

N° d'ordre : 1312

50376
1985
231

50376
1985
231

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

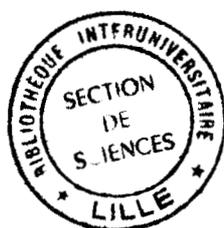
Spécialité : Biochimie

Option : Microbiologie

par

Mohamed OUAHAL

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE RESTRICTION CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI



Soutenue le 6 décembre 1985 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury : MM. J.B. GUILLAUME
J.C. DERIEUX
J. KREMBEL
R. TAILLIEZ

Président
Rapporteur
Examineurs

A mes parents

A ma femme

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à Monsieur le Professeur J.B. GUILLAUME qui, grâce à ses conseils judicieux et à la richesse de son expérience, m'a permis de découvrir le milieu de la recherche et de mener à bien ce travail.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur J.C. DERIEUX qui a bien voulu être le rapporteur de cette thèse.

Je remercie Messieurs les Professeurs J. KREMBEL et R.TAILLIEZ qui m'ont fait l'honneur d'accepter de constituer le jury de soutenance de cette thèse.

Je suis très reconnaissant à Monsieur C. DEFIVES de son aide durant ces années de recherche et de l'intérêt qu'il a toujours manifesté pour ces travaux.

Je voudrais également remercier toutes celles et tous ceux qui, par leur soutien scientifique, technique ou moral, ont concouru à la réalisation de ce travail.

Je ne saurais oublier Mademoiselle T. ZAWADA dont la collaboration me fut précieuse.

TABLE
DES
MATIERES

	Pages
AVANT-PROPOS	1
GENERALITES	
I. Relation bactérie - bactériophage	5
1 - Structure des bactériophages.....	5
2 - Classification des bactériophages.....	5
3 - Infection d'une bactérie par un bactériophage.....	7
a) Adsorption du phage sur la bactérie et injection de l'ADN dans le cytoplasme.....	8
b) Devenir de l'ADN phagique dans le cytoplasme bactérien.....	8
4 - Le cycle lytique.....	9
a) Développement intracellulaire des phages.....	9
b) Phase de maturation et de libération.....	11
5 - Incorporation de l'ADN phagique dans le chromosome bactérien.....	12
6 - Dégradation de l'ADN phagique.....	12
II. Aspect physiologique du phénomène de restriction- modification.....	13
1 - Introduction.....	13
2 - Mise en évidence de la spécificité d'hôte.....	13
3 - Aspect quantitatif du phénomène.....	16
4 - Influence de l'état physiologique des bactéries.....	16
5 - Existence de plusieurs systèmes de R.M. au sein d'une même cellule.....	17
a) Chez <u>Escherichia Coli</u>	17
b) Chez <u>Rhizobium</u>	18
III. Mécanismes de la restriction-modification <u>in vivo</u>	21
1 - Substrat sur lequel s'exerce la R.M.....	21
2 - Les enzymes impliquées dans la dégradation de l'ADN	21
3 - Produits de la restriction de l'ADN <u>in vivo</u>	22

IV. Etude des endonucléases de restriction.....	24
1 - Nomenclature.....	24
2 - Classification.....	24
3 - Particularités communes aux enzymes des trois types..	25
4 - Caractéristiques des enzymes de chaque type.....	26
a) ECoK.....	27
b) ECoRI.....	28
c) ECoP ₁	29
V. Relations entre endonucléases et méthylases.....	30
1 - Aspect génétique.....	30
2 - Les méthylases.....	31
VI. Etude des réactions catalysées par les enzymes de R.M....	32
1 - Formation du complexe de reconnaissance.....	32
a) Fixation de la SAM.....	32
b) Activation de l'enzyme.....	32
c) Formation du complexe initial.....	34
d) Formation du complexe de reconnaissance.....	34
2 - ADN dont les deux chaînes sont modifiées.....	35
3 - ADN hétéroduplex.....	35
4 - ADN non modifié.....	35
a) Complexe retenu sur filtre.....	36
b) Translation sur l'ADN.....	36
c) Coupure de l'ADN.....	36

MATERIEL ET METHODES

I. Souches bactériennes.....	38
II. Souche de bactériophage.....	38
III. Milieux de culture.....	38
1 - Milieu <u>Rhizobium</u> complet (RC).....	38
2 - Milieu RC gélosé (RCG).....	39
3 - Source de carbone.....	39
4 - Milieu gélosé pour bactériophages.....	40
IV. Croissance bactérienne.....	40
V. Dénombrement des bactériophages dans une suspension.....	41
VI. Multiplication des bactériophages.....	42
VII. Extraction et purification de plasmides.....	43

1 - Lyse des cellules.....	43
2 - Extraction du plasmide.....	44
3 - Concentration de l'ADN plasmidique.....	45
4 - Electrophorèse de l'ADN en gel d'agarose.....	46
VIII. Mise en évidence du contenu plasmidique d'une souche.	47
1 - Lyse des bactéries.....	47
2 - Conditions de migration en gel d'agarose.....	48
IX. Préparation d'un extrait cellulaire de <u>R. meliloti</u>	48
1 - Préparation de la suspension cellulaire.....	48
2 - Lyse des cellules.....	49
3 - Elimination des acides nucléiques.....	49
4 - Dialyse.....	49
X. Dosage des protéines.....	49
XI. Incubation d'ADN en présence d'un extrait cellulaire de <u>R. meliloti</u>	50
1 - Digestion du plasmide RP ₄	50
2 - Digestion de l'ADN du bactériophage λ	51
a) Fragments membranaires.....	51
b) Extrait chauffé.....	52
c) Influence de l'héparine.....	52
XII. Marquage radioactif de l'ADN.....	53
1 - Marquage.....	53
2 - Concentration de l'ADN.....	54
XIII. Digestion de l'ADN λ marqué au ³⁵ S.....	54
XIV. Fractionnement des protéines au sulfate d'ammonium.....	55
XV. Chromatographie d'échange d'ions.....	56
1 - Préparation de l'échangeur d'ions.....	56
2 - Préparation de la colonne.....	57
3 - Préparation des solutions.....	57
4 - Fractionnement des protéines.....	58
XVI. Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide.	59
1 - Solutions.....	59
2 - Formation des gels.....	60
3 - Dépôt des protéines.....	60
4 - Electrophorèse.....	60
5 - Coloration des bandes de protéines.....	61

RESULTATS ET COMMENTAIRES

CHAPITRE I

Mise en évidence in vivo du contrôle de l'infection bactériophagique par R. meliloti.

I. Obtention de plages de lyse.....	62
II. Ø6.M ₁₁ S incubé en présence des souches M ₁₁ S et 2011.....	64
III. Ø6.2011 incubé en présence des souches M ₁₁ S et 2011....	65

CHAPITRE II

Etude in vitro de la restriction-modification du plasmide RP₄

I. Contenu plasmidique des souches de <u>R. meliloti</u> utilisées.	67
1 - Choix de l'ADN utilisé pour la mise en évidence de la R.M.....	67
2 - Contenu plasmidique des souches de <u>R. meliloti</u> utilisées.....	68
II. Extraction et concentration du plasmide RP ₄ de la M ₁₁ S (RP ₄) et de la 2011(RP ₄).....	69
1 - Mise en culture des souches bactériennes.....	69
2 - Extraction et concentration du plasmide RP ₄	72
a) Ultracentrifugation de l'extrait cellulaire en gradient de chlorure de césium.....	72
b) Vérification de la pureté du plasmide préparé....	73
III. Digestion du RP ₄ par les extraits cellulaires des souches 2011 et M ₁₁ S de <u>R. meliloti</u>	75
1 - Digestion du RP ₄ isolé de la 2011(RP ₄).....	75
2 - Digestion du RP ₄ isolé de la M ₁₁ S(RP ₄).....	77

CHAPITRE III

Propriétés des enzymes de restriction contenues dans l'extrait cellulaire de R. meliloti M₁₁S

I. Influence des cofacteurs sur l'activité endonucléasique de restriction.....	80
II. Localisation des endonucléases de restriction dans la cellule.....	82

III. Résistance de l'enzyme.....	84
1 - Influence du chlorure de sodium.....	84
2 - Influence de la température.....	86
IV. Influence de l'héparine.....	87
V. Digestion de l'ADN λ marqué au ^{35}S	89

CHAPITRE IV

Essai de purification des enzymes de restriction de

R. meliloti $M_{11}\text{S}$

I. Fractionnement au sulfate d'ammonium des protéines de l'extrait cellulaire de $M_{11}\text{S}$	92
1 - Quantité de protéines recueillies dans chaque fraction	92
2 - Mise en évidence de l'activité endonucléasique de restriction.....	95
II. Fractionnement des protéines par chromatographie d'échange d'ions.....	96
1 - Profil d'éluion des protéines.....	96
2 - Dosage des protéines dans les fractions recueillies..	96
3 - Mise en évidence de l'activité endonucléasique de restriction.....	99
4 - Electrophorèse des protéines.....	101
CONCLUSION	105

BIBLIOGRAPHIE

ABREVIATIONS

Ø6.M ₁₁ S	: phage 6 développé sur la souche M ₁₁ S
R.M.	: Restriction - Modification
Md	: Mégadaltons
2011(RP ₄)	: souche 2011 renfermant le plasmide RP ₄
SAM	: S. Adénosyl Méthionine
min.	: minute
dpm	: désintégrations par minute
DEAE cellulose	: Diéthylaminoéthyl cellulose
M, mM et nM	: mole par litre, millimole par litre et nanomole par litre
UV	: Ultraviolets
CEE	: Coefficient d'efficacité d'étalement
q.s.p.	: quantité suffisante pour
V	: Volt
mA	: milliampère
nm	: nanomètre
pg et µg	: picogramme et microgramme
µl et µm	: microlitre et micromètre
W/V	: gramme par volume
AdoHcy	: S. Adénosyl homocystéine
mCi	: millicurie
dCTP	: Désoxycytosine triphosphate
dGTP	: Désoxyguanosine triphosphate
dTTP	: Désoxythymidine triphosphate
Tris/NaCl	: Tris 10 mM - NaCl 50 mM - glycérol 5 % - B mercaptoéthanol 5 mM - PH 7,5

AVANT — PROPOS

L'augmentation considérable de la population mondiale entraîne inéluctablement un accroissement de la demande en produits alimentaires, alors que la mise en exploitation de nouvelles terres semble de plus en plus difficile. Il est donc indispensable, pour suivre cette évolution, de développer d'une façon importante le rendement des surfaces déjà utilisées et d'essayer de tirer profit de toutes leurs possibilités, sans toutefois provoquer leur appauvrissement.

Cela justifie amplement les efforts déployés ces dernières années pour améliorer les différentes techniques agricoles. Mais, pour y parvenir, une meilleure connaissance des processus biologiques est nécessaire.

De nombreux travaux ont été entrepris ; cependant l'attention des chercheurs a été plus particulièrement retenue par le rôle des micro-organismes du sol et notamment par leur influence sur le développement de certains végétaux supérieurs. En effet cette coexistence n'a pas toujours des effets négatifs, dans de nombreux cas elle peut être avantageuse.

Il s'établit souvent des associations entre les bactéries du genre Rhizobium et les plantes de la famille des légumineuses (1). La relation est particulièrement étroite puisque la bactérie pénètre à l'intérieur des racines pour former des excroissances très visibles, les nodosités. Ce sont de véritables tumeurs qui apparentent l'introduction du germe à une infection ; cependant cette introduction aura des effets bénéfiques pour l'hôte. En effet la bactérie est capable de fixer l'azote et de le transformer en ammoniac qui sera ensuite assimilé par la plante (2). Celle-ci l'utilisera pour synthétiser des substances organiques telles que les acides aminés, constituants des protéines. En contrepartie, le micro-organisme utilise des substances fabriquées par la plante. Cette coopération, nommée symbiose, permettra donc un échange mutuel d'éléments nutritifs.

Ce processus qui conduit à l'utilisation de l'azote provenant de l'atmosphère est très important pour l'agriculture dans la mesure où il rend l'apport d'engrais inutile.

L'importance de ce phénomène réside également dans le fait que les légumineuses font partie d'une famille dans laquelle on a recensé plus de 13000 espèces. C'est un des groupes de végétaux supérieurs les plus abondants et les plus diversifiés, ce qui explique que les symbioses entre Rhizobium et légumineuses soient responsables de près de la moitié de l'azote fixé annuellement par voie biologique (3).

A chaque groupe de légumineuses correspond une espèce de Rhizobium capable de l'infecter, il existe donc une reconnaissance stricte qui constitue la spécificité d'hôte. Elle serait due vraisemblablement à une différence dans la structure des composés chimiques exocellulaires. Les bactéries impliquées portent sur leur membrane externe des lipopolysaccharides (4). Ces composés auraient des affinités spécifiques avec les lectines présentes à la surface des racines. Il se formerait une liaison qui rendrait possible l'infection.

Ces notions ont permis la classification des Rhizobium en 7 groupes d'inoculation (Tableau I) (2).

TABEAU I



<u>Rhizobium</u>	:	Plante - hôte
<u>R. Japonicum</u>	:	Soja
<u>R. Lupini</u>	:	Lupin
<u>R. Leguminosarum</u>	:	Pois
<u>R. Meliloti</u>	:	Luzerne
<u>R. Phaseoli</u>	:	Haricot
<u>R. Trifolii</u>	:	Trèfle
<u>R. Cowpea</u>	:	Pois - Chiche

Les différents groupes d'inoculation Rhizobium - légumineuses.

Les bactéries du genre Rhizobium sont, comme il a été dit précédemment, des germes du sol. A ce titre elles dépendent d'une écologie spécifique, car la terre renferme des millions de micro-organismes luttant implacablement les uns contre les autres.

Les populations de Rhizobium sont souvent un mélange de souches. Il est donc à craindre qu'il existe une compétition entre elles pour coloniser une plante donnée.

Supposons que l'on introduise dans ce milieu naturel une nouvelle colonie bactérienne sélectionnée pour son aptitude à envahir les racines de certaines légumineuses. Même si cette nouvelle bactérie se montre compétitive et s'adapte à son environnement, il n'est pas certain qu'elle soit capable d'accomplir la mission qui lui a été confiée, car elle trouvera les racines de la plante déjà occupées par d'autres souches.

Il est donc important de connaître les mécanismes intervenant dans cette sélection, même si les recherches actuelles n'apportent pas encore de résultats significatifs.

Cependant certains travaux ont suggéré que les bactériophages infectant les Rhizobium intervenaient probablement dans la sélection des souches (5). La présence des phages dans le sol entraînerait une réduction de la densité de population de souches dans la zone des racines. Les souches sensibles sont éliminées au profit de celles ayant une plus grande résistance.

Pour mieux comprendre ce phénomène, il est intéressant de noter que la résistance d'une bactérie à un bactériophage peut être due à deux causes principales.

Au cours de l'infection, le phage doit s'adsorber sur la bactérie. Ceci est rendu possible par la présence de récepteurs pariétaux spécifiques bactériens reconnaissables par l'appareil de fixation de la particule infectieuse. Dans le cas où la fixation ne pourrait pas avoir lieu, l'infection phagique serait rendue impossible.

Lorsque l'accrochage a eu lieu, le phage peut injecter son ADN à l'intérieur de la cellule bactérienne au moyen de la gaine contractile. Dans le cytoplasme, l'ADN peut alors suivre deux voies différentes ; soit il est conservé dans son état, soit il subit une dégradation par des enzymes bactériennes.

La conservation ou la dégradation de l'ADN est un phénomène qui est dû à l'existence d'un système enzymatique complexe responsable de la restriction-modification. Le complexe enzymatique renferme une endonucléase de restriction et une méthylase qui agissent sur les molécules d'ADN étrangères qui parviennent à pénétrer dans la cellule. Ce complexe correspond donc à une sorte de système immunitaire s'exerçant sur l'ADN.

Dans notre travail nous avons tenté d'explorer le phénomène de restriction-modification chez R. meliloti. Des études préliminaires effectuées au laboratoire de microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE semblent montrer que R. meliloti met en oeuvre une R.M. complexe.

Dans un premier temps nous avons vérifié in vivo la présence de la restriction dans notre système expérimental constitué d'un bactériophage de Rhizobium et de deux souches bactériennes. Nous avons ensuite confirmé ce résultat in vitro par l'emploi d'ADN plasmidique RP_4 et d'ADN de bactériophage λ utilisé comme référence.

Nous avons également tenté de déterminer les types d'enzymes mises en oeuvre et de dégager quelques unes de leurs propriétés. Nous avons enfin essayé de purifier ces systèmes enzymatiques à partir d'un extrait cellulaire bactérien.

GENERALITES

I. Relation bactérie - bactériophage.

1 - Structure des bactériophages.

Les bactériophages ont une taille beaucoup plus petite que celle des bactéries. Ce sont des particules simples, visibles uniquement au microscope électronique.

Ils sont constitués le plus souvent d'une tête appelée capsid et d'une queue (fig. 1) (6).

La capsid est une véritable boîte rigide de nature protéique. Elle est formée par l'assemblage d'un certain nombre d'unités morphologiques, les capsomères, disposés régulièrement. Les capsomères comprennent eux-mêmes des sous constituants, les unités de structure, qui sont identiques entre elles. La capsid renferme une molécule d'acide nucléique qui peut être de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou de l'acide ribonucléique (ARN) :

- sous forme désoxyribonucléique, il est généralement bicaténaire et de structure comparable à celle définie par WATSON et CRICK. Il est le plus souvent linéaire, rarement circulaire.

- sous forme ribonucléique, il est habituellement monocaténaire et presque toujours linéaire.

L'acide nucléique est enroulé sur lui-même. Il ne semble pas y avoir d'association étroite entre l'acide nucléique et les protéines de la capsid.

La queue est également de nature protéique. Elle comprend un cylindre central rigide et creux qui communique avec la tête. Une gaine hélicoïdale entoure ce cylindre. L'extrémité de la queue laisse apparaître une plaque terminale sur laquelle sont fixés six filaments ou fibres caudales.

2 - Classification des bactériophages.

La structure décrite précédemment est commune à un grand nombre de bactériophages.

