73 : 1-16.

DAZZO F.B. and SCHERWOOD J.E., 1983.

Trifoliin A : a Rhizobium-recognition lectin in white clover roots.

In : Chem Taxonomy, Molec. Biol., Funct plant lectins, Liss A.R.-ed, New-York : 209 - 223.

DE BRUIJN F.J. and AUSUBEL F.M., 1983.

The cloning and characterization of the gln F (ntr A) gene of *Klebsiella pneumoniae* : Role of gln F (ntr A) in the regulation of nitrogen fixation (nif) and other nitrogen assimilation genes.

Mol. Gen. Genet. 192 : 342 - 353.

DENARIE J. et TRUCHET G., 1979.

La symbiose Rhizobium- legumineuses : Roles respectifs des partenaires.

Physiol. Veg. 4 : 643 - 667.

DENARIE J. BOISTARD P. and CASSE-DELBART F., 1981.

Indigenous plasmids of Rhizobium.

In : Int. Rev. Cytol. Suppl 13, New-York Acad.press : 225 - 246.

DILWORTH M.J. and WILLIAMS D.C., 1967.

Nucleic acid changes in bacteroids of *Rhizobium lupini* during nodule development.

J.Gen. Microbiol. 48 : 31 - 36.

DIXON R., ALVAREZ-MORALES A., CLEMENTS J., DRUMMOND M., FILSER M. and MERRICK M., 1983.

Regulation of transcription of the nitrogen fixation operons.

In : Mol. Genet. plants and animals, Miami wintersymp 20, VOELLNY R, DOWNEY K, AHMAD-F, and SCHULTZ J. Edts : 223 - 232.

DJORDJEVIC M.A., ZURKOWSKI W. and ROLFE B.G., 1982.

Plasmids and stability of symbiotic properties of *Rhizobium trifolii*.

J. Bact. 151 : 560 - 568.

DJORDJEVIC M.A., ZURKOWSKI W., SHINE J. and ROLFE B.G., 1983.

Sym plasmid transfer to various symbiotic mutants of *Rhizobium trifolii*, *R. leguminosarum* and *R. meliloti*.

J. Bact. 156 : 1035 - 1045.

DORAN J.L. and PAGE W.J., 1983.

Heat sensitivity of *Azotobacter vinelandii* genetic transformation.

J. Bact. 155 : 159 - 168.

DROZANSKA D. and LORKIEWICZ Z., 1978.

Genetic transformation in *Rhizobium trifolii*

Acta Microbiol. Polon. 27 : 81 - 88.

- DROZANSKA D., DROZANSKI W. and LORKIEWICZ Z., 1982.
Effect of glycine on the transformation of *Rhizobium trifolii*.
Microbios 35 : 31 - 38
- DUNICAN L.K. and TIERNEY A.B., 1973.
Transformation of an R - factor from *Pseudomonas aeruginosa* into
Rhizobium trifolii.
Mol. Gen. Genet. 126 : 187 - 190.
- ECKHARDT T., 1978.
A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic
acid in bacteria.
Plasmid 1 : 584 - 588.
- FORRAI T., VINCZE E., BANFALVI Z., KISS G.B., RANDHAVA G.S. and
KONDOROSI A., 1983.
Localization of symbiotic mutations in *Rhizobium meliloti*
J. Bact. 153 : 635 - 643.
- GABOR M., 1965.
Transformation of streptomycin markers in rough strains of
Rhizobium lupini. The relation between the determinant of streptomycin
dependence and those for streptomycin resistance and sensitiveness.
Genetics 52 : 905 - 913.
- GRAHAM T.L., 1981.
Recognition in *Rhizobium* - legume symbioses
In : *Int. Rev. Cytol., Suppl.* 13, Atherly A. Ed., New-York Acad.
press : 127 - 148.
- GRESSHOFF P.M. and ROLFE B.G., 1978.
Viability of *Rhizobium* bacteroids isolated from soybean nodule
protoplasts.
Planta 142 : 329 - 333.
- GRIST R.W. and BUTLER L.O., 1981.
The use of M₁ medium in transformation of *Streptococcus pneumoniae*
J. Gen. Microbiol. 127 : 147 - 154.
- GRUNSTEIN M. and HOGNESS D.S., 1975.
Colony hybridization : a method for the isolation of cloned DNAs
that contain a specific gene.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 72 : 3961 - 3965.
- HAAKER H. and VEEGER C., 1984.
Enzymology of nitrogen fixation.
Trends in biochem. Sci. 9 : 188 - 192.
- HAHN M. and HENNECKE H., 1984.
Localized mutagenesis in *Rhizobium japonicum*.
Mol. Gen. Genet. 193 : 46 - 52.
- HALVERSON L.J. and STACEY G., 1984.
Host recognition in the *Rhizobium* - soybean Symbiosis.
Plant Physiol. 74 : 84 - 89.
- HANDELSMAN J., UGALDE R.A. and BRILL W.J., 1984.
Rhizobium meliloti competitiveness and the alfalfa agglutinin.
J. Bact. 157 : 703 - 707.