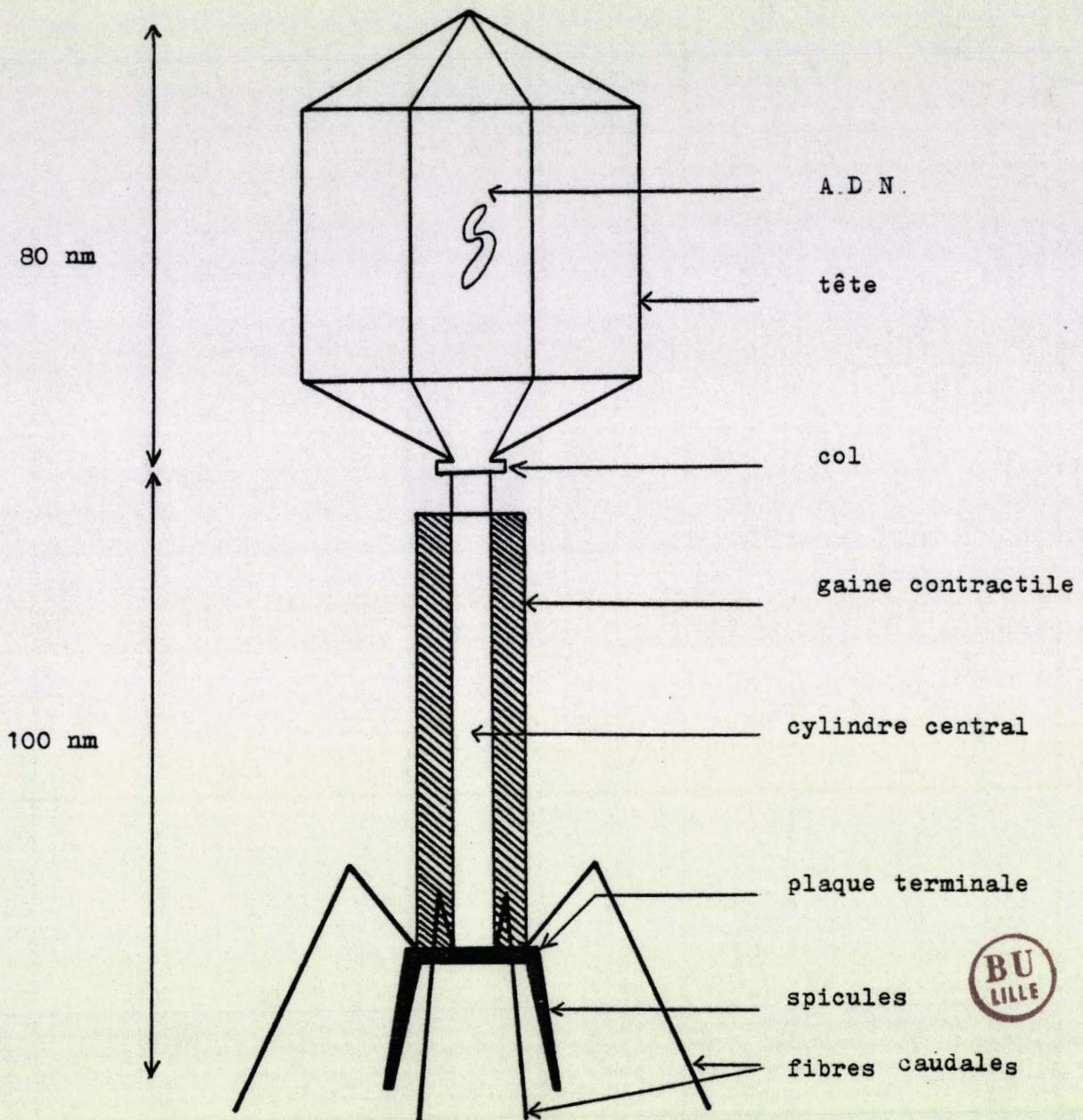


Fig. 1 : Représentation schématique du bactériophage T₂ infectant Escherichia Coli (6).

Il existe cependant des exceptions, ainsi, par exemple, certains bactériophages ne possèdent pas de queue, ou alors, lorsque la queue est présente, elle peut être contractile ou non.

BRADLEY a utilisé ces variations morphologiques pour classer les bactériophages en six groupes. (Tableau II)

TABLEAU II

Groupe	Caractéristiques
A	queue contractile
B	longue queue non contractile
C	queue courte non contractile
D	sans queue, grands capsomères
E	sans queue, petits capsomères
F	sans tête, sous forme de filament flexible



Classification des bactériophages selon BRADLEY (7).

Les bactériophages les plus connus sont ceux de la série T, actifs sur Escherichia Coli. Ils comprennent sept types différents désignés de T₁ à T₇. Ils sont constitués d'une tête icosaédrique et d'une queue contractile. Ils appartiennent de ce fait au groupe A.

Les bactériophages de Rhizobium renferment généralement de l'ADN et appartiennent essentiellement au groupe A.

3 - Infection d'une bactérie par un bactériophage.

Les différents mécanismes qui conduisent à l'infection d'une bactérie par un bactériophage sont maintenant assez bien connus.

La relation entre Escherichia Coli et ses bactériophages a été étudiée, notamment avec le phage T₄. Ce dernier servira donc d'exemple pour décrire le processus de l'infection phagique.

a) Adsorption du phage sur la bactérie et injection de l'ADN dans le cytoplasme.

La première étape est très importante car elle conditionne la suite des événements. En effet le phage doit nécessairement se fixer sur la bactérie. L'adsorption est rendue possible par la présence de récepteurs pariétaux bactériens sur lesquels viennent se fixer les bactériophages (8) grâce à leur plaque terminale et à leurs fibres caudales. Il existe une spécificité entre les récepteurs pariétaux et l'appareil de fixation de la particule phagique. La spécificité de l'adsorption résulte de l'existence de structures complémentaires présentes sur la bactérie et le phage. Un phage ne peut donc pas se fixer sur n'importe quelle bactérie.

Lorsque la fixation a eu lieu, une enzyme située dans la queue du phage entre en action : il s'agit du lysozyme. Celui-ci dépolymérise le mucocomplexe de la paroi bactérienne en coupant les liaisons glycosidiques. Les destructions locales diminuent la rigidité et la résistance de la paroi (6).

La contraction de la gaine externe du phage est déclenchée. Le tube interne de la queue traverse la zone de moindre résistance de la paroi, perce la membrane livrant ainsi passage au filament d'ADN. Celui-ci pénètre dans le cytoplasme tandis que les enveloppes phagiques vides (appelées fantômes) restent à l'extérieur (9).

b) Devenir de l'ADN phagique dans le cytoplasme bactérien.

A l'intérieur de la bactérie, l'ADN est susceptible d'avoir divers comportements. Ceux-ci pourront être néfastes pour la cellule hôte ou pratiquement sans aucune conséquence majeure.

L'ADN peut suivre l'une des voies suivantes :

- déclencher le cycle lytique : dans ce cas l'ADN se reproduit de façon autonome. Cette multiplication conduit à la lyse de la cellule et à la libération de nouvelles particules phagiques.

- s'insérer dans une zone déterminée du chromosome et se comporter alors comme partie intégrante du génome bactérien. Ce phénomène est appelé lysogénéisation (10). L'ADN phagique se réplique donc avec le chromosome.

- être dilué au cours de la multiplication bactérienne ; c'est le cas d'une infection par des phages abortifs.

- être dégradé jusqu'au stade de nucléotides qui pourront être ensuite réutilisés par la cellule.

4 - Le cycle lytique.

Pour décrire les différents événements qui surviennent au cours du cycle lytique, nous prendrons comme exemple l'infection d'Escherichia Coli par le phage T₄ (fig. 2).

a) Développement intracellulaire des phages.

Le virion, après avoir injecté son ADN, cesse d'exister en tant que particule infectieuse indépendante.

D'importants événements se succèdent alors, au cours d'une phase dite d'éclipse. Cette étape est caractérisée par de nombreuses synthèses de nature phagique mais par l'absence de virions.

- destruction du chromosome bactérien.

Dès l'infection, la croissance bactérienne est stoppée ainsi que la synthèse de l'ADN bactérien. Le chromosome bactérien est détruit par une désoxyribonucléase. En même temps l'information génétique de la bactérie disparaît. C'est l'arrêt total de toutes les synthèses d'enzymes et d'autres protéines.

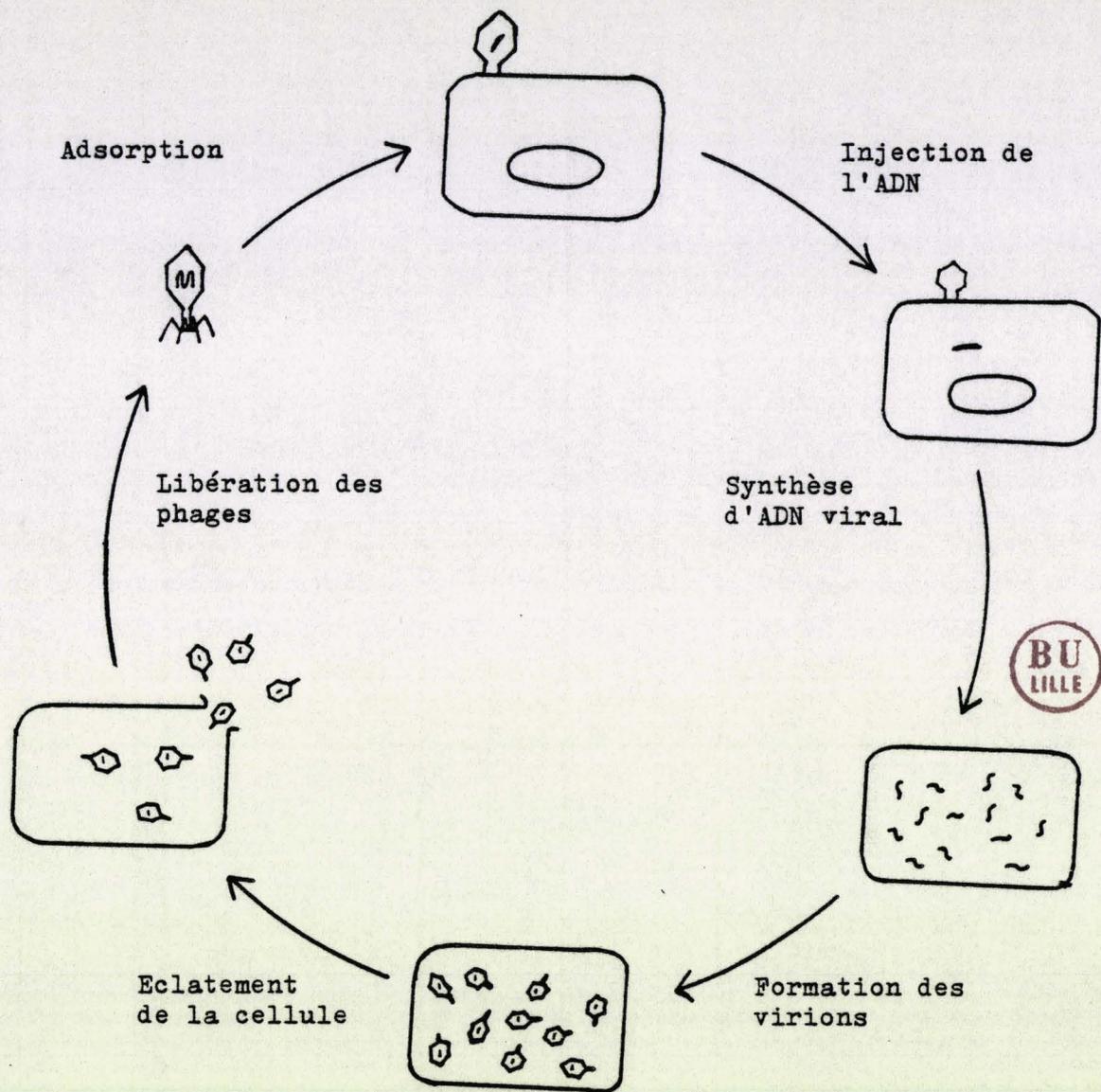


Fig. 2 : Cycle lytique du phage T₄ chez Escherichia Coli d'après WATSON (10).

Les autres structures cellulaires restent intactes et fonctionnelles ; elles vont servir aux synthèses bactériophagiques.

- synthèse de constituants précoces.

Le premier élément synthétisé est un ARN messager phagique. En même temps, des protéines nouvelles ou précoces apparaissent. Ce sont des enzymes nécessaires à la réplique de l'ADN viral.

- synthèse de l'ADN.

La synthèse d'ADN phagique est dirigée par l'ADN viral injecté au cours de la première phase. La synthèse s'effectue aux dépens des débris de l'ADN bactérien et des métabolites présents dans le milieu.

- synthèse des protéines.

Les protéines de structure (tête et queue), quant à elles, sont gouvernées par des gènes tardifs. La synthèse des protéines fait appel aux acides aminés présents dans la bactérie et dans le milieu de culture. Toutes les substances élaborées sont, dès lors, de nature phagique. Les constituants spécifiques du phage, une fois synthétisés, s'accumulent séparément sans constituer de nouvelles particules phagiques.

b) Phase de maturation et de libération.

- maturation.

Les premiers virions n'apparaissent qu'après cette phase. Le mécanisme de cette maturation est très peu connu. L'ADN se condense puis s'entoure d'unités protéiques, reconstituant la tête du phage. Les éléments de la queue s'associent ensuite. De nouveaux virions sont ainsi formés.

- libération.

Parmi les protéines synthétisées figure le lysozyme. L'accumulation de cette enzyme dans la bactérie va provoquer la digestion de la paroi bactérienne. La cellule, devenant ainsi sensible à la pression osmotique du milieu, éclate, entraînant la libération des particules phagiques nouvellement formées.

5 - Incorporation de l'ADN phagique dans le chromosome bactérien.

L'ADN de certains phages est capable de s'intégrer par recombinaison dans le chromosome bactérien. Il est alors transformé en prophage. Celui-ci va se répliquer avec le chromosome bactérien. Le bactériophage γ par exemple peut s'intégrer dans le chromosome d'E. Coli. Ce phénomène porte le nom de lysogénéisation.

6 - Dégradation de l'ADN phagique.

Après son introduction dans la cellule bactérienne, l'ADN phagique, s'il reste intact, peut déclencher plusieurs types d'événements. Ceux-ci ont été décrits précédemment. Cependant, il arrive parfois que l'ADN soit dégradé dès son entrée dans la cellule.

La conservation ou la dégradation de l'ADN est due à un système enzymatique responsable du phénomène de restriction-modification.

II. Aspect physiologique du phénomène de restriction-modification

1 - Introduction

L'étude de la relation qui s'établit entre une bactérie et un bactériophage a conduit à la mise en évidence d'un phénomène particulier nommé restriction-modification. C'est un terme qui englobe un mécanisme complexe dont le rôle est de contrôler la prolifération phagique à l'intérieur de la cellule hôte. Ce processus correspond donc à une sorte de "système immunitaire".

C'est dans les années 50 que BERTANI et WEIGLE (11) se sont aperçus que le développement phagique dans une bactérie dépendait de la souche dans laquelle les phages s'étaient multipliés auparavant. En effet, le passage dans certaines cellules donne aux bactériophages des propriétés particulières. Celles-ci ne peuvent pas être transmises d'une manière héréditaire et n'affectent pas le contenu des informations génétiques véhiculées par les particules phagiques (12)(13)

ARBER et DUSSOIX ont donné une explication à ce phénomène en étudiant la relation qui s'établit entre Escherichia Coli (E. Coli) et le bactériophage λ ($\emptyset \lambda$) (14). Depuis, de tels processus ont été mis en évidence dans de nombreuses bactéries d'espèces différentes (15)(16).

2 - Mise en évidence de la spécificité d'hôte

La spécificité d'hôte est un phénomène qui a surtout été étudié chez E. Coli. L'infection des souches K et B par le $\emptyset \lambda$ a permis de mettre en évidence les mécanismes qui interviennent (fig. 3) (11)(17).

Lorsque le $\emptyset \lambda$ est mis en présence d'une souche K, il peut l'infecter. Il y a une multiplication phagique qui entraînera une lyse des bactéries et une libération des phages. Ceux-ci seront marqués spécifiquement par la cellule hôte, ils seront notés : $\emptyset \lambda_K$. Ce marquage est appelé modification.

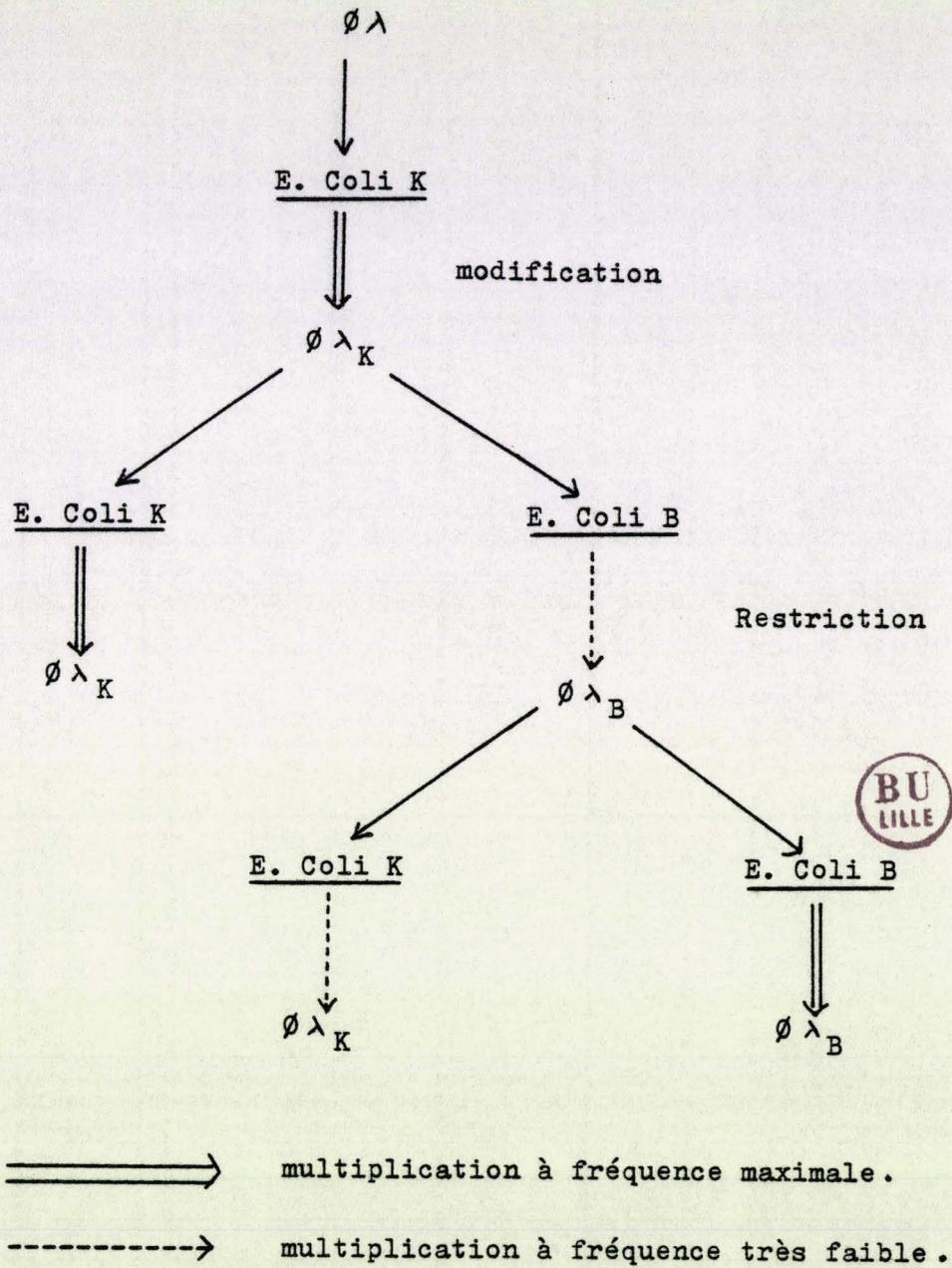


Fig. 3 - Schéma du phénomène de restriction-modification du bactériophage λ par les souches d'Escherichia Coli K et B .

- Si ce même phage est utilisé pour infecter une souche K, celle-ci le reconnaîtra et le laissera se multiplier en grande quantité (fréquence maximale).

- Par contre le $\phi \lambda_K$ mis en présence d'une souche B ne se comportera pas de la même manière. La bactérie empêchera son développement car elle ne le reconnaîtra pas. Il subira une restriction. Cependant une quantité assez faible de phages échappera à ce processus (faible fréquence). Les phages seront notés $\phi \lambda_B$, ils porteront la modification spécifique de la souche B.

- Le $\phi \lambda_B$ peut se développer dans la souche B à une fréquence maximale.

- Par contre le $\phi \lambda_B$ ne se développe pratiquement pas dans la souche K.

Le même phage λ peut donc se comporter différemment selon la souche bactérienne présente.

BERTANI et WEIGLE ont exclu l'hypothèse selon laquelle les phages ne pourraient pas se fixer sur les bactéries parce que celles-ci ne posséderaient pas de récepteurs membranaires spécifiques (11). Ils n'ont trouvé aucune différence dans l'adsorption des phages λ_K et λ_C sur la souche K. C'est donc à l'intérieur de la cellule que se produirait la sélection.

3 - Aspect quantitatif du phénomène.

Pour tenter de détecter la présence d'un phénomène de restriction-modification ou de le quantifier, il suffit d'évaluer le coefficient d'efficacité d'étalement (CEE) d'un bactériophage sur une souche bactérienne (14)(18).

Pour cela il faut connaître le titre de la suspension phagique utilisée ; celui-ci peut être obtenu par comptage au microscope électronique ou par dénombrement des plages de lyse obtenues sur la souche dont le phage porte la modification spécifique (souche indicatrice).

Il est également nécessaire de déterminer le titre de la suspension phagique sur la souche que l'on veut tester.

Le coefficient d'efficacité d'étalement d'un phage (efficiency of plating en anglais) peut être évalué en faisant simplement un rapport entre les deux titres précédents.

$$\text{CEE} = \frac{\text{nombre de phages sur la souche testée}}{\text{nombre de phages sur la souche indicatrice}}$$

Cependant les mesures de CEE à l'aide d'une souche qui restreint la croissance du phage, ne sont pas extrêmement sûres. Elles peuvent subir des variations si les conditions expérimentales ne sont pas maintenues rigoureusement constantes.

4 - Influence de l'état physiologique des bactéries.

Les conditions physiologiques des bactéries réceptrices n'influencent pas d'une manière très importante le CEE. Cependant, quelques fluctuations peuvent être observées si l'âge de la culture est différent. Des cellules en phase exponentielle de croissance présentent l'avantage de donner de meilleurs résultats.

Il est également possible de faire varier le CEE en appliquant certains traitements à la culture, comme par exemple l'irradiation par des ultraviolets (11)(19).

L'épuisement du milieu de culture ou l'utilisation d'un milieu minimum peuvent entraîner un changement du CEE.

5 - Existence de plusieurs systèmes de restriction-modification au sein d'une même cellule

a) Chez Escherichia Coli

ARBER et DUSSOIX ont multiplié le phage λ sur quatre souches d'Escherichia Coli (K, K(P₁), B et C). (14)(20). Les variantes du phage λ obtenues ont été mises en présence des quatre souches. La détermination des coefficients d'efficacité d'étalement a apporté des connaissances nouvelles sur la restriction-modification (Tableau III).

TABLEAU III

Variantes du phage λ	Souche hôte			
	K	K(P ₁)	B	C
λ_K	1	$2 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}	1
$\lambda_{K(P_1)}$	1	1	10^{-4}	1
λ_B	$4 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-7}$	1	1
λ_C	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-4}$	1

Coefficients d'efficacité d'étalement du bactériophage λ sur différentes souches d'E. Coli, suivant la souche sur laquelle le précédent cycle de croissance du phage a eu lieu, d'après ARBER et DUSSOIX (14).

Les phages λ_K et λ_B , lorsqu'ils sont mis en présence respectivement des souches K et B, donnent des CEE égaux à 1. Ce qui est normal compte tenu du fait que les souches utilisées correspondent aux souches indicatrices. Les phages ont été "reconnus" par les souches sur lesquelles ils ont été multipliés auparavant. Les phages ont donc été modifiés spécifiquement, ce qui a donc empêché leur restriction.

Lorsque le phage λ est mis en présence de la souche C d'E. Coli, le coefficient d'efficacité d'étalement obtenu est égal à 1 quelle que soit l'origine du phage utilisé. Toutes les variantes du phage λ peuvent se multiplier sur E. Coli C comme s'il s'agissait de la souche indicatrice. Ceci est dû au fait que cette souche ne possède pas de système de restriction, elle est notée r^- .

La souche $K(P_1)$ d'E. Coli correspond à la souche K qui porte en plus le prophage P_1 , molécule d'ADN d'origine phagique intégrée dans le chromosome bactérien.

Lorsque le phage λ_C est mis en présence de la souche K, le CEE obtenu est de 4.10^{-4} .

Par contre lorsque le même phage est mis en présence de la souche $K(P_1)$, le CEE obtenu est de 7.10^{-7} .

Dans le deuxième cas, le CEE est plus faible. La restriction est donc plus importante avec la souche $K(P_1)$. La présence d'un prophage provoque donc une augmentation de la restriction. Ce qui pourrait s'expliquer par le fait que le prophage P_1 code la synthèse d'un autre système de restriction-modification. Dans la souche $K(P_1)$ il existe donc au moins deux systèmes différents qui agissent indépendamment l'un de l'autre. Les effets de ces systèmes sont additifs.

b) Chez Rhizobium

Dans les années 60, SCHWINGAMER (21) a suggéré qu'il pourrait exister chez Rhizobium un système de contrôle de l'infection phagique. Les observations qui ont été faites sont comparables à celles qui ont été décrites précédemment chez E. Coli.

L'étude de la restriction-modification chez E. Coli a permis de constater que la présence d'une molécule d'ADN supplémentaire dans une cellule bactérienne peut provoquer une augmentation de la restriction. Or de l'ADN extrachromosomique a été détecté chez Rhizobium (22). L'ADN qui se trouve dans le cytoplasme

bactérien et qui est indépendant du chromosome, porte le nom de plasmide. Ceux-ci portent l'information génétique tout comme le chromosome bactérien. De ce fait, ils peuvent jouer un rôle dans le contrôle de la prolifération phagique chez Rhizobium.

- Influence des plasmides de Rhizobium sur la prolifération phagique

CORRAL et coll. (23) ont montré que la sensibilité aux phages chez Rhizobium meliloti pourrait être due à la présence d'un plasmide. Un autre aspect de ce phénomène a été étudié par SAHIM (24).

Plusieurs souches de Rhizobium meliloti ont été utilisées. Une souche sauvage possédant deux plasmides, et deux variantes de cette souche sauvage (l'une n'a qu'un plasmide, l'autre a perdu les deux plasmides).

Les trois souches ont été mises en présence du même phage. Il a été observé que, dans tous les cas où les clones de R. meliloti ont perdu un ou deux plasmides, l'efficacité du phage est devenue presque nulle.

Il semblerait que la restriction ne soit pas concernée, en effet les résultats obtenus seraient en corrélation avec une adsorption qui ne s'effectue plus.

Malgré ces travaux, l'influence des plasmides indigènes sur la restriction-modification n'a pas été démontrée chez R. meliloti.

Par contre dans de nombreuses autres espèces un tel phénomène a été observé, notamment chez E. Coli (25), pseudomonas aeruginosa (26) et streptococcus lactis (27).

- Influence du plasmide RP₄ sur la prolifération phagique chez Rhizobium

Le plasmide RP₄ provenant de pseudomonas aeruginosa a été introduit chez Rhizobium meliloti par croisement

avec une souche d'E. Coli qui possède le plasmide RP₄. Les souches sauvages de Rhizobium ainsi que les souches possédant le plasmide RP₄ ont été mises en présence du même bactériophage (24).

Les coefficients d'efficacité d'étalement obtenus ont été plus faibles avec les souches qui possèdent le RP₄. Le nombre de phages qui se sont multipliés sur les souches avec le RP₄ est donc plus faible.

De plus il a été montré que les phages s'adsorbaient sur les souches de R. meliloti avec le plasmide RP₄ comme sur les souches sauvages.

Le plasmide RP₄ pourrait introduire chez R. meliloti un nouveau système de restriction-modification.

III. Mécanismes de la restriction-modification in vivo

1 - Substrat sur lequel s'exerce la R.M.

Au cours de l'infection phagique, seul l'ADN pénètre à l'intérieur de la cellule bactérienne. La R.M. ne peut donc s'exercer que sur l'ADN.

L'ADN phagique est éliminé par la cellule, à condition qu'il se soit multiplié sur une autre souche ou espèce bactérienne. En général, tout ADN étranger à une cellule subit la restriction, que ce soit un plasmide, un ADN bactériophage ou un fragment d'ADN chromosomique (28).

Il est à noter que le propre ADN d'une bactérie n'est pas dégradé car il a été modifié spécifiquement par la bactérie et, de ce fait, il devient insensible à la restriction (29).

L'importance du phénomène de R.M. réside dans le fait qu'il permet à une bactérie de "reconnaître" son ADN d'un ADN étranger. Il correspond donc à une sorte de système immunitaire s'exerçant sur les ADN. Il peut servir de protection contre l'intrusion d'ADN provenant d'autres souches ou d'autres espèces. Il joue donc un rôle dans le maintien de l'intégrité génétique d'une espèce.

2 - Les enzymes impliquées dans la dégradation de l'ADN

La dégradation de l'ADN est le résultat de l'action d'enzymes.

Le phénomène de restriction-modification est dû à l'activité de deux enzymes. Celles-ci sont associées pour former un système complexe. (18)(30).

Des endonucléases sont responsables de la restriction. Ces enzymes coupent l'ADN à l'intérieur de la chaîne. La coupure est donc endonucléasique. Le nombre de coupures varie en fonction de la structure de l'ADN ou de l'endonucléase de restriction présente. Il y a libération d'un ou plusieurs fragments d'ADN. Les endonucléases de restriction ont une activité spécifique. En effet l'ADN ne peut être coupé s'il n'a pas une structure précise ou s'il est modifié.

La modification de l'ADN est due à l'activité d'une méthylase qui peut méthyler l'ADN, dans certaines conditions.

Il existe également d'autres enzymes qui dégradent l'ADN mais dont l'activité n'est pas spécifique. C'est le cas notamment des exonucléases. (31)(32)(33).

Les exonucléases ne peuvent pas agir sur une molécule d'ADN fermée. Leur action nécessite une extrémité libre. Ces enzymes peuvent dégrader l'ADN sous forme bicaténaire ou sous forme monocaténaire. Certaines exonucléases exigent de l'ATP pour dégrader l'ADN d'autres peuvent agir sans ATP.

3 - Produits de la restriction de l'ADN in vivo

Pour mieux comprendre ce que devient l'ADN lorsqu'il subit une restriction, ARBER (28)(34) a utilisé des bactériophages λ_K dont l'ADN a été marqué au ^{32}P . Il s'en est servi pour infecter des souches d'E. Coli et notamment la souche $K_{12}(P_1)$ qui possède au moins un système de R.M. capable d'agir sur l'ADN λ_K . Les bactéries et les phages ont été mis en contact.

Après centrifugation, ARBER s'est aperçu que :

- après quelques minutes de contact, la plus grande partie de la radioactivité sédimente avec les cellules ; ce qui indique une rapide adsorption des phages sur la surface externe des bactéries.

- 10 à 20 minutes après que les cellules aient été infectées par l'ADN phagique, il se produit une augmentation rapide de la radioactivité dans la fraction acido-soluble.

Les produits mis en évidence ne correspondent donc plus à la longue molécule d'ADN initialement présente car celle-ci est insoluble dans l'acide.

L'ADN a donc subi une dégradation importante. L'infection d'une cellule par un ADN donne donc naissance à des produits de dégradation de l'ADN allant des petits fragments insolubles dans l'acide aux oligonucléotides et au phosphate inorganique.

Les cellules hôtes survivent à une telle infection et réutilisent une partie des produits de dégradation de l'ADN phagique. La partie non utilisée est excrétée dans le milieu extérieur.

Des observations ultérieures ont montré que cette dégradation avait lieu en deux étapes distinctes.

- Dans un premier temps de très courte durée, l'ADN est coupé par une endonucléase de restriction. Il y a formation de fragments d'ADN dont le nombre et la longueur peuvent être variables.

- Les fragments d'ADN subissent ensuite une digestion par des exonucléases. Ces enzymes sont présentes dans le cytoplasme de la bactérie mais ne peuvent pas agir tant que l'ADN n'a pas été coupé par des endonucléases. La dégradation de l'ADN s'effectue alors jusqu'au stade de nucléotides. Cette dernière étape est plus lente que la première.

IV. Etude des endonucléases de restriction

1 - Nomenclature

SMITH et NATHAN (35) ont suggéré une nomenclature pour désigner les nombreuses enzymes de restriction connues.

Le nom du genre et de l'espèce de l'organisme hôte est identifié par la première lettre du genre et les deux premières lettres de l'espèce. Hemophilus influenzae par exemple sera désigné par Hin, tandis qu'Escherichia Coli devient ECo.

L'identification de la souche ou du type suit les abréviations précédentes. L'enzyme provenant de la souche B d'E. Coli sera notée : ECoB.

Dans le cas où l'enzyme de restriction est codée par un ADN viral ou un plasmide, on indique le symbole de l'ADN. ECoR et ECoP₁ seront donc respectivement codées par le facteur R et le prophage P₁.

Il est parfois nécessaire de spécifier aussi bien la souche hôte que l'ADN. Dans ce cas, le symbole de la souche peut être mis entre parenthèses (Exemple : ECo(B)P₁).

Quand une souche hôte particulière possède plusieurs systèmes de R.M. différents, ils sont identifiés par des chiffres romains.

2 - Classification

Les premières classifications des enzymes de restriction reposaient sur la différence de leur structure chimique. Mais bien vite les travaux de MESELSON et YUAN (36) associés à ceux de HEYWOOD (30) ont fait apparaître le fait que la présence de certains cofacteurs était indispensable à l'activité de ces enzymes.

Ces cofacteurs sont au nombre de trois, il s'agit du magnésium (Mg^{2+}), de l'adénosine triphosphate (ATP) et de la S. Adénosyl méthionine (SAM). La classification en vigueur actuellement fait apparaître trois types différents, selon que les enzymes nécessitent un, deux ou les trois cofacteurs mentionnés ci-dessus.

Type I

Les enzymes de ce type ne peuvent agir sans l'apport des trois cofacteurs. Si l'un d'entre eux manque, aucune activité n'est décelable. C'est le cas de ECoK et ECoB (37)(38).

Type II

Cette deuxième catégorie renferme des enzymes qui peuvent agir uniquement en présence de Mg^{2+} (39)(40). Les deux autres cofacteurs ne sont pas nécessaires. C'est le cas de ECoRI et ECoRII.

Type III

Ce dernier groupe n'existait pas il y a encore quelques années. Les enzymes étaient divisées en type I et II. La découverte de l'existence de l'enzyme de restriction ECoP₁ a permis de mettre en évidence un nouveau type d'enzymes. Celles-ci ont des propriétés particulières par rapport à celles du type I et II. En effet les enzymes de type III peuvent agir lorsque le Mg^{2+} et l'ATP sont présents. Sans ATP aucune activité n'est décelable. La SAM, lorsqu'elle est présente, provoque une stimulation de l'activité enzymatique. On trouve notamment dans ce groupe ECoP₁₅ et ECoP₁ (41)(42)(43).

3 - Particularités communes aux enzymes des trois types

Certains aspects du mode d'action des endonucléases de restriction méritent d'être notés car ils sont communs aux enzymes des trois types (30).

Les enzymes de restriction n'agissent pas sur l'ADN monocaténaire, l'ADN doit être obligatoirement constitué de deux chaînes (44). La coupure de l'ADN a lieu sur les deux brins.

L'ADN doit présenter une séquence nucléotidique qui est reconnue par l'enzyme (45)(46). Si ce site n'est pas présent sur l'ADN, celui-ci ne peut pas être coupé.

Les endonucléases de restriction sont toujours associées à des méthylases. Méthylases et endonucléases peuvent faire partie d'un même complexe enzymatique. Dans certains cas les méthylases peuvent être indépendantes des endonucléases, les deux enzymes sont alors séparées dans le cytoplasme.

Lorsque l'ADN est modifié (47), c'est-à-dire lorsque certaines bases ont été méthylées, les endonucléases ne peuvent pas couper l'ADN. Un ADN méthylé est donc définitivement protégé de la restriction par l'endonucléase correspondante (48)(49). Ce qui laisse entendre que les endonucléases et les méthylases correspondantes reconnaissent la même séquence nucléotidique.

Les endonucléases nécessitent toutes du magnésium, leur PH optimal d'action se situe entre 7,5 et 8,0. Les enzymes sont actives à des températures comprises entre 30 et 37°C.

Il n'est pas exclu que l'action des endonucléases ne soit pas catalytique. Autrement dit, ces protéines seraient consommées lors de la réaction et ne seraient donc pas des enzymes au sens propre du terme.

4 - Caractéristiques des enzymes de chaque type

Pour décrire les caractéristiques des enzymes de restriction, nous prendrons comme référence une enzyme de chaque type. ECoK pour le type I, ECoRI pour le type II et ECoP₁ pour le type III.

a) ECoK

Cette enzyme est de type I. Les essais pour tenter de la détecter dans un extrait d'E. Coli K ont été infructueux car seul le Mg^{2+} était utilisé. MESELSON et YUAN (36) ont testé un certain nombre de cofacteurs possibles et ils se sont rendu compte qu'ECoK était ATP dépendante. En effet l'ATP est hydrolysé au cours de l'action d'ECoK sur un ADN car celle-ci nécessite un apport énergétique.

La réaction qui a lieu est la suivante :



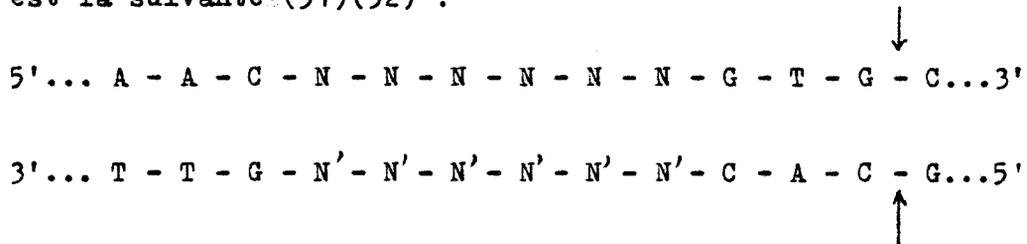
L'ADP et l'AMP par contre ne sont pas utilisés par ECoK.