HASSANI L., 1983.

La lysogénie chez *Rhizobium meliloti* - Etude de quelques exemples de transduction.

Thèse de 3ème cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille.

HATTORI J. and JOHNSTON D.A., 1984.

Fast growing *Rhizobium japonicum* that effectively nodulates several commercial *Glycine max* L. merrill cultivars.

Appl. envir. Microbiol. 48 : 234 - 235.

HEEFNER D.L., SQUIRES CH., EVANS R.J., KOPP B.J. and YARUS M.J., 1984.

Transformation of *Clostridium perfringens*.

J. Bact. 159 : 460 - 464.

HEUMANN W., 1968.

Conjugaison in starforming *Rhizobium lupini*.

Mol. Gen. Genet. 102 : 132 - 144.

HIGASHI S., 1967.

Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor

J. Gen. Appl. Microbiol. 13 : 391 - 403.

HIMENO M., SHIBATA T., KAWAHARA Y., HANAOKA Y. and HOMANO T., 1984.

Effect of polyethylene glycol in plasmid DNA solution on transformation of CaCl_2 - treated *Escherichia coli*

Agric. Biol. Chem. 48 : 657 - 662.

HOMBRECHER G., BREWIN N.J. and JOHNSTON A.W.B., 1981.

Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability plasmids in *Rhizobium leguminosarum* and *R. phaseoli*.

Mol. Gen. Genet. 182 : 133 - 136.

KOOYKAAS P.J.J., VAN BRUSSEL A.A.N., DEN DULK-RAS H., VAN SLOGTEREN G.M.S. and SCHILPEROORT R.A., 1981.

Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different Rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*.

Nature 291 : 351 - 353.

HRABAK E.M., URBANO V.M. and DAZZO F.B., 1981.

Growth - phase dependant immuno determinants of *Rhizobium trifolii* lipopolysaccharide which bind trifoliin A, a white clover lectin.

J. Bact. 148 : 697 - 711.

JOHNSTON A.W.B., BEYNON J.L., BUCHANAN-WOLLASTON A.V., SETCHELL S.M., HIRSCH P.R. and BERINGER J.E., 1978.

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

Nature 276 : 634 - 636.

JORDAN D.C., 1982.

Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen.

nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants.

Int. Journ. of Syst. Bacteriol. 32 : 136 - 139.

JOUANIN L., DELAJUDIE P., BAZETOUX S. and TRUCHET T., 1981.
DNA sequence homology in *Rhizobium meliloti* plasmids.
Mol. Gen. Genet. 182 : 189 - 195.

JULLIOT J.S., DUSHA I., RENALIER M.H., TERZAGHI B., GARNERONE A.M.
and BOISTARD P., 1984.

An RP4 - prime containing a 285 Kb fragment of *Rhizobium meliloti*
p Sym megaplasmid : structural characterization and utilization
for genetic studies on symbiotic functions controlled by p Sym.
Mol. Gen. Genet. 193 : 17 - 26.

KAMBERGER W., 1979.

Role of cell surface polysaccharides in the *Rhizobium* - pea symbiosis.
FEMS Microbiol. Lett. 6 : 361 - 365.

KANESHIRO T., BAKER F.L. and JOHNSON D.E. 1983.

Pleomorphism and acetylene - reducing activity of free-living *Rhizobia*
J. Bact. 153 : 1045 - 1050.

KEISTER D.L., 1975.

Acetylene reduction by pure culture of *Rhizobia*.
J. Bact. 123 : 1265 - 1268.

KISS G.B. and KALMAN Z., 1982.

Transformation of *Rhizobium meliloti* 41 with plasmid DNA
J. Bact. 150 : 465 - 470.

KLEBE R.J., HARRISS J.V., SHARP Z.D. and DOUGLAS M.G., 1983.

A general method for polyethylene - glycol - induced genetic
transformation of bacteria and yeast.
Gene 25 : 333 - 341.

KONDOROSI A., SVAB Z., KISS G.B. and DIXON R.A., 1977.

Ammonia assimilation and nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*.
Mol. Gen. Genet. 151 : 221 - 226.

KONDOROSI A., KISS G.B., FORRAI T., VINCZE C.E. and BANFALVI Z.,
1977.

Circular linkage map of the *Rhizobium meliloti* chromosome
Nature (Lond.) 268 : 525 - 527.

KONDOROSI A., KONDOROSI E., PANKHURST C.E., BROUGHTON W.J.
and BANFALVI Z., 1982.

Mobilization of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid carrying nodulation
and nitrogen fixation genes into other *Rhizobia* and *Agrobacterium*.
Mol. Gen. Genet. 188 : 433 - 439.

KONDOROSI E., BANFALVI Z., SLASKA - KISS C. and KONDOROSI A., 1983.
Analysis of symbiotic nitrogen fixation genes carried by *Rhizobium*
meliloti megaplasmid.

Plant Molec. Biol. LISS A.R. Ed., New-York press : 259 - 275.

KONDOROSI E., BANFALVI Z. and KONDOROSI A., 1984.

Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium*
meliloti : Identification of nodulation genes.
Mol. Gen. Genet. 193 : 445 - 452.

KOWALSKI M., 1970.

Transducing phages of *Rhizobium meliloti*.
Acta Microbiol. Polon., Ser. A. 2 : 109 - 144.

- KOWALSKI M. et DENARIE J., 1972 .
Transduction d'un gène controlant l'expression de la fixation d'azote chez *Rhizobium meliloti*.
C.R. Acad. Sci. Paris, Série D 275 : 141 - 144.
- KOWALSKI M., 1967.
Transduction in *Rhizobium meliloti*.
Acta Microbiol. Polon. 16 : 7 - 12.
- KRASILNIKOV N.A., 1941.
Variability of nodule bacteria
Doklady Acad. Nauk SSSR. 31 : 90 - 92.
- KROL A.J.M., HONTELEZ J.G.L., VAN DEN BOS. R.C. and VAN KAMMEN A., 1980.
Expression of large plasmids in the endosymbiotic form of *Rhizobium leguminosarum*.
Nucl. Acid. Res. 8 : 4337 - 4347.
- KROL A.J.M., HONTELEZ J.G.J. and VAN KAMMEN A., 1982.
Only one of the large plasmids in the *Rhizobium leguminosarum* strain PRE is strongly expressed in the endosymbiotic stage.
J.Gen. Microbiol. 128 : 1839 - 1847.
- LACKS S., GREENBERG B. and NEUBERGER M., 1975a.
Identification of a deoxyribonuclease implicated in genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*.
J. Bact. 123 : 222 - 232.
- LACKS S. and NEUBERGER M., 1975 b.
Membrane location of deoxyribonuclease implicated in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*.
J. Bact. 124 : 1321 - 1329.
- LACKS S. and GREENBERG B., 1976.
Single - strand breakage on binding of DNA to cells in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*.
J. Mol. Biol. 101 : 255 - 275.
- LACKS S., 1979.
Uptake of circular deoxyribonucleic acid and mechanism of deoxyribonucleic acid transport in genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae*.
J. Bact. 138 : 404 - 409.
- LAW I.J., YAMAMOTO Y., MORT A.J. and BAUER W.D., 1982.
Nodulation of soybean by *Rhizobium japonicum* mutants with altered capsule synthesis.
Planta 154 : 100 - 109.
- LAW I.J. and STRIJDOM B.W., 1984.
Role of lectins in the specific recognition of *Rhizobium* by *Lotononis Bainesii*.
Plant Physiol. 74 : 779 - 785.
- LINDBERG A.A., 1977.
Bacterial surface carbohydrate and bacteriophage adsorption.
In : Surface carbohyd. of the prokaryotic cell, SUTHERLAND I.W. Ed.,
Acad Press : 289 - 357.
- LOPEZ P., PEREZ URENA M.T. and ESPINOSA M., 1983.
Influence of temperature - induced competence in the genetic transformation of *Bacillus subtilis*.
Microbios, 38 : 205 - 216.