MESELSON et YUAN se sont rendu compte que l'activité d'ECoK disparaissait quand l'extrait cellulaire était dialysé. La purification de l'enzyme n'a pu être entreprise que lorsqu'il a pu être démontré que la SAM était un cofacteur indispensable à la réaction. La purification a été effectuée par des procédés incluant la chromatographie d'échange d'ions sur DEAE cellulose et sur phosphocellulose (50).

La masse moléculaire de ECoK est approximativement de 400 000. Elle est constituée de trois sous-unités différentes α , β , γ de masse moléculaire :

- α : 135 000
- β : 62 000
- γ : 55 000

La séquence nucléotidique reconnue par ECoK est la suivante (51)(52) :



N et N' sont des nucléotides non spécifiques.

Les flèches indiquent l'endroit de la coupure endonucléasique.

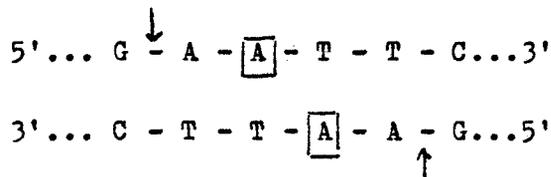
b) ECoRI

ECoRI est une enzyme de type II. Elle n'utilise donc que le Mg^{2+} comme cofacteur (30).

La masse moléculaire de ECoRI est d'environ 80 000. Elle est constituée de deux sous-unités de masses moléculaires identiques et égales à environ 40 000. La taille des enzymes de type II est généralement inférieure à celles de type I.

ECoRI reconnaît une séquence nucléotidique plus précise qu'ECoK. Les enzymes de type II sont généralement plus spécifiques que les enzymes de type I.

La séquence nucléotidique reconnue est de 6 paires de bases qui sont disposées symétriquement par rapport à un axe. Ce type de séquence est appelé palindrome.



Les deux flèches indiquent les points de coupure.

Les bases encadrées sont méthylables.

La coupure libère des extrémités d'ADN monocaténares appelées extrémités cohésives. Elles portent ce nom car elles sont constituées de bases complémentaires qui peuvent à nouveau s'apparier.

c) EC_oP₁

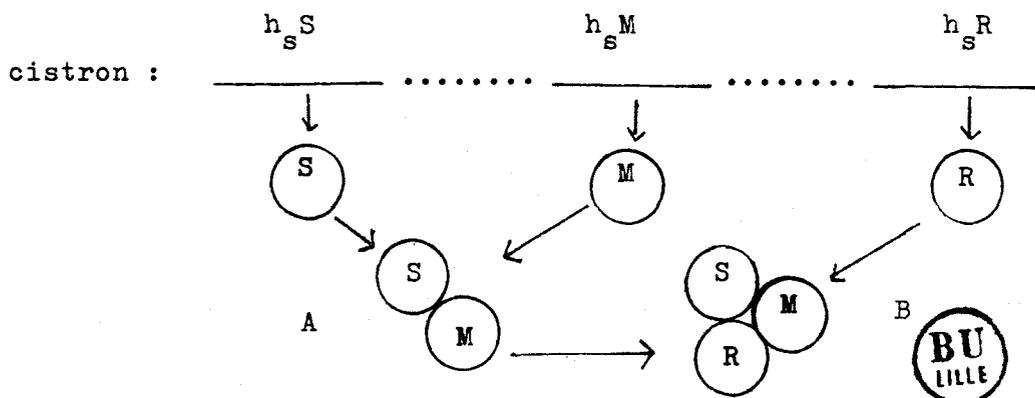
EC_oP₁ est une enzyme de type III (53).
Elle est constituée de deux sous-unités. La masse moléculaire est
d'environ 200 000.

Les enzymes de type III ont des propriétés
qui sont à mi-chemin entre celles des enzymes de type I et les enzymes
de type II.

V. Relations entre endonucléases et méthylases

1 - Aspect génétique

Du point de vue génétique, le cistron h_s (spécificité d'hôte) code la synthèse du système de restriction-modification. Le produit du gène h_sS (S pour site de reconnaissance) est utilisé pour la reconnaissance du site spécifique sur l'ADN. Le gène h_sR produirait un polypeptide nécessaire à la restriction tandis que le gène h_sM coderait la synthèse d'un polypeptide indispensable à la modification (18).



A : protomère de la méthylase (M + S)

B : protomère de l'endonucléase (M + S + R)

Fig. 4 : Contrôle génétique de la synthèse des enzymes de restriction-modification de type I

L'endonucléase ne peut agir que si les trois sous-unités sont présentes, tandis que la méthylation nécessite deux sous-unités (M + S).

Les enzymes de type III forment également un complexe renfermant une méthylase.

Les méthylases associées aux endonucléases de type II sont séparées dans le cytoplasme bactérien.

2 - les méthylases

La méthylase associée à ECoRI est une protéine monomérique dont la masse moléculaire est d'environ 40 000.

Les méthylases exigent toutes de la SAM qui fournit les groupements méthyl transférés lors de la modification d'un ADN. La réaction produit des résidus 6 méthylaminopurine ou 5 méthylcytosine, suivant les systèmes. Seule une petite fraction des résidus adénine ou cytosine sont méthylés sur l'ADN. Les sites de méthylation seraient déterminés par une séquence de bases caractéristiques, autour de la base acceptrice du groupement méthyl.

VI. Etude des réactions catalysées par les enzymes de R.M.

Une même protéine enzymatique peut catalyser deux réactions différentes : la restriction et la modification de l'ADN. Pour expliquer cette propriété, nous étudierons le mécanisme d'action de l'enzyme ECoK qui est l'un des mieux connus (54).

Les séquences nucléotidiques spécifiques reconnues par ECoK peuvent exister sous trois états différents :

- les deux chaînes sont méthylées ;
- une seule chaîne est méthylée (ADN hétéroduplex) ;
- aucune chaîne n'est méthylée.

L'endonucléase d'ECoK ne peut agir que si l'ADN n'est pas méthylé. Par contre la méthylase agit surtout sur l'ADN hétéroduplex.

C'est donc l'interaction entre l'enzyme et le site spécifique qui détermine quelle activité s'exprimera. Cependant, quel que soit l'état de l'ADN, les premières étapes des différentes réactions sont identiques (fig. 5).

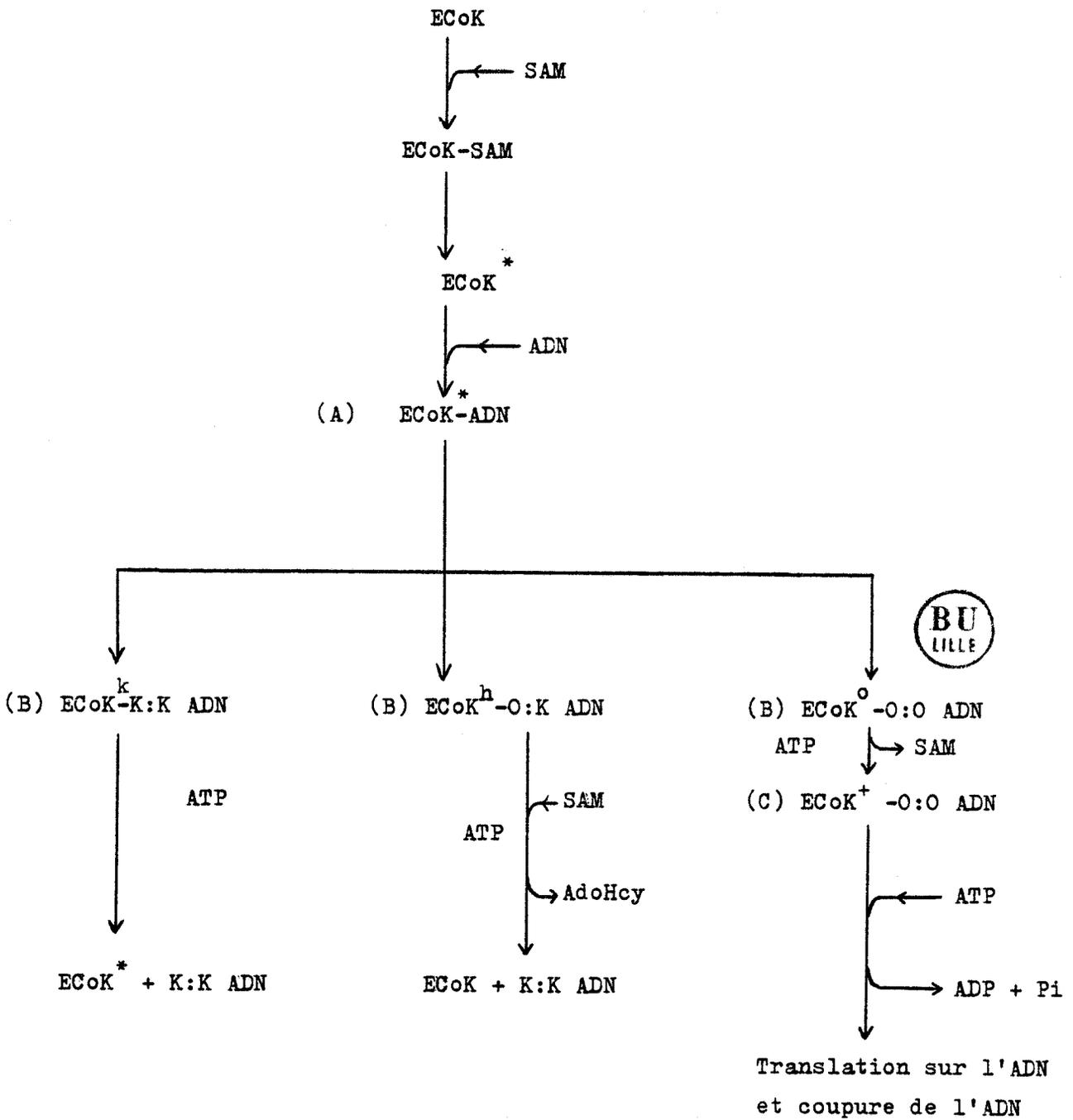
1 - Formation du complexe de reconnaissance (54) (55)

a) Fixation de la SAM

ECoK fixe la SAM par une liaison non covalente. Ce cofacteur agit comme un effecteur allostérique aussi bien dans la réaction de restriction que celle de modification. L'enzyme a au moins trois sites de fixation de la SAM.

b) Activation de l'enzyme

Le complexe ECoK - SAM va ensuite transformer lentement l'enzyme en une forme activée (ECoK^{*}) qui pourra se fixer sur l'ADN.



- (A) complexe initial
- (B) complexes de reconnaissance
- (C) complexe retenu sur filtre

Fig. 5 : Schéma des différents mécanismes de la réaction de l'enzyme multifonctionnelle ECoK .

c) Formation du complexe initial

La forme activée de l'enzyme interagit avec n'importe quel ADN même si celui-ci ne possède pas les sites spécifiques qui correspondent. Ceci a été vérifié par l'utilisation de fragments d'ADN sans sites spécifiques. Les complexes ainsi formés sont instables et peuvent être dissociés par l'héparine. Ce composé chimique a une structure polyanionique comparable à l'ADN. Il y a compétition entre l'ADN et l'héparine pour fixer l'enzyme.

d) Formation du complexe de reconnaissance

ECok* va ensuite se lier aux sites spécifiques qu'ils soient méthylés ou non. Le complexe de reconnaissance obtenu est stable, il peut être isolé par gel filtration. C'est probablement cette interaction spécifique entre l'enzyme et le site qui détermine si ECok* s'orientera vers une activité de restriction ou de modification.

Lorsqu'un complexe de reconnaissance, formé avec de l'ADN hétéroduplex, est traité avec de l'héparine puis incubé avec de l'ATP, on peut constater que la deuxième chaîne d'ADN n'est pas méthylée. Par contre le traitement précédent n'empêchera pas la restriction de l'ADN lorsque celui-ci est non modifié. La stabilité du complexe est donc différente selon l'état de modification de l'ADN.

Lorsque le complexe de reconnaissance est formé, l'enzyme peut avoir plusieurs activités qui dépendent de l'état de méthylation de l'ADN.

2 - ADN dont les deux chaînes sont modifiées

Lorsque l'ADN est modifié sur les deux chaînes (K:K ADN), l'incubation du complexe en présence d'ATP va provoquer rapidement une dissociation de l'ADN et de l'enzyme. L'hydrolyse de l'ATP n'est pas nécessaire.

3 - ADN hétéroduplex (54)(56)

L'ADN hétéroduplex n'a qu'une seule chaîne modifiée (O:K ADN).

La réaction de méthylation nécessite uniquement de la SAM, mais elle est stimulée par l'ATP et le Mg^{2+} . L'enzyme catalyse le transfert d'un groupe méthyl de la SAM à l'ADN. La S. Adénosyl méthionine est transformée en S. adénosyl homocystéine (AdoHcy).

L'ATP se comporte comme un effecteur allostérique, il n'est pas hydrolysé au cours de la méthylation. L'apport d'énergie n'est pas nécessaire.

Lorsque le transfert du groupe méthyl a eu lieu, l'enzyme se détache de l'ADN dont les deux chaînes sont alors méthylées.

L'enzyme peut se refixer sur un autre site et le méthyler.

4 - ADN non modifié

L'ADN non modifié est noté O:O ADN

a) Complexe retenu sur filtre

L'ATP déclenche la transformation de $ECoK^0$ en une nouvelle forme $ECoK^+$, qui possède deux caractéristiques importantes :

- le complexe perd la SAM
- l'enzyme forme un nouveau complexe qui peut être retenu sur filtre (filter binding complex) contrairement aux complexes précédents qui eux ne le sont pas.

L'ATP joue le rôle d'effecteur allostérique.

b) Translation sur l'ADN

Une des propriétés particulières de cette enzyme est de se fixer spécifiquement sur le site de reconnaissance puis de couper l'ADN à un autre endroit qui peut être assez éloigné. L'enzyme resterait attachée au site de reconnaissance mais elle se lierait à une autre partie de l'ADN qui formerait ainsi une boucle (la figure 6 représente le mode d'action de $ECoB$ qui est une enzyme semblable à $ECoK$) (57).

$ECoK^+$ utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour avancer l'ADN.

c) Coupure de l'ADN

L'enzyme a une activité endonucléasique. $ECoK^+$ coupe en premier lieu une seule chaîne d'ADN, la deuxième chaîne est coupée dans un deuxième temps.

Il est très intéressant de noter qu'après son action, l'enzyme ne serait plus active. Ceci laisserait supposer que la coupure de la deuxième chaîne d'ADN pourrait être effectuée par une autre molécule enzymatique.

L'énergie nécessaire proviendrait de l'hydrolyse de l'ATP.

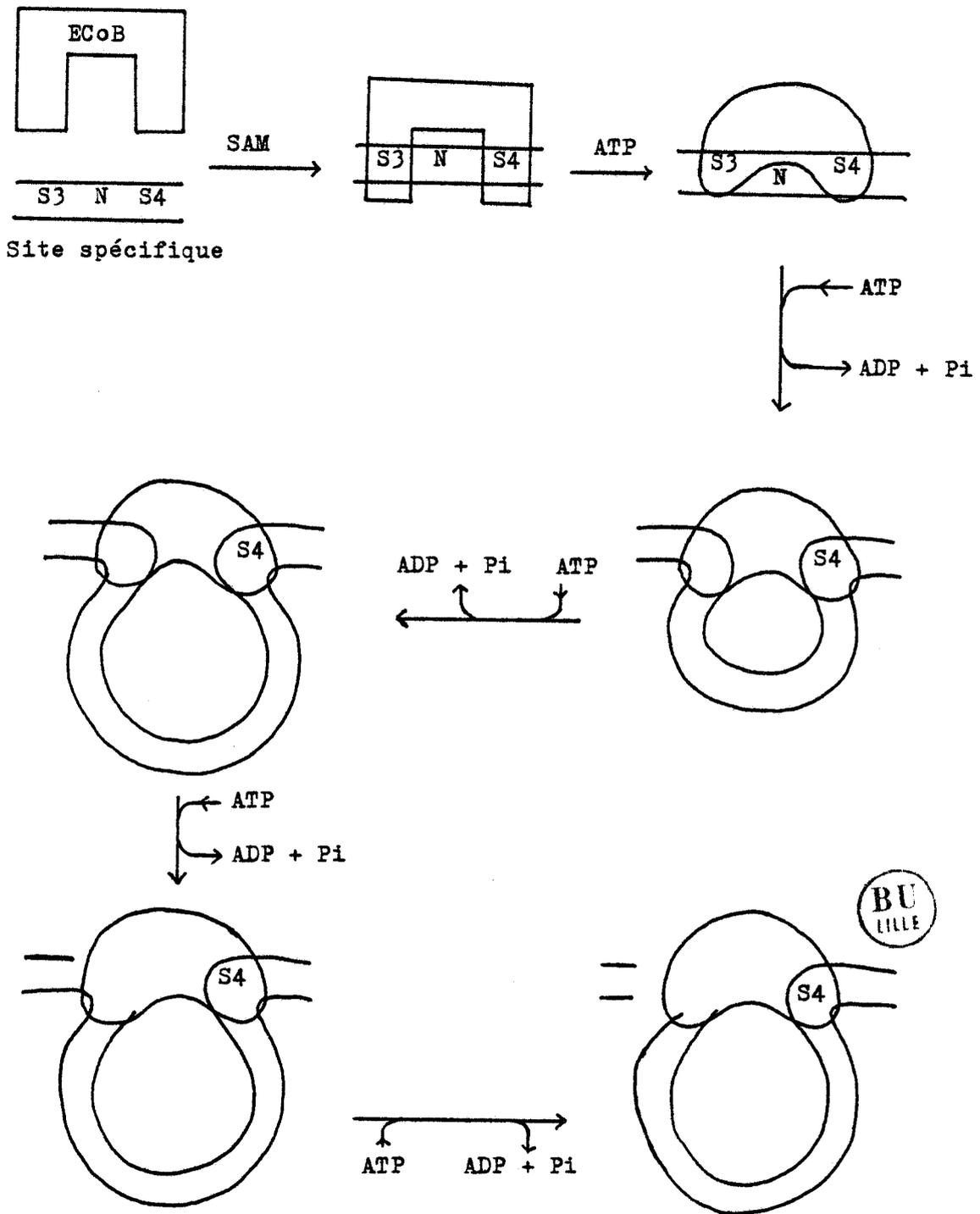


Fig. 6 : Réaction conduisant à la coupure d'un ADN par l'endonucléase. EcoB

MATERIEL

ET

METHODES

I. Souches bactériennes.

Des souches de Rhizobium meliloti ont été utilisées : la 2011, la M₁₁S, la 2011 (RP₄) et la M₁₁S(RP₄). Ces souches appartiennent à la collection du laboratoire.

Ces souches sont efficaces pour la luzerne (Medicago Sativa).

Elles sont conservées à - 20°C dans du milieu RC fructosé à 1 % auquel on a ajouté du glycérol à concentration finale de 20 %.