- MAIER R.J., and BRILL W.J., 1976.
Ineffective and non - nodulating mutant strains of *Rhizobium japonicum*.
J. Bact. 127 : 763 - 769.
- MANDEL M. and HIGA A., 1970.
Calcium - dependent bacteriophage DNA infection.
J.Mol. Biol. 53 : 159 - 162.
- MAOUI K.R., BECHET M. and GUILLAUME J.B.
Megaplasmid transfer and incompatibility between plasmids of two different strains of *Rhizobium meliloti*.
Microbios, in press.
- MASS R., 1983.
An improved colony hybridization method with significantly increased sensitivity for detection of single genes.
Plasmid 10 : 296 - 298.
- MEADE H.M. and SIGNER E.R., 1977.
Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 74 : 2076 - 2078.
- MEIJER E.G.M. and BROUGHTON W.J., 1982.
Biology of legume - *Rhizobium* interactions in nodule formation.
In : Molec. Biol. Plant Tumors, Acad. press : 107 - 129.
- MEJEAN V. and CLAVERYS J.P., 1984.
Use of a cloned DNA fragment to analyse the fate of donor DNA in transformation of *Streptococcus pneumoniae*.
J. Bact. 158 : 1175 - 1178.
- MILLER R.W. and TREMBLAY P.A., 1983.
Cytoplasmic membrane of *Rhizobium meliloti* bacteroids.
I Alteration in lipid composition, physical properties and respiratory proteins.
Can. J. Biochem. Cell. Biol. 61 : 1334 - 1340.
- MIURA K.I., 1967.
Preparation of bacterial DNA by the phenol - pH9 - RNases method.
Meth in Enzym. 12 : 543 - 545.
- MORRISON D.A., LACKS S.A., GUILD W.R. and HAGEMAN J.M., 1983
Isolation and characterization of three new classes of transformation - deficient mutants of *Streptococcus pneumoniae* that are defective in DNA transport and genetic recombination.
J. Bact. 156 : 281 - 290.
- MORRISON D.A., CEN C.Y., TRINICK M.J., SCHINE J. and ROLFE B.G., 1983b
Heat curing of a sym plasmid in a fast-growing *Rhizobium* sp that is able to nodulate legumes and the non-legume *Parasponia* sp.
J. Bact. 153 : 527 - 531.
- MORT A.J. and BAUER W.D., 1980.
Composition of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum* Changes with culture age and correlations with binding of soybean seed lectin to the bacteria.
Plant Physiol. 66 : 158 - 163.

- MORT A.J. and BAUER W.D., 1982.
Application of two new methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharide fragments. Structure of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum* that bind soybean lectin.
J. Biol. Chemist. 257 : 1870 - 1875.
- MULDER J.A. and VENEMA G., 1982.
Transformation - deficient mutants of *Bacillus subtilis* impaired in competence - specific nuclease activities.
J. Bact. 152 : 166 - 174.
- MUTAFTSCHIEV S., VASSE J. and TRUCHET G., 1982.
Exostructures of *Rhizobium meliloti*.
Fems Microbiol. Lett. 13 : 171 - 175.
- MYLROIE J.R., FRIELLO D.A. and CHAKRABARTY A.M., 1978.
Transformation of *Pseudomonas putida* with chromosomal DNA.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 82 : 281 - 288.
- NOACK D., FRIEDLER G. and GEUTHER R., 1984.
Gene expression after transformation of *Streptomyces lividans* protoplasts with plasmid P 1 J 2 DNA.
Zeitschrift für allgemeine Mikrobiol. 24 : 161 - 166.
- NUTI M.P., LEDEBOER A.M., LEPIDI A.A. and SCHILPEROORT R.A., 1977.
Large plasmids in different *Rhizobium* species.
J. Gen. Microbiol., 100 : 241 - 248.
- NUTI M.P., LEPIDI A.A., PRAKASH R.K., SCHILPEROORT R.A. and CANNON F.C., 1979.
Evidence for nitrogen fixing (nif) genes on indigenous *Rhizobium* plasmids.
Nature, 282 : 533 - 535.
- NUTMAN P.S., 1969.
Genetic of symbiosis and nitrogen fixation in legumes.
Proc. Roy. Soc. B., 172 : 417 - 437.
- O'GARA F. and SHANMUGAM K.T., 1976.
Control of symbiotic nitrogen fixation in Rhizobia. Regulation of NH_4^+ assimilation.
Biochem. et Biophys. Acta. 451 : 342 - 352.
- OLIVARES J., BEDMAR E.J. and MARTINEZ-MOLINA E., 1984.
Infectivity of *Rhizobium meliloti* as affected by extracellular polysaccharides.
J. Appl. Bacteriol. 56 : 389 - 393.
- ORR - WEARVER T.L., SZOSTAK J.W. and ROTHSTEIN R.J., 1983.
Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids.
Meth. in Enzymol. 101 : 228 - 245.
- ORZECH Mc DONALD K. and BURKE W.F., 1984.
Plasmid transformation of *Bacillus sphaericus* 1593.
J. Gen. Microbiol. 130 : 203 - 208.