II. Souche de bactériophage.

Le bactériophage 6 de R. meliloti a été utilisé. C'est un phage à ADN et à queue contractile, classé dans le groupe A de BRADLEY (7). Il appartient à la collection du laboratoire.

ARBER et LINN (28) ont suggéré une notation des phages selon la souche sur laquelle ils ont été cultivés. Le Ø6 cultivé sur la M₁₁S par exemple sera noté Ø6.M₁₁S.

Les suspensions bactériophagiques sont conservées à + 4°C dans du milieu RC fructosé additionné de glycérol à concentration finale de 50 %.

III. Milieux de culture.

1 - Milieu Rhizobium complet(RC).

C'est un milieu mis au point par DELATTRE (58).

La composition est la suivante :

K_2HPO_4	1	g
$MgSO_4, 7 H_2O$	0,2	g
Extrait de levure (Difco).....	1	g
Eau distillée q,s,p.....	1	l

Le PH est ajusté entre 7,2 et 7,5

La stérilisation est effectuée à $120^\circ C$ pendant 20 min.

2 - Milieu RC gélosé (RCG).

Il est obtenu par addition à 1 l. de milieu RC, de 15 g d'agar Difco ou de 12 g d'agar Biomar. Le PH et les conditions de stérilisation sont identiques à ceux du milieu R.C.

Le milieu RCG et le milieu RC sont utilisés pour cultiver des souches de Rhizobium.

3 - Source de carbone.

Le fructose constitue une source de carbone intéressante car sa dégradation métabolique par R. meliloti ne provoque pas, contrairement au glucose, une acidification du milieu. Cette acidification serait préjudiciable à la croissance bactérienne.

On utilise une solution aqueuse à la concentration de 40 ‰, stérilisée à $105^\circ C$ pendant 30 min. La solution de fructose est répartie dans le milieu de culture au moment de l'emploi. La concentration finale doit être de 1 ‰.

4 - Milieu gélosé pour bactériophages.

Ce milieu est utilisé pour y multiplier des bactériophages ou pour effectuer un dénombrement des phages dans une suspension.

La composition est la suivante :

Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O.....	0,45 g
Na ₂ SO ₄ , 10 H ₂ O.....	0,06 g
KNO ₃	0,06 g
FeCl ₃(1 ml d'une solution à 1 %)	0,01 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O.....	0,06 g
MgCl ₂ , 6 H ₂ O.....	0,1 g
Mannitol.....	10 g
Agar (Difco).....	7,5 g
Eau distillée.....	1 l
PH : 7	

La stérilisation s'effectue à 105°C pendant 30 min.

IV. Croissance bactérienne.

Les tubes contenant les souches bactériennes glycérolées sont décongelés à température ambiante. On ensemence généralement le milieu RC fructosé par un volume de culture tel, que la dilution soit d'environ 1 % (0,1 ml pour 10 ml de milieu par exemple).

L'incubation a lieu à 30° C pendant 15 à 18 heures.

Une agitation constante permet une oxygénation du milieu et favorise ainsi la croissance bactérienne.

V. Dénombrement des bactériophages dans une suspension.

La technique utilisée est celle de ADAMS (59).

La suspension bactériophagique est soumise à une série de dilutions en progression géométrique de raison 10 (de 10^{-1} à 10^{-8}).

Lorsque les dilutions sont terminées, 0,3 ml de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance est ajouté à 0,1 ml de chaque dilution. On réalise un témoin contenant 0,3 ml de culture mais sans bactériophages.

La souche bactérienne utilisée doit bien entendu être sensible au phage que l'on désire dénombrer.

Après 15 min. de contact à température ambiante, on ajoute 3 ml de gélose pour bactériophage. Après homogénéisation, le tout est coulé à la surface de milieu RCG fructosé contenu dans une boîte de Petri.

L'incubation a lieu à 25°C pendant 24 à 48 h.

La lyse des bactéries par les bactériophages entraîne la formation d'une zone claire appelée plage de lyse. Un seul bactériophage peut être à l'origine d'une plage de lyse.

Les zones claires, visibles à l'oeil nu, sont comptées. Le titre de la suspension phagique peut être obtenu en multipliant le nombre des plages formées par le facteur de dilution. Ce titre est ramené au nombre de phages par millilitre.

VI. Multiplication des bactériophages.

Certains travaux nécessitent des suspensions bactériophagiques concentrées. Elles sont préparées de la manière suivante :

0,1 ml d'une suspension bactériophagique non diluée est ajouté à 0,3 ml d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance.

Les étapes suivantes sont les mêmes que celles qui sont utilisées pour le dénombrement des bactériophages. 6 à 7 boîtes de Petri sont préparées.

Après 48 h. d'incubation à 25°C, la gélose molle en surface est récupérée dans un tube à centrifuger. 7 à 9 ml de milieu RC fructosé sont ajoutés. L'ensemble est homogénéisé par brassage à l'aide d'une pipette et laissé pendant 20 min. à température ambiante.

On centrifuge ensuite à 12 000 g pendant 15 min. Le surnageant contenant les phages est débarassé des débris bactériens par filtration sur membrane Millipore de porosité 0,22 µm.

Si la suspension n'est pas assez concentrée, on répète le protocole expérimental précédent autant de fois qu'il est nécessaire.

Après dosage de la suspension phagique, celle-ci est conservée à + 4°C.

VII. Extraction et purification de plasmides.

1 - Lyse des cellules.

200 ml de milieu RC fructosé sont introduits dans un erlenmeyer de 1 l. Les précultures de R. meliloti M₁₁S(RP₄) et 2011 (RP₄) sont effectuées dans du milieu RC fructosé contenant 10 µg par ml de tétracycline. Les souches M₁₁S(RP₄) et 2011(RP₄) correspondent aux souches M₁₁S et 2011 qui possèdent en plus un plasmide RP₄. Celui-ci confère la résistance à la tétracycline, à la bactérie qui renferme le plasmide. Les souches qui possèdent le RP₄ pourront se développer dans un milieu contenant de la tétracycline. Les souches sauvages (sans plasmide RP₄) ne se développent pas.

L'inoculation du milieu RC est telle, que la densité optique (DO) à 570 nm est de 0,01 à 0,02. La DO finale après développement des bactéries, doit être de 0,8 à 1 (ne pas dépasser 1).

On ajoute une solution de chloramphénicol (dans l'éthanol à 95°) de façon à obtenir une concentration finale de 150 µg par ml. Les cultures sont maintenues en agitation à 30°C pendant 16 à 21 h. Le chloramphénicol bloque la synthèse des protéines, la synthèse de l'ADN se poursuit et les plasmides sont entièrement synthétisés.

On centrifuge les cultures à 4 000 g à + 4°C pendant 15 min. (60).

Le culot bactérien est remis en suspension dans 3 ml de tampon Tris-HCl 50 mM / Saccharose 25 % / PH 8.

Ajouter 1 ml de solution de lysozyme à 10 mg/ml dans du tampon Tris-HCl 50 mM, PH 8. (Cette solution est préparée au moment de l'emploi). Mélanger doucement 5 min. à température ambiante.

Ajouter 1 ml d'EDTA (acide éthylènediaminé-tétracétique) 0,2 M, PH 8. Agiter doucement dans la glace pendant 5 min.

La lyse des bactéries s'effectue grâce à l'addition de 5 ml de solution de détergent :

1 ml de triton X 100 à 10 % dans l'eau

12,5 ml d'EDTA 0,2 M, PH 8

5 ml de Tris-HCl 1 M, PH 8, q.s.p. 100 ml d'eau

Continuer à agiter doucement dans la glace jusqu'à ce que la suspension devienne très visqueuse.

2 - Extraction du plasmide.

L'extrait cellulaire préparé précédemment est centrifugé à 45 000 g et à + 4°C pendant 1 h. Le volume de surnageant est mesuré. On ajoute ensuite pour 0,95 ml de surnageant :

- 1 g de CsCl

- 50 µl de bromure d'éthyidium à 1 mg/ml.

Les tubes sont ensuite centrifugés au minimum 48 h. à 120 000 g à environ + 15 °C. Les tubes sont éclairés sous des rayons ultraviolets de 366 nm de longueur d'onde pour visualiser les bandes d'ADN.

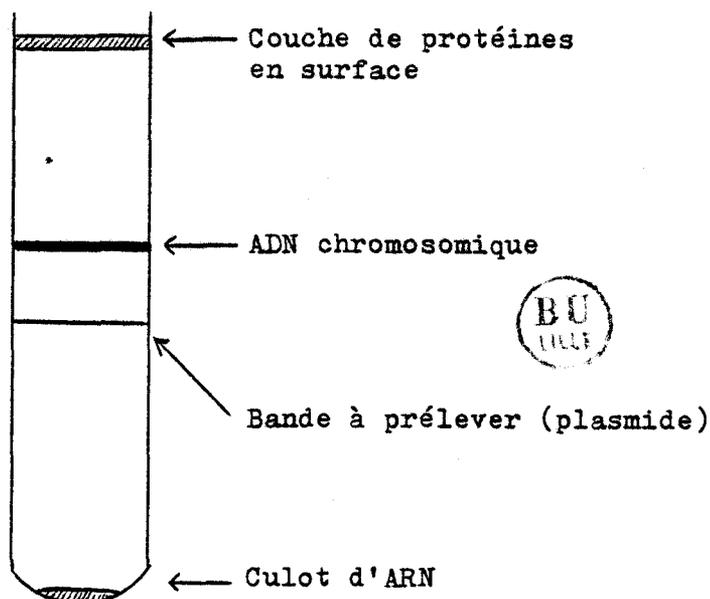


Fig. 7 : Ultracentrifugation en gradient de CsCl de l'extrait cellulaire d'une souche possédant un plasmide

La bande fluorescente (à 366 nm) inférieure est récupérée et transférée dans des petits tubes Eppendorf de 1,5 ml. Le bromure d'éthidium est extrait par plusieurs volumes d'isopropanol saturé en CsCl, jusqu'à disparition complète de la fluorescence en UV. L'isopropanol est extrait par un volume d'éther éthylique.

Le chlorure de césium est éliminé par dialyse pendant 24 h. à + 4°C contre du tampon Tris-HCl 10 mM / EDTA 1 mM / NaCl 5 mM / PH 7,4. Pour 1 ml de solution d'ADN, on utilise 1 l de tampon. Celui-ci est changé 6 fois en 24 h.

3 - Concentration de l'ADN plasmidique.

La densité optique est mesurée à 260 nm pour évaluer la concentration en ADN plasmidique (une DO de 20 correspond à une concentration de 1 mg/ml).

Eventuellement, l'ADN est précipité par $1/9$ de volume d'acétate de sodium 3 M, PH 8 et de 2 volumes d'éthanol à 95°.

Après 30 min. à - 70°C, le tube est centrifugé pendant 10 min. au moyen d'une centrifugeuse de paillasse Eppendorf 541₂. Le surnageant est éliminé. Le culot est rincé avec de l'éthanol à 70° pour éliminer l'acétate de sodium puis avec de l'éther. L'ADN est ressolubilisé dans du tampon Tris-HCl 10 mM / NaCl 50 mM / PH 7,5.

La pureté des plasmides préparés est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose.

4 - Electrophorèse de l'ADN en gel d'agarose (61)-

Les électrophorèses sont effectuées dans des plaques verticales de dimensions : 14 cm / 16 cm / 0,3 cm (Biorad Proteam Cell).

La composition du tampon d'électrophorèse utilisé est la suivante :

Tris.....	89	mM
Na ₂ EDTA.....	2,5	mM
B(OH) ₃	89	mM
PH :	8,3	

Ce tampon est préparé 12 fois concentré puis dilué au moment de l'emploi. Il est conservé à température ambiante.

L'agarose est dissous à chaud, avec agitation constante, dans du tampon d'électrophorèse. La concentration en agarose du gel est comprise entre 0,8 et 1 %.

L'électrophorèse est effectuée avec un courant de 100 V pendant 1 h. A l'issue de l'électrophorèse, le gel est mis à tremper dans un bain d'eau distillée contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthydiu pendant 30 min. Le gel est ensuite rincé avec de l'eau distillée.

Les bandes d'ADN sont visualisées à l'aide d'un trans-illuminateur UV products C 63, à une longueur d'onde de 302 nm.

VIII. Mise en évidence du contenu plasmidique d'une souche.

1 - Lyse des bactéries.

Les différentes souches de R. meliloti sont précultivées dans le milieu RC jusqu'à l'obtention de la phase exponentielle de croissance.

On dépose 0,5 ml de culture à DO 0,3 dans des petits tubes Eppendorf. On ajoute un volume de sarkosyl NL 97 à 0,2 % dans du tampon Tris 50 mM / EDTA 20 mM / PH 8. On mélange en retournant doucement le tube plusieurs fois. Le tube est ensuite placé dans la glace. Après quelques minutes, on centrifuge pendant 4 min. au moyen de la centrifugeuse de paillasse. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 60 µl de tampon d'électrophorèse contenant : du saccharose à 25 %, 1 unité par ml de RNase et 1 mg par ml de lysozyme (ce dernier est ajouté au moment de l'emploi). Le culot est rapidement homogénéisé au moyen d'un vortex. 30 µl de cette suspension sont déposés dans une alvéole d'un gel vertical d'agarose à 0,8 %. Après quelques minutes, on dépose au dessus 90 µl du tampon d'électrophorèse renfermant du saccharose à 5 %, du dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 1 %, du bleu de bromophénol (BBP) à 0,025 % et de l'agarose à 0,4 %.

2 - Conditions de migration en gel
d'agarose.

La concentration en agarose qui est utilisée est de 0,8 %.

L'électrophorèse est effectuée sous une intensité de 20 V pendant 45 min. pour concentrer l'ADN. Nous avons ensuite augmenté l'intensité du courant à 130 V. La migration de l'ADN a lieu pendant 3 h.

La visualisation des bandes plasmidiques s'effectue comme il a déjà été décrit.

IX. Préparation d'un extrait cellulaire de R. meliloti (38).

1 - Préparation de la suspension cellulaire.

0,5 ml de culture de R. meliloti servent à inoculer 10 ml de milieu RC fructosé. L'incubation a lieu à 30°C pendant 15 à 18 h.

La préculture permet d'inoculer 1 l de milieu RC fructosé contenu dans une fiole à toxine. L'incubation a lieu dans les mêmes conditions.

Lorsque la DO de la culture à 600 nm est d'environ 1, on centrifuge les cellules à 4 000 g pendant 20 min. Le culot est lavé, recentrifugé puis repris dans 4 ml de tampon Tris/NaCl dont la composition est la suivante :

Tris	10 mM
NaCl	50 mM
glycérol	5 %
B mercaptoéthanol	5 mM
PH :	7,5

Le B mercaptoéthanol est ajouté au moment de l'emploi.

2 - Lyse des cellules.

Pour toutes les manipulations ultérieures, la température doit être maintenue en dessous de 10°C. Les cellules sont cassées à l'aide d'une French Press (American Instrument Company -USA) à une pression de 1 tonne / cm². Les débris membranaires sont éliminés par centrifugation à 20 000 g pendant 30 min. puis à 60 000 g pendant 45 min.

3 - Elimination des acides nucléiques.

Les acides nucléiques peuvent être éliminés par addition de sulfate de streptomycine à raison de 25 mg pour 1 ml d'extrait cellulaire. La quantité de sulfate de streptomycine nécessaire est mise en solution dans 1 ml du tampon qui a servi à préparer l'extrait. L'addition du sel est faite progressivement pendant environ 20 min. sous agitation. Le tube renfermant l'extrait est maintenu dans la glace. Il se forme un précipité blanc qui est éliminé par centrifugation à 105 000 g pendant 1 h.

4 - Dialyse.

L'extrait est dialysé contre 2 l. de tampon Tris/NaCl pendant une nuit à + 4°C. L'extrait est ensuite centrifugé à 80 000 g pendant 30 min car un léger précipité peut apparaître au cours de la dialyse.

La conservation a lieu à - 20°C, après que les protéines de l'extrait aient été dosées.

X. Dosage des protéines

La concentration en protéines de l'extrait est déterminée par la méthode de LOWRY (62). La gamme étalon a été préparée à partir d'une solution de sérum albumine bovine à 400 µg/ml.

XI. Incubation d'ADN en présence d'un extrait cellulaire de R. meliloti.

Les essais de digestion de l'ADN sont réalisés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml de capacité (36)(42).

1 - Digestion du plasmide RP₄.

Des extraits cellulaires sont préparés à partir des souches M₁₁S et 2011 de R. meliloti.

Le plasmide RP₄ est isolé de la souche M₁₁S (RP₄) et de la souche 2011 (RP₄).

Pour les essais de digestion de l'ADN, le mélange réactionnel complet est de 50 µl. Il renferme :

ADN (plasmide RP ₄).....	0,7 µg
MgCl ₂ , 6 H ₂ O.....	10 mM
ATP.....	1 mM
SAM.....	0,1 mM
Tris.....	10 mM
NaCl.....	50 mM

Un volume d'extrait cellulaire renfermant 250 µg de protéines
le PH est de 7,5

Le plasmide RP₄ de la M₁₁S(RP₄) est mis en présence des deux extraits cellulaires avec les trois cofacteurs (ATP, Mg²⁺, SAM). On effectue un essai avec l'extrait de la 2011 en présence d'un seul cofacteur (Mg²⁺).

Des essais analogues sont effectués avec le plasmide RP₄ de la 2011 (RP₄).

Les extraits cellulaires sont introduits dans les tubes en dernier. Les tubes sont alors immédiatement mis à incuber à 37°C pendant 1 h. et sont portés ensuite à 65°C pendant 15 min. pour dénaturer les protéines.

10 µl de solution de protéinase K sont ajoutés. Cette solution est obtenue en dissolvant quelques grains d'enzyme lyophilisée MERCK dans 100 µl de tampon Tris/NaCl. Une incubation de 30 min. à 37°C permettra d'obtenir une hydrolyse des protéines.

On additionne ensuite 15 µl d'une solution contenant 40 % (W/V) de saccharose et 0,1 % (W/V) de bleu de bromophénol.

Une électrophorèse de 1 h.30 min. à 100 V est effectuée dans un gel d'agarose à 1 %.

2 - Digestion de l'ADN du bactériophage λ.

Des essais de digestion de l'ADN λ ont été effectués avec des fragments membranaires et avec un extrait cellulaire préalablement porté à une température de 65°C. Nous avons également essayé de déterminer l'influence de l'héparine quand ce composé chimique est présent dans le mélange réactionnel.

a) Fragments membranaires.

Les fragments membranaires de la souche M₁S sont obtenus après la première ultracentrifugation qui est effectuée au cours de la préparation de l'extrait cellulaire. La suspension membranaire préparée ne renferme pas de cellules intactes.

Le mélange réactionnel complet utilisé pour l'essai de digestion de l'ADN renferme 0,7 µg d'ADN de bactériophage λ (SIGMA) ainsi que tous les autres composés chimiques énumérés précédemment.

L'extrait cellulaire est remplacé par 10 µl de suspension membranaire obtenue en mélangeant une pointe de pipette Pasteur de fragments membranaires dans 100 µl de tampon Tris/NaCl.