- PAAU A.S. and COWLES J.R., 1975.
comparison of DNA polymerase of *Rhizobium meliloti* and alfalfa bacteroids.
Plant Physiol. 56 : 526 - 528.
- PAAU A.S., LEE D. and COWLES J.R., 1977.
Comparison of nucleic acid content in populations of free-living and symbiotic *Rhizobium meliloti* by flow microfluorometry.
J. Bact. 129 : 1156 - 1158.
- PAAU A.S., COWLES J.R. and RAVEED D., 1978.
Development of bacteroids in alfalfa (*Medicago sativa*) nodules.
Plant Physiol. 62 : 526 - 530.
- PAAU A.S., ORO J. and COWLES J.R., 1979.
DNA content of free living *Rhizobia* and bacteroids of various *Rhizobium* - legume associations.
Plant Physiol, 63 : 402 - 405.
- PAAU A.S. and BRILL W.J., 1982.
Comparison of the genomic arrangement and the relative transcription of the nitrogenase genes in *Rhizobium meliloti* during symbiotic development in alfalfa root nodules.
Can. J. Microbiol. 28 : 1330 - 1339.
- PAGE W.J. and TIGERSTROM M., 1979.
Optimal conditions for transformation of *Azotobacter vinelandii*
J. Bact. 139 : 1058 - 1061.
- PALOMARES A., MONTOYA E. and OLIVARES J., 1978.
The quality and rate of extracellular polysaccharides produced by *Rhizobium meliloti* and their inducing effect on polygalacturonase production in legume roots as derived from the presence of extrachromosomal DNA.
Microbios 22 : 7 - 13.
- PUEPPKE S.G., 1983.
Soybean lectin : Does it have an essential role in the *Rhizobium* - soybean symbiosis ?
In : Chem. taxonomy, Molec. Biol. and funct. plant. lectins, LISS A.R. Ed., New-York : 225 - 236.
- RAINA J.L. and MODI V.V., 1969.
Genetic transformation in *Rhizobium*.
J. Gen. Microbiol. 57 : 125 - 130.
- RAINA J.L. and MODI V.V., 1971.
Further studies on genetic transformation in *Rhizobium*.
J. Gen Microbiol. 65 : 161 - 165.
- RAINA J.L. and MODI V.V., 1972.
Deoxyribonucleate binding and transformation in *Rhizobium japonicum*.
J. Bact. 111 : 356 - 360.
- RANDEN J.V. and VENEMA G., 1981.
Assimilation of single - stranded donor deoxyribonucleic acid fragments by nucleoids of competent cultures of *Bacillus subtilis*.
J. Bact. 145 : 1177 - 1188.

- REIJNDERS L., VISSER L., AALBERS A.M.T., VAN KAMMEN A. and HOUWERS A., 1975.
A comparison of DNA from free living and endosymbiotic *Rhizobium leguminosarum* (strain PRE).
Biochem. Biophys. Acta. 414 : 206 - 216.
- ROSENBERG C., BOISTARD P., DENARIE J. and CASSE-DELBART F., 1981.
Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*.
Mol. Gen. Genet. 184 : 326 - 333.
- ROSENBERG C., CASSE-DELBART F., DUSHA I., DAVID M. and BOUCHER L., 1982.
Megaplasmids in the plant - associated bacteria *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas solanacearum*.
J. Bact. 150 : 402 - 406.
- RODRIGUEZ - SOLORZANO L., RODRIGUEZ J.C., ORTIZ J.M. and MELLADO A., 1984.
Efficient transformation of a *Yersinia enterocolitica* strain (serotype O:3) by pBR 322 DNA.
Fems Microbiol lett. 23 : 329 - 331.
- RUVKUN G.B. and AUSUBEL F.M., 1980.
Interspecies homology of nitrogenase genes.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 77 : 191 - 195.
- RUVKUN G.B., SUNDARESAN V. and AUSUBEL F.M., 1982.
Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes.
Cell. 29 : 551 - 559.
- SANCHEZ F., BOLIVAR F. and MARTUSCELLI J., 1976.
Transformation of *Escherichia coli* by chromosomal deoxyribonucleic acid from *Salmonella Typhi*.
J. Bact. 125 : 747 - 749.
- SANDERS R.E., CARLSON R.W. and ALBERSHEIM P., 1978.
A *Rhizobium* mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion
Nature 271 : 240 - 242.
- SANDERS R.E., RALEIGH E. and SIGNER E., 1981.
Lack of correlation between extracellular polysaccharide and nodulation ability in *Rhizobium*.
Nature 292 : 148 - 149.
- SCHMIDT J., JOHN M., KONDOROSI E., KONDOROSI A., WIENEKE U., SCHRODER G., SCHRODER J. and SCHELL J., 1984.
Mapping of the protein - coding regions of *Rhizobium meliloti* common nodulation genes.
The EMBO J. 3 : 1705 - 1711.
- SCOTT B. and RONSON C.W., 1982.
Identification and mobilization by cointegrate formation of a nodulation plasmid in *Rhizobium trifolii*.
J. Bact. 151 : 36 - 43.
- SELVARAJ G. and IYER V.N., 1981.
Genetic transformation of *Rhizobium meliloti* by plasmid DNA.
Gene 15 : 279 - 283.

- SEN M., PAL T.K. and SEN S.P., 1969.
Intergenetic transformation between *Rhizobium* and *Azotobacter*.
Antonie Van Leeuwenhoek 35 : 533 - 540.
- SETO H. and TOMASZ A., 1975.
Selective release of a deoxyribonucleic acid-binding factor from
the surface of competent pneumococci.
J. Bact. 124 : 969 - 976.
- SHANTHARAM S. and WONG P.P., 1982.
Recognition of leguminous hosts by a promiscuous *Rhizobium* strain.
Appl. Envir. Microbiol. 43 : 677 - 685.
- SHARIFI E. , 1984.
Parasitic origins of nitrogen - fixing *Rhizobium* - legume symbiosis.
A. review of the evidence.
Biosystems. 16 : 269 - 289.
- SHERWOOD J.E., VASSE J.M., DAZZO F.B. and TRUCHET G.L., 1984.
Development and trifoliin A - binding ability of the capsule
of *Rhizobium trifolii*.
J. Bact. 159 : 145 - 152.
- SIBOLD L. and ELMERICH C., 1982.
Constitutive expression of nitrogen fixation (*nif*) genes of
Klebsiella pneumoniae due to a DNA duplication.
EMBO J. 1 : 1551 - 1558.
- SKOGEN - HAGENSON M.J. and ATHERLY A.G., 1983.
High frequency induction of nodulation and nitrogen fixation
mutants of *Rhizobium japonicum*.
J. Bact. 156 : 937 - 940.
- SKORUPSKA A., STEPKOWSKI T. and LORKIEWICZ Z., 1984.
Plasmids and bacteriocinogenicity of nodulating and non-nodulating
Rhizobium trifolii strains
Microbios 39 : 41-48.
- SMITH H., DEVOS W. and BRON S., 1983 a.
Transformation in *Bacillus subtilis* : properties of DNA - binding -
deficient mutants.
J. Bact. 153 : 12 - 20.
- SMITH H., WIERSMA K., BRON S. and VENEMA G., 1983 b.
Transformation in *Bacillus subtilis* : purification and partial
characterization of a membrane - bound DNA - binding protein.
J. Bact. 156 : 101 - 108.
- SOLHEIM B. and RAA J., 1973.
Characterization of the substances causing deformation of root
hairs of *trifolium repens* when inoculated with *Rhizobium trifolii*.
J. Gen Microbiol. 77 : 241 - 247.
- SOLHEIM B., 1983.
Possible role of lectins in binding Rhizobia to host roots.
In : lectins, Vol III, BOG - HANSEN and SPENGLER Ed., Berlin :
540 - 547.

SOUTHERN E.M., 1975.

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. 98 : 503 - 517.

STACEY G., PAAU A.S., DALE-NOEL K., MAIER R.J., SIVER L.E. and BRILL W.J., 1982.