La suite des opérations est identique à celles décrites dans le cas de la digestion du plasmide RP₄.

b) Extrait chauffé

Un tube renfermant de l'ADN λ (0,7 µg) et 30 µl d'extrait cellulaire de la M₁₁S est porté à une température de 65°C pendant 10 min. Après refroidissement à la température ambiante, les cofacteurs sont introduits pour reformer le mélange réactionnel complet.

L'incubation et l'électrophorèse sont effectuées dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour la digestion du RP₄.

c) Influence de l'héparine

Le mélange réactionnel complet contient 80 µg d'héparine en plus des autres composés chimiques. L'ordre d'addition des cofacteurs, de l'héparine et de l'extrait de la M₁₁S varie selon les différents essais(44).

Tube 1

C'est le tube témoin, il renferme l'ADN, les cofacteurs et l'héparine. Le tube est incubé 10 min. puis 1 h. à 37°C.

Tube 2

L'ADN λ en présence des cofacteurs et de l'extrait est incubé 10 min. à 37°C. L'addition de l'héparine s'effectue ensuite. Le tube est incubé 1 h. à 37°C.

Tube 3

L'ADN λ , en présence de l'héparine, est incubé 10 min. à 37°C. L'extrait et les cofacteurs sont additionnés, le tube est alors incubé 1 h à 37°C.

Les étapes suivantes du mode opératoire ont déjà été décrites pour la digestion du RP₄.

XII. Marquage radioactif de l'ADN.

1 - Marquage.

Le marquage de l'ADN est réalisé à l'aide du kit de marquage BRL (nick translation reagent kit).

Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml maintenu dans la glace on ajoute :

- 5 μ l de solution qui renferme les nucléotides suivants : dCTP, dGTP et dTTP.
- un volume de solution renfermant 1 μ g d'ADN λ .
- 2 μ l de solution de désoxyadénosine 5'-(α -Thio) Triphosphate, (³⁵S) d'activité spécifique de 1186 Ci / mmol. et dont la concentration est de 8,21 nmol. / ml et de 9,74 mCi / ml.
- eau distillée q.s.p. 45 μ l.

Le tube est homogénéisé doucement. On ajoute ensuite 5 μ l d'une solution à 0,4 unité / μ l d'ADN polymérase I et 40 pg / μ l de DNase I.

Le tube est mis à incuber 1 h. à 15°C.

La réaction est stoppée par addition de 5 μ l de solution d'EDTA 300 mM, PH 8.

2 - Concentration de l'ADN.

L'ADN marqué est concentré par précipitation dans l'alcool dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la concentration du plasmide RP₄.

La précipitation a lieu à une température de - 80°C pendant 1 h.

Le culot d'ADN obtenu est ressolubilisé dans 100 µl de tampon :

Tris.....	10 mM
EDTA.....	1 mM
NaCl.....	50 mM
PH : 8	

L'ADN est conservé à - 20°C.

XIII. Digestion de l'ADN λ marqué au ³⁵S.

Dans un tube Eppendorf, on introduit 100 µl d'un mélange réactionnel complet renfermant 0,7 µg d'ADN λ et 1 µl de solution d'ADN marqué au ³⁵S.

On réalise plusieurs essais avec des volumes croissants de l'extrait cellulaire de R. meliloti M₁₁S à 12 mg/ml. Les volumes sont : 0, 10, 15 et 30 µl.

Les tubes sont mis à incuber 1 h. à 37°C.

On ajoute ensuite :

- 200 µl d'ADN de sperme de hareng (SIGMA) à 2 mg/ml dans de l'EDTA 0,2M, PH 8.
- 300 µl d'acide trichloracétique (ATCA) 10 %.

Les tubes sont placés 1 h. dans la glace. Après centrifugation, le surnageant est éliminé. Le précipité est repris dans ATCA 5 % à raison de 100 µl par tube.

Après homogénéisation les contenus des tubes sont filtrés sur filtres Whatman GF/C. les filtres sont lavés avec de l'ATCA 5% puis avec un mélange d'alcool / éther (V/V).

Les filtres sont séchés puis introduits dans des petits tubes de compteur à scintillation. On ajoute 0,4 ml de KOH 0,01N. Après 30 min. de repos, on ajoute 10 ml de liquide à scintillation Beckman HP.

La radioactivité est comptée à l'aide d'un compteur à scintillation Beckman LS 2 800.

XIV. Fractionnement des protéines au sulfate d'ammonium.

4 ml d'extrait cellulaire de la souche M₁₁S sont introduits dans un tube à centrifuger.

704 mg de cristaux de sulfate d'ammonium sont ajoutés progressivement. Une agitation constante du tube permet une bonne dissolution du sel. La concentration finale de celui-ci est de 30 % (63).

Après 5 min. de repos dans la glace, le tube est centrifugé à 20 000 g pendant 20 min. Le surnageant est transvasé dans un autre tube. Le précipité est remis en solution dans du tampon Tris/NaCl. La solution de protéines ainsi obtenue est appelée fraction 30 %.

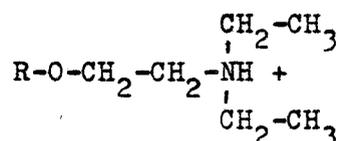
On ajoute 700 mg de sulfate d'ammonium dans le surnageant qui a été conservé. Le protocole expérimental précédent est répété pour obtenir la fraction 55 %.

Dans un dernier temps, 660 mg de sulfate d'ammonium sont additionnés au surnageant pour obtenir ensuite la fraction 75 %.

Les fractions 30, 55 et 75 % sont dialysées une nuit à + 4°C contre 1 l. de tampon Tris/NaCl. On mesure le volume de chaque fraction ainsi que la concentration en protéines par la méthode de LOWRY (62).

XV. Chromatographie d'échange d'ions.

L'échangeur d'ions utilisé est du diéthyl aminoéthyl cellulose (DEAE cellulose) DE 52 (WHATMAN) dont la partie active a la structure suivante :



1 - Préparation de l'échangeur d'ions.

50 mg d'échangeur sec sont introduits dans 1 l. d'eau distillée. Après 30 min. de repos, l'échangeur est filtré puis remis en suspension dans 1 l. d'HCl 0,5N pendant 30 min. sous agitation douce. Il est ensuite filtré puis lavé avec de l'eau distillée jusqu'à ce que le PH du filtrat soit aux environs de 4.

L'échangeur est ensuite remis en suspension dans 1 l. de NaOH 0,5N pendant 30 min. Après filtration puis lavage, le PH final doit être aux environs de 8.

L'échangeur est remis en suspension dans
1 l. de tampon phosphate de composition :

K_2HPO_4		10 mM
KH_2PO_4			
glycérol.....			5 %
B mercaptoéthanol.....			5 mM
EDTA.....			0,1 mM
PH : 7,5			

La suspension est filtrée après 10 min.
L'opération avec le tampon phosphate est répétée jusqu'à ce que le
PH du filtrat soit de 7,5.

L'échangeur est introduit dans une éprouvette
contenant 1 l. du même tampon. Après décantation, le surnageant est
éliminé. Cette dernière étape est très importante car elle permet
d'éliminer toutes les fines particules qui seraient gênantes par la
suite.

2 - Préparation de la colonne.

Une colonne de 2,5 cm de diamètre intérieur
et de 20 cm de longueur est utilisée. La hauteur de gel est de 4 cm,
ce qui correspond à un volume de 20 ml de gel. La quantité de gel
utilisée doit être d'environ 1 ml pour 10 mg de protéines à séparer.
La colonne est lavée par 100 ml de tampon phosphate.

3 - Préparation des solutions.

Les protéines sont éluées par un gradient
discontinu. Les solutions utilisées renferment des concentrations
croissantes en phosphate. Les solutions tampon ont la même compo-
sition que la solution qui a été utilisée pour préparer et laver le
gel ; seules les concentrations en phosphate monopotassique et
dipotassique changent.

Les concentrations en K_2HPO_4 / KH_2PO_4 sont :

0,01 M - 0,1 M - 0,2 M - 0,4 M.

4 - Fractionnement des protéines (36)(42).

12 ml d'extrait cellulaire de $M_{11}S$ renfermant 180 mg de protéines sont introduits dans la colonne. Le débit est de 30 ml par heure. A la sortie de la colonne, la densité optique (DO) est mesurée à 280 nm. L'enregistrement de la DO est réalisé sur un enregistreur ISCO model UA-5. Lorsque la DO redescend à zéro, nous introduisons la première solution servant à l'élution (0,1 M). Les mêmes opérations sont répétées pour les solutions 0,2 M et 0,4 M. Chaque fraction est récupérée dans des éprouvettes différentes, le volume est ajusté à 50 ml.

Les protéines contenues dans chacune des fractions sont dosées par la méthode de LOWRY (62).

25 ml de chacune des solutions sont introduits dans des tubes à centrifuger d'environ 38 ml de capacité. Nous ajoutons dans chaque tube du sulfate d'ammonium de façon à obtenir une concentration finale de 55 % (soit 8,775 g). L'addition du sulfate d'ammonium doit être effectuée lentement sous agitation constante. Les protéines précipitent.

Les tubes sont centrifugés à 2 000 g pendant 20 min. Le culot est repris dans du tampon Tris/NaCl. Les solutions obtenues sont dialysées une nuit à + 4°C contre deux litres du même tampon.

XVI. Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide (64).

1 - Solutions.

Solution A :

Tris.....	3,05 g
N N N' N' tétraméthyléthylène diamine (TEMED).....	0,18 g
Eau distillée.....q.s.p.....	50 ml

PH : 8,8

Solution B :

Acrylamide.....	14 g
N N' méthyl bisacrylamide.....	0,367 g
Eau distillée.....q.s.p.....	50 ml

Solution C :

Persulfate d'ammonium 0,168 g pour 100 ml
Cette solution est préparée au moment de l'emploi

Tampon d'électrophorèse :

Tris.....	7,78 g
Eau distillée.....q.s.p.....	1 l

PH : 8,7

2 - Formation des gels.

Les solutions sont préchauffées à 24°C

- 3 ml de solution A
- 6 ml de solution B
- 5 ml d'eau distillée
- 10 ml de solution C

Après homogénéisation, la solution sert à remplir des petits tubes cylindriques de 0,5 cm de diamètre et de 10 cm de long à raison de 1,5 ml par tube. On recouvre par 0,1 ml d'eau distillée. La polymérisation du gel s'effectue à 24°C pendant 2 heures.

Concentration finale des gels :

- Acrylamide..... 7 % (W/V)
- Bisacrylamide..... 0,184 % (W/V)
- Temed..... 0,03 % (V/V)
- Persulfate d'ammonium..... 0,07 % (W/V)

3 - Dépot des protéines

La surface du gel est rincée avec du tampon d'électrophorèse. On dépose sur chaque gel un volume de solution renfermant de 80 à 100 µg de protéines.

4 - Electrophorèse

L'électrophorèse est effectuée avec un appareil à deux compartiments pouvant contenir 12 gels. La borne négative du générateur électrique est placée dans le compartiment du haut.

Après le dépôt des protéines, un courant constant de 1,25 mA par gel est maintenu pendant 15 min. Cette étape permet une concentration des protéines à la surface du gel. L'électrophorèse est menée ensuite à 3,8 mA par gel pendant 2 h 30 min.

5 - Coloration des bandes de protéines.

Les gels sont retirés des tubes et placés dans un bain d'amidoswartz 10 B 0,6 % (W/V) dans de l'acide acétique à 7 % (V/V) pendant une nuit.

Les gels sont ensuite placés dans un bain d'acide acétique 7 % jusqu'à ce que les bandes soient bien visibles.

La lecture des gels est faite avec un photomètre intégrateur (Vernon) à une longueur d'onde de 588 nm.

RESULTATS

ET

COMMENTAIRES

CHAPITRE I

MISE EN EVIDENCE IN VIVO DU CONTROLE DE
L'INFECTION BACTERIOPHAGIQUE
PAR R. MELILOTI

Il nous a semblé important de vérifier, dans une étude préliminaire, que R. meliloti était capable de contrôler l'infection phagique. Bien que d'autres travaux plus détaillés aient déjà mentionné l'existence de tels phénomènes dans de nombreuses souches de cette espèce bactérienne (24), nous avons étudié le contrôle de la prolifération du bactériophage 6 ($\phi 6$) de R. meliloti par les souches $M_{11}S$ et 2011.

Dans un premier temps nous avons multiplié le $\phi 6$ sur la souche $M_{11}S$ ($\phi 6.M_{11}S$). Le phage a ensuite été mis en présence des deux souches $M_{11}S$ et 2011 pour observer s'il y avait une différence de la prolifération phagique selon la souche utilisée.

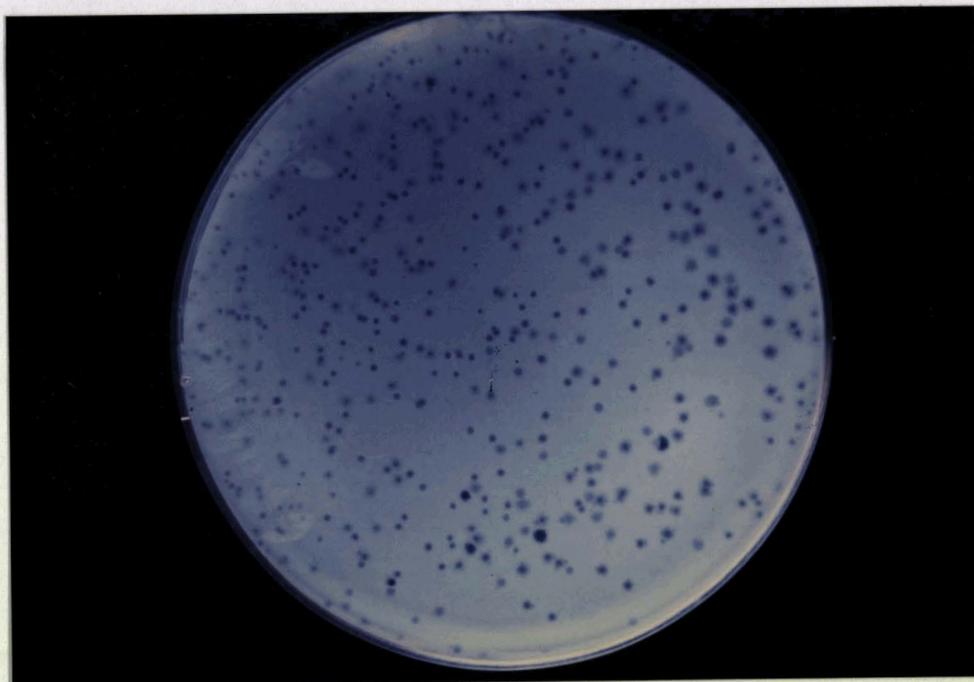
Dans un deuxième temps ce même phage 6 a été multiplié sur la souche 2011 ($\phi 6.2011$) puis mis en présence des deux souches.

I. Obtention de plages de lyse.

Lorsque le $\phi 6.M_{11}S$ est mis à incuber avec des cellules de $M_{11}S$ sur un milieu solide, nous constatons la formation de zones claires éparpillées sur une surface blanche. Cette dernière est constituée par des bactéries. Les zones claires sont appelées plages de lyse car l'éclaircissement est dû à la lyse des cellules bactériennes. (PHOTO I).

Le phage s'adsorbe sur la bactérie et injecte son ADN à l'intérieur de la cellule. L'ADN phagique se réplique et entraîne la formation de nombreux virions. Il s'ensuit une lyse de la cellule et une libération des bactériophages à l'extérieur qui pourront infecter d'autres cellules (10). Un phage peut être à l'origine d'une plage de lyse d'où la possibilité de dénombrer le titre de la suspension phagique par cette technique (59).

PHOTO I



BU
LILLE

Plages de lyse obtenues après incubation de
R. meliloti M₁₁S avec le Ø6.M₁₁S
sur milieu solide

II. $\phi_6.M_{11}S$ incubé en présence des souches $M_{11}S$ et 2011 de R. meliloti.

La croissance du $\phi_6.M_{11}S$ sur la souche $M_{11}S$ donne une valeur élevée, de l'ordre de 10^9 particules par ml (Tableau IV). Le résultat obtenu est normal compte tenu du fait que la souche $M_{11}S$ a servi à préparer le stock de phage 6 avec lequel l'essai a été effectué. La $M_{11}S$ est appelée souche indicatrice, le coefficient d'efficacité d'étalement (CEE) est donc égal à 1 (14).

Le phage 6 a donc été "reconnu" spécifiquement par la souche bactérienne qui a servi à sa multiplication. Le $\phi_6.M_{11}S$ n'a pas subi la restriction par la souche $M_{11}S$.

TABLEAU IV

		Souches de <u>R. meliloti</u>	
		$M_{11}S$	2011
Dénombrement	:	:	:
du	:	$4,3 \cdot 10^9$	$7,6 \cdot 10^3$
$\phi_6.M_{11}S$:	:	:
CEE	:	1	$1,7 \cdot 10^{-6}$

Dénombrements et coefficients d'efficacité d'étalement (CEE) du $\phi_6.M_{11}S$ sur les souches de R. meliloti $M_{11}S$ et 2011

$\phi_6.M_{11}S$: phage 6 multiplié sur la souche $M_{11}S$

$$CEE = \frac{\text{nombre de phages sur la souche testée } (M_{11}S \text{ ou } 2011)}{\text{nombre de phages sur la souche indicatrice } (M_{11}S)}$$

Par contre le dénombrement du $\phi 6.M_{11}S$ sur la souche 2011 donne une valeur plus faible de l'ordre de 10^3 particules par ml. Il y a donc eu une diminution importante du nombre de bactériophages. Ceci s'explique par le fait que la croissance du $\phi 6.M_{11}S$ a été restreinte par la souche 2011 car celle-ci ne "reconnait" pas la modification spécifique portée par le $\phi 6$. Le CEE obtenu est de l'ordre de 10^{-6} .

Il est intéressant de noter que le $\phi 6.M_{11}S$ a tout de même une faible chance de se multiplier sur la 2011. En effet un petit nombre de bactériophages échappent à la restriction (environ 10^3 phages).

Les phages qui ont réussi à se multiplier sur la 2011 portent alors la modification spécifique de cette souche. Les $\phi 6.2011$ obtenus pourront être multipliés en grand nombre sur la 2011.

III. $\phi 6.2011$ incubé en présence des souches $M_{11}S$ et 2011 de R. meliloti

Le $\phi 6.2011$ est mis en présence de la souche 2011. Le nombre de particules phagiques obtenu est d'environ 10^7 (Tableau V). Le CEE est donc de 1. La croissance du phage 6 modifié spécifiquement par la 2011, n'est pas restreinte par cette souche.