Mutants of *Rhizobium japonicum* defective in nodulation :

Arch. Microbiol., 132 : 219 - 224.

STEVENS S.E., PORTER J.R. and PORTER R.D., 1980.

Transformation in *Agmellum quadruplicatum*

Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 77 : 6052 - 6056.

STEWART G.J., CARLSON C.A. and INGRAHAM J.L., 1983.

Evidence for an active role of donor cells in natural transformation of *Pseudomonas stutzeri*.

J. Bact. 156 : 30 - 35.

SUDARESAN V., JONES J.D.G., OW D.W. and AUSUBEL F.M., 1983 a.

Regulation of *nif* genes in *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti*

In : Gene expres., LISS A.R. Ed., New-York press : 175 - 185.

SUNDARESAN V., OW D.W. and AUSUBEL F.M., 1983 b.

Activation of *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* nitrogenase promoters by *gln* (*ntr*) regulatory proteins.

Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 80 : 4030 - 4034.

SUTTON W.D., JENSEN N.M. and SHAW B.D., 1977.

Changes in the number, viability and amino acids incorporating activity of soybean bacteroids.

Plant Physiol. 59 : 741 - 744.

SUTTON W.D., PANKHURST C.E. and GRAIG A.S., 1981

The *Rhizobium* bacteroid state.

In : Int. Rev. Cytol., Suppl. 13, ATHERLY A. Ed., New-York

Acad. press : 149 - 177.

SZETO W.W., ZIMMERMAN J.L., SUNDARESAN V. and AUSUBEL F.M., 1984.

A *Rhizobium meliloti* regulatory genes.

Cell. 36 : 1035 - 1043.

TAKAHASHI W., YAMAGATA H., YAMAGUCHI K., TSUKAGOSHI N. and UDAKA S., 1983.

Genetic transformation of *Bacillus brevis* 47, a protein - secreting bacterium, by plasmid DNA.

J. Bact. 156 : 1130 - 1134.

TICHY P., RYTIR V. and KOHOUTOVA M., 1968.

Genetic transformation and transfection of *Bacillus subtilis* spheroplasts.

Fol. Microbiol. 13 : 510 - 514.

TJEPKEMA J. and EVANS H.J., 1975.

Nitrogen fixation by free - living *Rhizobium* in a defined liquid medium.

Biochem. and Biophys. Res. comm. 65 : 625 - 628.

- TRUCHET G., ROSENBERG G.C., VASSE J., JULLIOT J.S., CAMUT S. and DENARIE J., 1984.
Transfer of *Rhizobium meliloti* pSym genes into *Agrobacterium tumefaciens*: Host-specific nodulation by atypical infection.
J. Bact. 157 : 134 - 142.
- VAN DIE I., VAN OOSTERHOUT A., BERGMANS H. and HOEKSTRA W., 1983.
The influence of phase transition of membrane lipids on uptake of plasmid DNA in *Escherichia coli* transformation.
FEMS Microbiol lett. 18 : 127 - 130.
- VAN RANDEN J. and VENEMA G., 1981.
Assimilation of single - stranded donor deoxyribonucleic acid fragments by nucleoids of competent cultures of *Bacillus subtilis*.
J. Bact. 145 : 1177 - 1188.
- VAN RANDEN J., WIERSMA K. and VENEMA G., 1982 a.
Unstable association in vitro between donor and recipient DNA in *Bacillus subtilis*.
J. Bact. 152 : 275 - 283.
- VAN RANDEN J., WIERSMA K and VENEMA G., 1982 b.
Initiation of recombination during transformation of *Bacillus subtilis* requires no extensive homologous sequences.
Mol. Gen. Genet. 188 : 499 - 507.
- VERMA D.P.S. and LONG S., 1983.
The molecular biology of *Rhizobium* - legume symbiosis
In : *Int. Rev. Cytol. Suppl* 14, New-York Acad. Press : 211 - 245.
- VIJAYAKUMAR M.N. and MORRISON D.A., 1983.
Fate of DNA eclipse complex during genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*.
J. Bact. 156 : 644 - 648.
- VINCENT J.M. , 1980.
Factors controlling the legume - *Rhizobium* symbiosis.
In : *Nitrogen fixat. (Kettering Int. Symp. Nitrogen Fixation)*
103 - 129.
- WAHL G.M., STERN M. and STARK G.R., 1979.
Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzylo methyl - paper and rapid hybridization by using dextran sulfate.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 76 : 3683 - 3687.
- WATSON J.M., SEHOFIELD P.R., RIDGE R.W., DJORDJEVIC M.A., ROLFE B.G. and SHINE J., 1983.
Molecular cloning and analysis of a region of the sym plasmid of *Rhizobium trifolii* encoding clover nodulation functions
Plant. Molec. Biol., LISS A.R. Ed., New-York Press : 303 - 318.
- WEEPNER W.A. and LEACH F.R., 1978.
The initial attachment of transforming DNA to competent *Bacillus subtilis*.
Mol. Gen. Genet. 160 : 131 - 137.