TABLEAU V

Souches de <u>R. meliloti</u>			
	$M_{11}S$:	2011
Dénombrement	:	:	:
du	$1,9 \cdot 10^3$:	$8,4 \cdot 10^7$
$\phi 6.2011$:	:	:
CEE	$2,3 \cdot 10^{-5}$:	1



Dénombrements et coefficients d'efficacité d'étalement
(CEE) du $\phi 6.2011$ sur les souches de R. meliloti $M_{11}S$ et 2011

Les résultats obtenus avec la souche $M_{11}S$ permettent de conclure que la croissance du $\phi 6.2011$ a été restreinte car le nombre de particules phagiques obtenues est nettement plus faible que celui obtenu avec la 2011. Le CEE avec la $M_{11}S$ est d'environ 10^{-5} . Cette souche n'a pas "reconnu" la modification portée par le phage.

Les résultats obtenus permettent de conclure qu'il existe chez les souches de R. meliloti $M_{11}S$ et 2011 un système de contrôle de la prolifération du phage 6.

CHAPITRE II

ETUDE IN VITRO DE LA RESTRICTION-MODIFICATION
DU PLASMIDE RP₄

I. Contenu plasmidique des souches de R. meliloti utilisées.

1 - Choix de l'ADN utilisé pour la mise en évidence in vitro de la restriction-modification chez R. meliloti.

L'existence d'un phénomène de restriction-modification (RM) a été suspectée chez R. meliloti M₁₁S et 2011. Les résultats qui ont été décrits dans le chapitre I pourraient cependant être dus à un changement de l'adsorption des phages sur les bactéries. Il est donc important de vérifier que nous sommes bien en présence d'un phénomène de R.M. qui s'exerce sur l'ADN.

Pour effectuer cette vérification il est indispensable d'extraire de l'ADN qui a été modifié par la souche M₁₁S ou par la 2011 et de mettre cet ADN en présence des extraits cellulaires des deux souches.

Nos premiers essais de purification d'un ADN ont été réalisés sur le Ø6 qui nous avait permis de faire les essais in vivo mais nous nous sommes rendu compte que les manipulations envisagées nécessitaient de nombreux essais préliminaires. La préparation d'une suspension bactériophagique concentrée et l'extraction de l'ADN étant des opérations assez longues, il nous a semblé plus judicieux d'utiliser un ADN plasmidique dont la préparation est plus simple.

La mise en évidence in vitro de la restriction-modification nécessite un plasmide identique, extrait de deux souches de R. meliloti. Seules les modifications spécifiques apportées par les souches hôtes diffèrent d'un plasmide à l'autre.

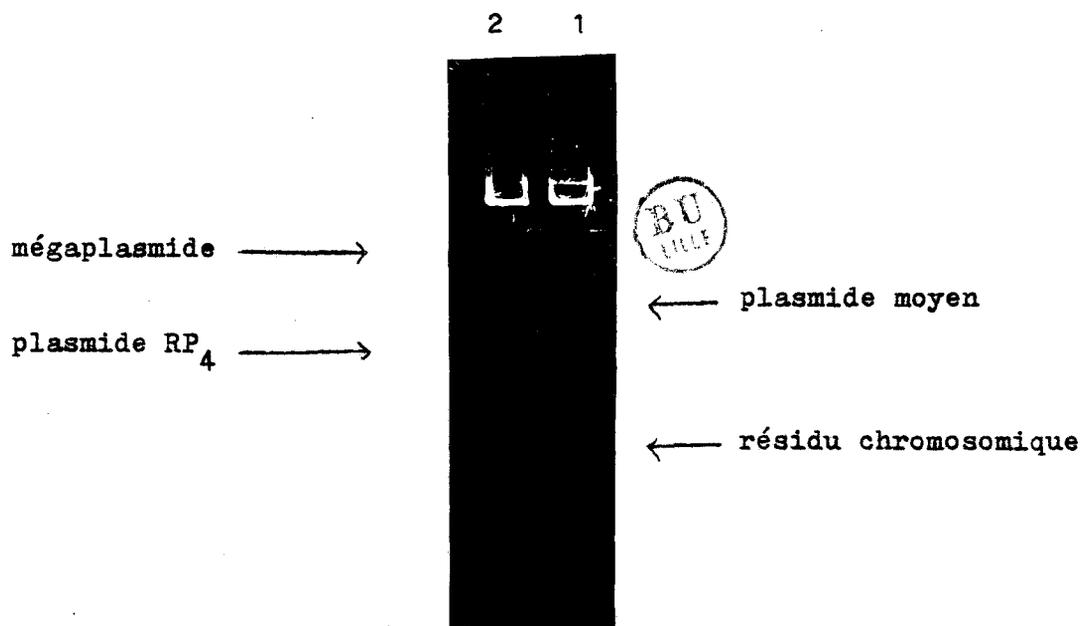
Le plasmide RP_4 par exemple peut être introduit chez R. meliloti (65). Si le plasmide RP_4 est extrait de deux souches différentes, il pourra être utilisé dans les manipulations que nous envisageons.

Nous nous sommes donc procuré deux souches de R. meliloti portant le plasmide RP_4 : la $M_{11}S(RP_4)$ et la $2011(RP_4)$.

2 - Contenu plasmidique des souches de R. meliloti utilisées

Les souches $M_{11}S$ et 2011, ainsi que les souches $M_{11}S(RP_4)$ et $2011(RP_4)$, seront utilisées pour la mise en évidence de la R.M. Dans le but de déterminer leur contenu plasmidique nous avons effectué une électrophorèse en gel d'agarose (PHOTO II).

PHOTO II



Electrophoregramme montrant le contenu plasmidique de deux souches de R. meliloti.

- 1 - $M_{11}S$
- 2 - $2011(RP_4)$

La souche $M_{11}S$ renferme un plasmide géant (mégaplasme) dont la taille est supérieure à 300 Md et un plasmide moyen. La souche 2011(RP_4) renferme également un plasmide géant dont la taille est voisine de celui de la $M_{11}S$ car la distance de migration des deux plasmides est pratiquement identique.

La souche $M_{11}S(RP_4)$ renferme donc les deux plasmides de la $M_{11}S$ et le plasmide RP_4 . La souche 2011 ne renferme que le plasmide géant (24) (65).

La distance de migration au cours d'une électrophorèse en gel d'agarose varie selon la taille du plasmide. Le plasmide géant dont la taille est la plus importante migre à une distance relativement courte tandis que le plasmide RP_4 qui a une taille plus petite migre plus loin.

II. Extraction et concentration du plasmide RP_4 de la $M_{11}S(RP_4)$ et de la 2011(RP_4).

1 - Mise en culture des souches bactériennes

Les précultures des cellules sont réalisées en milieu RC fructosé en présence de tétracycline. En effet le plasmide RP_4 permet à une cellule bactérienne de devenir résistante à la tétracycline même si la souche sauvage était sensible comme c'est le cas des souches 2011 et $M_{11}S$ de R. meliloti. La culture en présence de cet antibiotique permet donc de sélectionner uniquement les cellules qui renferment le RP_4 , les souches sauvages ne peuvent pas se développer (24).

Lorsque les cellules bactériennes arrivent en fin de phase exponentielle de croissance, nous ajoutons du chloramphénicol. Nous constatons (fig. 8) que la densité optique de

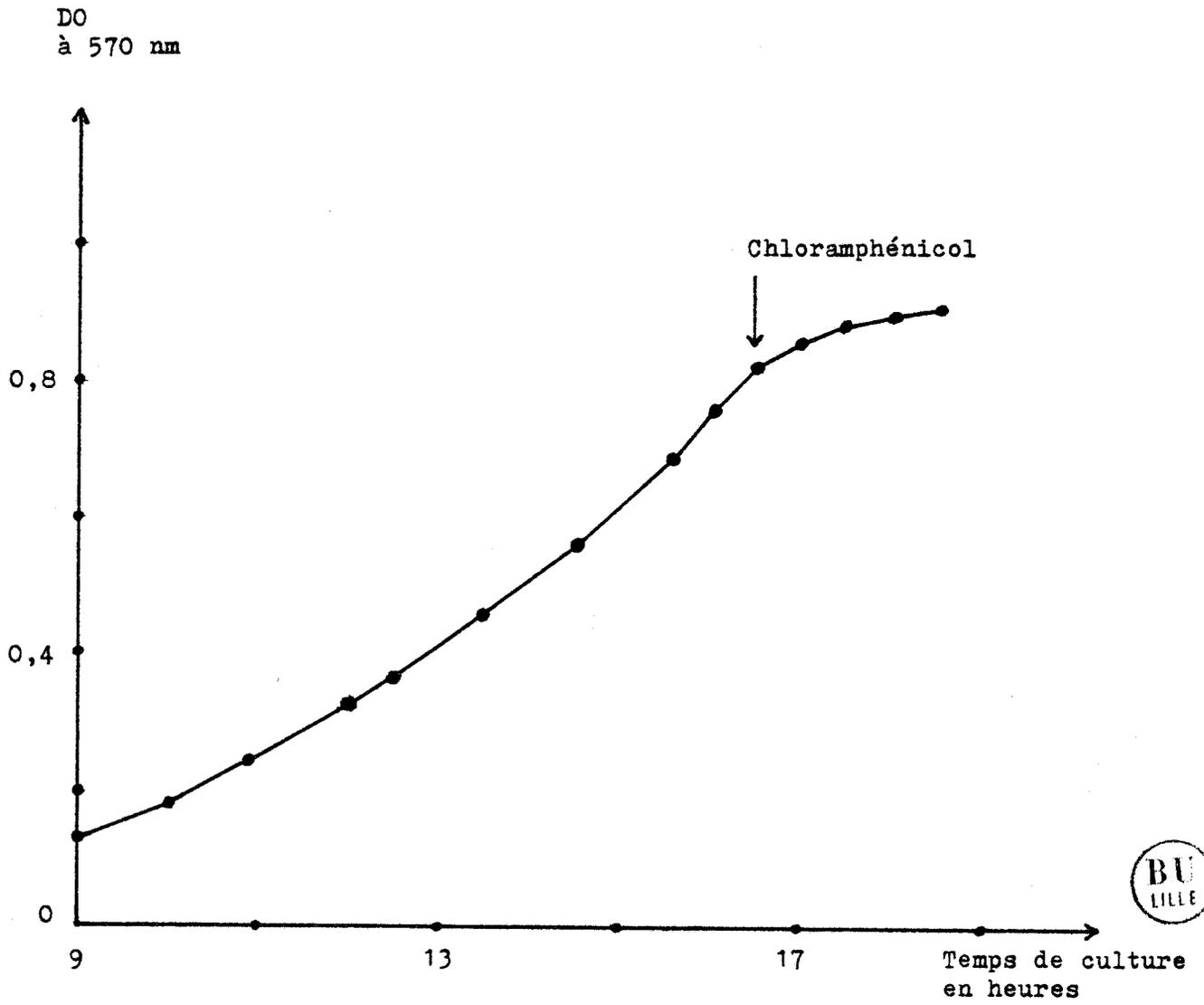


Fig. 8 : Action du chloramphénicol sur la croissance de R. meliloti 2011(RP₄) en milieu RC fructosé.

la culture n'augmente plus aussi rapidement qu'auparavant. En effet la pente de la courbe s'infléchit et la densité optique commence à se stabiliser. L'action du chloramphénicol commence à avoir lieu, pratiquement dès son introduction dans le milieu.

Le chloramphénicol pénètre à l'intérieur de la cellule bactérienne, sa présence va contrarier le déroulement normal des processus de synthèse de constituants importants pour la bactérie. Cet antibiotique interviendrait en empêchant la synthèse des protéines(10). Son action s'exercerait au niveau de la dernière étape qui correspond à la formation des liaisons peptidiques entre les acides aminés. La croissance en longueur de la chaîne protéique deviendrait impossible.

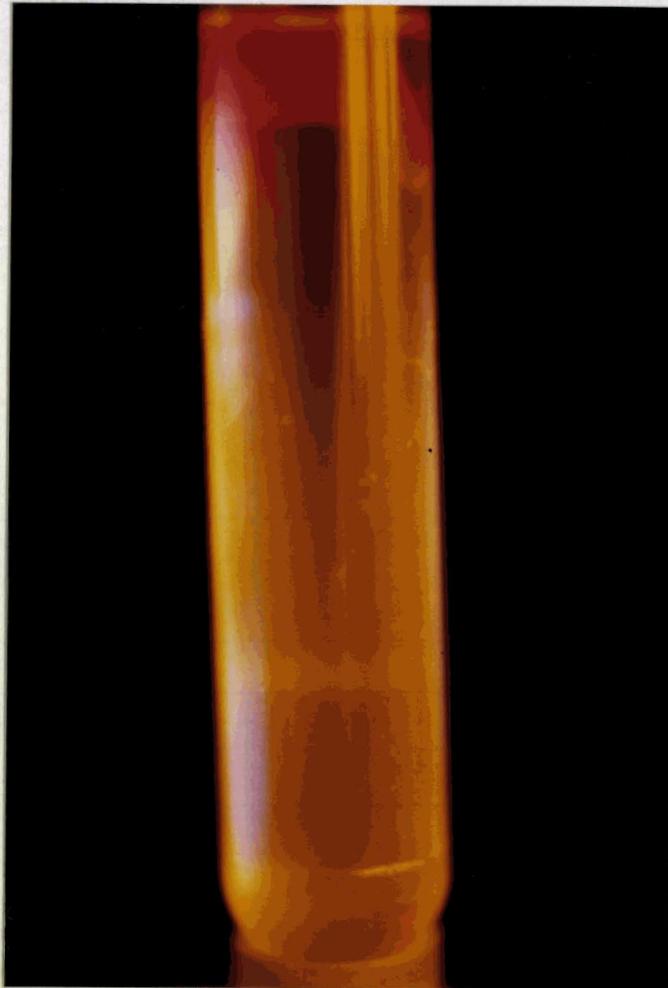
L'arrêt des synthèses de protéines signifie donc pour la cellule l'arrêt de l'apport d'une substance vitale, la croissance bactérienne ne peut plus s'effectuer. Les cellules ne se divisent plus. Cependant l'action du chloramphénicol ne s'exerce pas sur les autres synthèses. L'ADN cellulaire va continuer à être synthétisé. Les molécules d'ADN vont être achevées, les plasmides présents seront tous complètement formés. La synthèse d'ADN cellulaire provoque un grossissement de la cellule, la densité optique du milieu croît légèrement. Il est bien évident que la synthèse d'ADN nécessite la présence de certaines protéines enzymatiques. L'arrêt de la formation des protéines va bloquer la formation de nouvelles enzymes. Le renouvellement ne pouvant plus s'effectuer, la synthèse d'ADN ne peut plus se faire. Les cellules sont alors centrifugées en vue d'extraire le plasmide RP_4 . L'utilisation du chloramphénicol permet donc d'obtenir des cellules bactériennes qui renferment des molécules d'ADN totalement formées. Les plasmides seront refermés et il n'y aura pas de filaments d'ADN avec des extrémités libres.

2 - Extraction et concentration du plasmide
RP₄.

a) Ultracentrifugation de l'extrait cellulaire
en gradient de chlorure de césium.

Après avoir cassé des cellules de 2011(RP₄)
et de M₁₁S(RP₄), nous avons effectué une ultracentrifugation en
gradient de chlorure de césium en vue d'extraire le plasmide RP₄.
La PHOTO III nous donne le profil de centrifugation obtenu avec la
souche 2011(RP₄).

PHOTO III



Ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium
d'un extrait cellulaire de R. meliloti 2011(RP₄)

L'ultracentrifugation de la solution de chlorure de césium entraîne la formation d'un gradient grâce à la force centrifuge. L'ADN se déplace dans le tube jusqu'à ce qu'il rencontre une zone du gradient qui a la même densité que lui. Les molécules d'ADN forment alors une bande. L'ADN que l'on trouve au niveau d'une même bande a la même densité. Lorsqu'il existe plusieurs plasmides différents, ceux-ci se répartissent à des niveaux différents.

Une seule bande apparaît après l'ultracentrifugation de l'extrait de la souche 2011(RP₄), elle est constituée par du plasmide RP₄. Il est important de rappeler que les différentes formes que peut avoir un plasmide (linéaire, circulaire ouverte ou circulaire fermée) ne migreraient pas à la même distance. Le plasmide RP₄ ne serait que sous forme circulaire fermée, car c'est sous cette forme qu'il se trouve généralement dans une cellule bactérienne (6).

Notons également qu'une seule bande d'ADN est visible alors que la souche 2011(RP₄) possède également un plasmide géant et de l'ADN chromosomique. Cependant ces deux types d'ADN ont une taille beaucoup plus importante que le RP₄ et ont donc subi des dégradations au cours des différents traitements.

Le RP₄ a été extrait de la 2011(RP₄) ainsi que de la M₁₁S(RP₄).

b) Vérification de la pureté du plasmide préparé.

La pureté du RP₄ préparé a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose.

Le plasmide provenant de la souche 2011(RP₄) ainsi que celui provenant de la M₁₁S(RP₄) ne donnent qu'une seule bande après électrophorèse (PHOTO IV). L'ADN est donc dans un bon état de pureté. Dans le cas contraire nous aurions observé plusieurs bandes ou des traînées blanches dues à la présence d'ADN dégradé.

Les bandes obtenues migrent à la même distance que l'ADN λ utilisé comme témoin. L'ADN λ étant sous forme linéaire et le RP_4 sous forme circulaire fermée, nous pouvons en déduire que la taille du RP_4 est supérieure à celle de l'ADN λ qui est d'environ 32,3 Mdaltons.

PHOTO IV

1 2 3



Electrophorèse en gel d'agarose de l'ADN λ et du plasmide RP_4 provenant de la 2011(RP_4) et de la $M_{11}S(RP_4)$

- 1 - ADN λ
- 2 - ADN RP_4 provenant de la $M_{11}S(RP_4)$
- 3 - ADN RP_4 provenant de la 2011(RP_4)

III. Digestion du RP₄ par les extraits cellulaires des souches 2011 et M₁₁S de R. meliloti

Nous avons préparé deux extraits cellulaires des souches M₁₁S et 2011. Chaque plasmide RP₄ est mis à incuber en présence des deux extraits dans les mêmes conditions expérimentales.

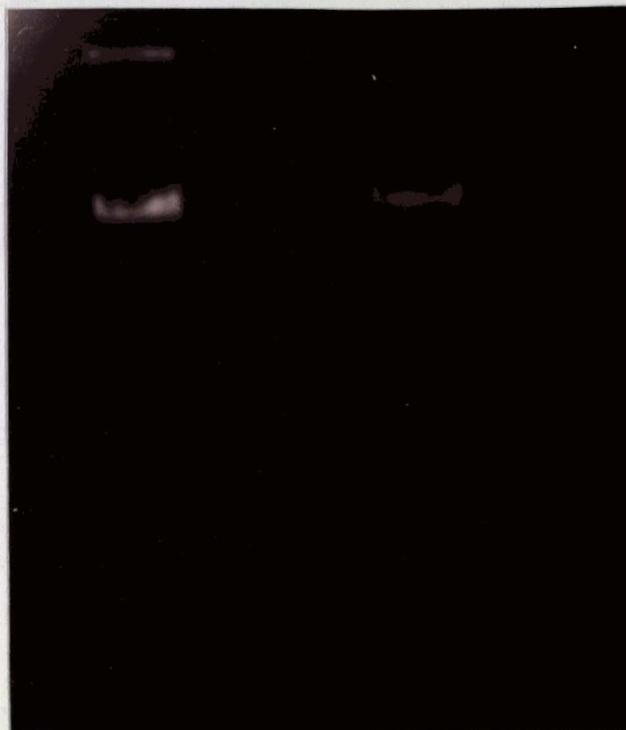
1 - Digestion du RP₄ isolé de la 2011(RP₄)

L'ADN RP₄ isolé de la 2011(RP₄) et mis en présence de l'extrait cellulaire de la 2011, donne une bande visible après électrophorèse (PHOTO V, ligne 4). L'ADN est donc intact, il n'a pas subi de digestion.