WILSON K.J., HIRSCH L.M., JONES J.D.G. and AUSUBEL F.M., 1983.
Agrobacterium containing cloned Rhizobium meliloti nodulation genes forms ineffective nodules on alfalfa.
In : Adv. in gene techn : Molec. genetics plants and animals,
Acad. press : 233 - 253.

WONG CH., PANKHURST C.E., KONDOROSI A. and BROUGHTON W.T., 1983.
Morphology of root nodules and nodule-like structures formed by Rhizobium and Agrobacterium strains containing a Rhizobium meliloti megaplasmid.
J. Cell Biol. 97 : 787 - 794.

YAO P.Y. and VINCENT J.M., 1976.
Factors responsible for the curling and branching of clover root hairs by Rhizobium.
Plant. Soil 45 : 1-16.

ZIMMERMAN J.L., SZETO W.W. and AUSUBEL F.M., 1983.
Molecular characterization of Tn5 - induced symbiotic (Fix⁻) mutants of Rhizobium meliloti.
J. Bact. 156 : 1025 - 1034.

ZLOTNIKOV K.M., CHATUEV B.M. and KHMELNITSKY M.I., 1984.
A note on the isolation of auxotrophic mutants of Rhizobium japonicum
J. Appl. Bact. 56 : 173 - 174.

ZURKOWKI W., HOFFMAN M. and LORKIEWICZ Z., 1973.
Effect of acriflavine and sodium dodecyl sulfate on infectiveness of Rhizobium trifolii.
Acta Microbiol. Polon., Ser. A, 5 : 55 - 60.

ZURKOWSKI W. and LORKIEWICZ Z., 1978.
Effective method for the isolation of non nodulating mutants of Rhizobium trifolii.
Genet. Res. (Cambridge) 32 : 311 - 314.

ZURKOWSKI W. and LORKIEWICZ Z., 1979.
Plasmid mediated control of nodulation in Rhizobium trifolii
Arch. Microbiol. 123 : 195 - 201.



036116645

RESUME

L'application d'une technique de transformation génétique à une souche de Rhizobium meliloti M5N1 exigeante en isoleucine et en valine (Ile⁻ Val⁻) a permis le transfert des caractères Ile⁺ et Val⁺.

Les cellules transformées obtenues qui présentent des modifications morphologiques par rapport à la souche initiale ont aussi perdu le caractère muqueux ; certaines de ces cellules sont devenues incapables d'infecter la luzerne.

L'expression des caractères correspondant à une information génétique spécifique, nous avons analysé le contenu plasmidique des bactéries transformées. Cette étude a révélé d'importantes modifications soit la disparition des plasmides indigènes de la souche initiale avec ou sans apparition d'un nouveau plasmide de poids moléculaire inférieur à ceux initialement présents. Grâce à l'utilisation des techniques d'hybridation DNA/DNA, nous avons montré que le DNA des plasmides indigènes de la souche parentale est toujours présent chez les clones transformés. Non visualisable sous une forme plasmidique, suite au transfert génétique, il a vraisemblablement été intégré dans le chromosome.

L'analyse des petits plasmides apparus chez les souches transformées indique qu'ils ne proviennent pas du plasmide moyen de la souche initiale mais qu'ils pourraient s'être constitués à partir du DNA transformant.

L'infection de plantules de luzerne par des clones transformés a conduit à l'obtention de clones ayant réacquis à la fois les caractères phénotypiques de la souche initiale ainsi que les plasmides présents chez les bactéries avant la transformation.

L'intégration des plasmides dans le chromosome a été confirmée.

MOTS CLES : RHIZOBIUM - TRANSFORMATION GENETIQUE - PLASMIDES
GENES NIF - FIXATION DE L'AZOTE