Par contre le même ADN, mis en présence de l'extrait de la M₁₁S ne donne plus une bande nette (PHOTO V, ligne 2). Nous constatons une traînée blanche qui correspond à des produits de dégradation de l'ADN.

PHOTO V

1 2 3 4



Electrophorogramme du plasmide RP_4 isolé de la 2011(RP_4) et
préalablement incubé avec les extraits cellulaires de la
2011 et de la $M_{11}S$

- 1 - RP_4 (témoin)
- 2 - RP_4 + Extrait cellulaire de la $M_{11}S$ + ATP-SAM- Mg^{2+}
- 3 - RP_4 + Extrait cellulaire de la $M_{11}S$ + Mg^{2+}
- 4 - RP_4 + Extrait cellulaire de la 2011 + ATP-SAM- Mg^{2+}

L'ADN a été modifié spécifiquement par la souche 2011. Des séquences nucléotidiques de l'ADN auraient été méthylées par des enzymes de R.M. présentes chez la 2011. Les endonucléases de restriction de la 2011 ne pourraient donc pas couper l'ADN.

Lorsque l'ADN isolé de la 2011(RP₄) est incubé avec l'extrait de la M₁₁S, nous obtenons une dégradation de l'ADN. Il existerait des enzymes de restriction chez la M₁₁S qui couperaient la molécule d'ADN en des sites spécifiques. Ces sites seraient différents de ceux qui sont reconnus par les enzymes de la 2011. En effet les sites reconnus par les enzymes de la 2011 ont été méthylés et sont donc protégés de la coupure par n'importe quelle endonucléase de restriction. Si l'ADN a été coupé par les enzymes de la M₁₁S, les sites reconnus sont donc différents.

L'action d'une endonucléase de restriction donne généralement naissance à plusieurs fragments d'ADN. Nous aurions donc dû apercevoir plusieurs bandes après électrophorèse. Le fait que nous n'ayons obtenu qu'une traînée, s'expliquerait par la présence dans l'extrait cellulaire d'une exonucléase très active.

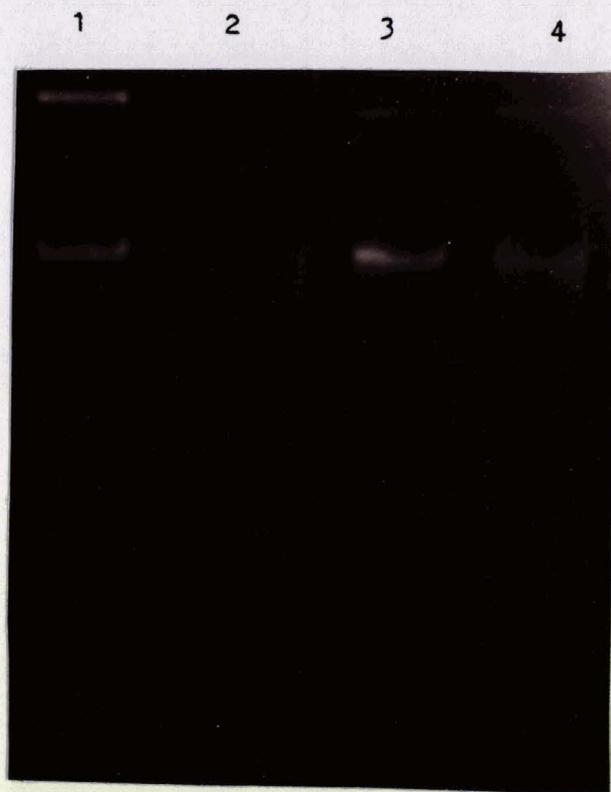
Les essais effectués précédemment ont eu lieu en présence de trois cofacteurs ((ATP, SAM et Mg²⁺). Nous avons également fait un essai avec l'extrait de la M₁₁S en présence de Mg²⁺ uniquement (PHOTO V, ligne 3). Le résultat obtenu est différent, en effet le plasmide RP₄ isolé de la 2011(RP₄) n'est pas dégradé par l'extrait de la M₁₁S en présence de Mg²⁺ uniquement. Cependant nous ne nous attarderons pas sur ce résultat, l'action des cofacteurs sur la digestion de l'ADN sera décrite ultérieurement.

2 - Digestion du RP₄ isolé de la M₁₁S(RP₄)

Les résultats obtenus avec le plasmide RP₄ isolé de la M₁₁S(RP₄) et ceux obtenus avec le RP₄ isolé de la 2011 (RP₄) sont similaires. En effet l'extrait cellulaire de la M₁₁S ne provoque pas une dégradation totale de l'ADN (PHOTO VI, ligne 4). Celui-ci a donc été modifié spécifiquement par la souche M₁₁S, de ce fait il devient insensible aux enzymes de restriction de la M₁₁S.

Par contre l'ADN est dégradé par l'extrait cellulaire de la 2011 (PHOTO VI, ligne 2). Les produits de la digestion de l'ADN forment une traînée blanche sur la photographie.

PHOTO VI



Electrophorégramme du plasmide RP_4 isolé de la $M_{11}S(RP_4)$ et préalablement incubé avec les extraits cellulaires de la $M_{11}S$ et de la 2011

- 1 - ADN RP_4 (témoin)
- 2 - RP_4 + Extrait cellulaire de la 2011 + ATP-SAM- Mg^{2+}
- 3 - RP_4 + Extrait cellulaire de la 2011 + Mg^{2+}
- 4 - RP_4 + Extrait cellulaire de la $M_{11}S$ + ATP-SAM- Mg^{2+}

L'action des endonucléases peut s'exprimer en présence des trois cofacteurs (ATP, SAM et Mg^{2+}). Lorsque le Mg^{2+} est présent seul, l'ADN reste intact (PHOTO VI, ligne 3).

Les souches $M_{11}S$ et 2011 renferment au moins une enzyme de restriction qui agit sur le plasmide RP_4 .

Cependant dans ces deux souches plusieurs systèmes peuvent coexister. La souche $M_{11}S$, par exemple, renferme un plasmide géant, un plasmide moyen et un chromosome. De ce fait il pourrait exister trois systèmes, chacun codé par l'une des formes d'ADN intracellulaire.

Dans nos études ultérieures de la restriction chez R. meliloti nous utiliserons la souche $M_{11}S$ et l'ADN de bactériophage λ qui est l'ADN le plus couramment employé dans ce type d'étude. De plus il est commercialisé et donc disponible en grande quantité. Cet ADN λ permettra sans doute de mettre en évidence certaines propriétés des enzymes de restriction de R. meliloti.

CHAPITRE III

PROPRIETES DES ENZYMES DE RESTRICTION

CONTENUES DANS L'EXTRAIT CELLULAIRE

DE R. MELILOTI M₁₁S

I. Influence des cofacteurs sur l'activité endonucléasique de restriction.

Le mélange réactionnel utilisé pour la mise en évidence in vitro de la dégradation du plasmide RP₄ renfermait les trois cofacteurs suivants : ATP, SAM et Mg²⁺. En leur présence toutes les endonucléases de restriction peuvent avoir une activité. Or nous savons, d'après les travaux de MESELSON et YUAN (36) que ces enzymes sont divisées en trois groupes selon qu'elles nécessitent un, deux ou les trois cofacteurs mentionnés ci-dessus.

Les enzymes du premier groupe (type I) ne peuvent agir sans l'apport des trois cofacteurs. Les enzymes de type II nécessitent uniquement du Mg²⁺. Les enzymes de type III ne peuvent agir qu'en présence de l'ATP et du Mg²⁺, la SAM n'est pas indispensable, cependant, lorsqu'elle est présente, elle provoque une stimulation de l'activité enzymatique.

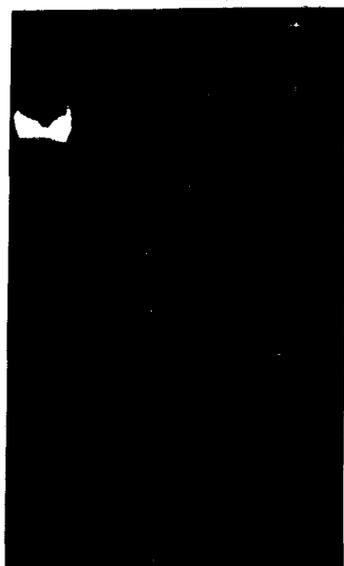
Pour connaître le groupe auquel appartiennent les enzymes de restriction dont nous avons mis en évidence l'activité, nous avons incubé de l'ADN λ avec l'extrait cellulaire de la M₁₁S en faisant varier le nombre des cofacteurs présents.

Lorsque le Mg²⁺ est seul cofacteur, une bande d'ADN est visible après électrophorèse (PHOTO VII, ligne 4). L'ADN n'a donc pas été dégradé car la bande migre à la même distance que celle du témoin (PHOTO VII, ligne 1).

Lorsque l'incubation a lieu avec l'ATP et le Mg^{2+} , l'ADN λ est totalement dégradé puisqu'il n'est plus visible après électrophorèse (PHOTO VII, ligne 3). Le même phénomène se produit lorsque les trois cofacteurs sont présents au cours de l'incubation (PHOTO VII, ligne 2).

PHOTO VII

1 2 3 4



Incubation de l'ADN λ avec l'extrait cellulaire de la souche $M_{11}S$ en faisant varier le nombre de cofacteurs.

- 1 - ADN λ (témoin)
- 2 - Incubation avec l'ATP, la SAM et le Mg^{2+}
- 3 - Incubation avec l'ATP et le Mg^{2+}
- 4 - Incubation avec le Mg^{2+}

Nous serions tentés de conclure que les endonucléases présentes dans l'extrait cellulaire de la $M_{11}S$ sont de type III puisqu'une activité est décelable en présence d'ATP et de Mg^{2+} . Mais nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse selon laquelle une certaine quantité de SAM pourrait être présente après dialyse. En effet ce cofacteur aurait la propriété de se fixer sur l'enzyme. Dans ce cas les trois cofacteurs seraient présents et les enzymes de type I pourraient également agir. L'activité que nous avons décelée est donc due à des enzymes de type I ou III. Les particularités de ces deux types d'enzymes sont telles qu'il est très difficile de les différencier.

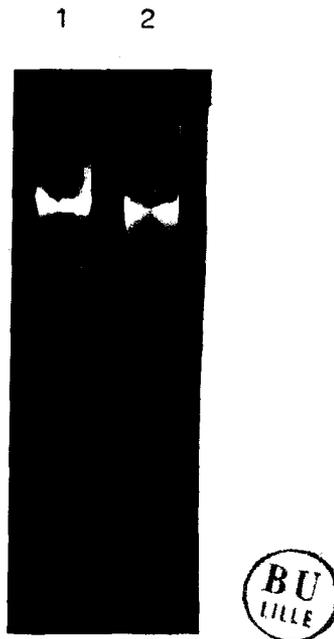
Il n'est pas exclu que l'extrait cellulaire renferme des enzymes de type I et également des enzymes de type III. En effet plusieurs systèmes peuvent exister simultanément. Nous avons vu que la souche $M_{11}S$ possédait un plasmide géant, un plasmide moyen et un chromosome. Chaque type d'ADN peut coder la synthèse d'un système de restriction-modification. Il n'est pas impossible qu'il puisse exister trois systèmes différents chez R. meliloti $M_{11}S$.

II. Localisation des endonucléases de restriction dans la cellule.

Au cours des travaux qui nous ont permis de détecter une activité endonucléasique, nous avons utilisé des extraits cellulaires. Il nous a semblé important de vérifier que l'enzyme ne se trouvait pas également au niveau de la membrane, car, dans ce cas, une grande quantité d'enzymes aurait été perdue au cours de la préparation de l'extrait. Nous avons donc incubé l'ADN λ avec des fragments membranaires de la $M_{11}S$.

Après électrophorèse nous pouvons constater que l'ADN est encore intact puisqu'une bande nette est visible (PHOTO VIII) à la même distance de migration que celle du témoin.

PHOTO VIII



Electrophorégramme de l'ADN λ préalablement incubé avec des fragments membranaires de la $M_{11}S$ en présence des trois cofacteurs

1 - ADN λ (témoin)

2 - ADN + fragments membranaires

Les fragments membranaires utilisés ne portent pas l'activité endonucléasique. Or l'endonucléase ECoRI a été localisée au niveau de la membrane cytoplasmique et dans le cytoplasme bactérien (67). Le fait que nous n'ayons pas d'activité avec les fragments membranaires pourrait s'expliquer par les moyens drastiques utilisés pour casser les cellules. Les enzymes pourraient être localisées au niveau de la membrane lorsque la cellule de R. meliloti est intacte, mais il n'y aurait pas de liaisons solides. Lorsque les cellules sont cassées, les enzymes sont décrochées et elles se retrouvent dans l'extrait cellulaire.

Il nous a semblé intéressant d'étudier l'influence de quelques facteurs sur la résistance des enzymes. Nous avons déterminé l'influence du chlorure de sodium 2 M et de la température sur l'activité enzymatique.

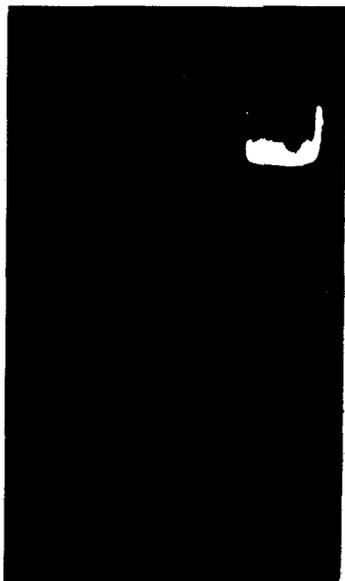
III. Résistance de l'enzyme.

1 - Influence du chlorure de sodium.

L'extrait cellulaire a été mis en contact avec du chlorure de sodium 2 M pendant 30 minutes puis dialysé une nuit. Cet extrait a été mis à incuber en présence d'ADN λ . Nous avons constaté que l'ADN n'a pas été dégradé (PHOTO IX, ligne 2).

PHOTO IX

3 2 1



Influence du chlorure de sodium 2 M sur l'activité endonu-
cléasique de restriction contenue dans
l'extrait cellulaire de la $M_{11}S$

- 1 - ADN λ (témoin)
- 2 - ADN λ incubé avec de l'extrait qui a été en contact
avec NaCl
- 3 - ADN λ incubé avec l'extrait.

Lorsque les enzymes sont en contact avec
le chlorure de sodium 2 M nous obtenons une disparition de l'activité
endonucléasique. Par contre l'extrait qui n'a pas été mis en présence
de NaCl entraîne une digestion totale de l'ADN λ (PHOTO IX, ligne 3).

Le chlorure de sodium provoque donc une
inactivation des enzymes. Il est préférable d'éviter d'utiliser
ce sel à une concentration assez importante si l'on désire obtenir
un extrait qui a une forte activité.

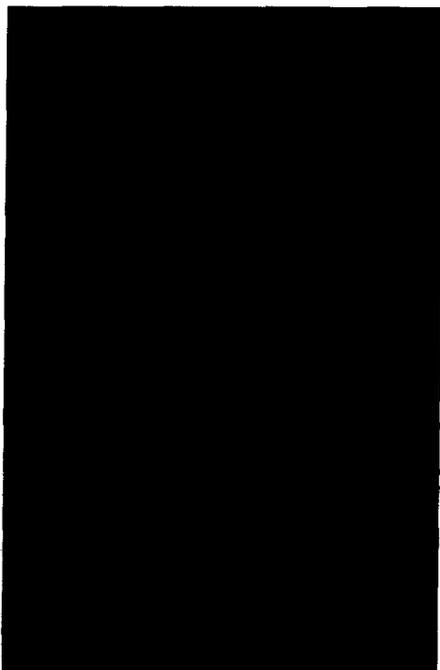
2 - Influence de la température.

Pour tester l'influence de la température sur l'activité des enzymes, nous avons porté l'extrait cellulaire de la $M_{11}S$ à une température de $65^{\circ}C$ pendant 10 min. Cet extrait a été mis à incuber en présence de l'ADN λ .

Nous nous sommes aperçus qu'une bande apparaissait après électrophorèse (PHOTO X, ligne 3). Par contre l'extrait qui n'a pas été chauffé entraîne une digestion de l'ADN (PHOTO X, ligne 2).

PHOTO X

3 2 1



Influence de la température sur l'activité endonucléasique de restriction contenue dans l'extrait cellulaire de la $M_{11}S$.

- 1 - ADN (témoin)
- 2 - ADN λ incubé avec de l'extrait non chauffé
- 3 - ADN incubé avec l'extrait qui a été porté à $65^{\circ}C$ pendant 10 min.

Les enzymes sont dénaturées à une température de 65°C. Cette température n'est pas très forte, ce qui montrerait que les enzymes sont assez fragiles.

Les travaux qui ont été effectués sur d'autres endonucléases de restriction ont mis en évidence cette caractéristique. Un chauffage de 65°C pendant 10 min. est généralement utilisé pour stopper l'activité endonucléasique de restriction contenue dans une solution (66).

IV. Influence de l'héparine.

Dans le but de poursuivre l'étude de l'influence de certains facteurs sur l'activité enzymatique de restriction, nous avons tenté de déterminer le rôle de l'héparine lorsque ce composé était présent dans le mélange réactionnel au cours de l'incubation.

L'ADN λ a été préincubé 10 minutes avec l'extrait cellulaire et les cofacteurs, il a ensuite été mis à incuber une heure avec de l'héparine. L'ADN a alors été totalement dégradé (PHOTO XI, ligne 2). Ceci s'expliquerait par le fait que les enzymes peuvent se fixer sur l'ADN, l'addition d'héparine ne provoque pas une séparation du complexe enzyme-ADN, l'ADN serait alors coupé.

Par contre la présence simultanée de l'ADN et de l'héparine avant l'addition de l'extrait et des cofacteurs, ne provoque pas, par la suite, une dégradation de l'ADN (PHOTO XI, ligne 3). En effet l'héparine a une structure polyanionique comme l'ADN, de ce fait ce composé entre en compétition avec l'ADN λ pour fixer les enzymes. Lorsque l'enzyme est en présence d'ADN et d'héparine, elle se fixe de préférence sur l'héparine car ce composé est en excès par rapport à l'ADN. De ce fait l'ADN reste intact après l'incubation.

PHOTO XI

1 2 3



Electrophorégramme de l'ADN λ préalablement incubé avec de l'extrait cellulaire de la $M_{11}S$ en présence de l'héparine

- 1 - ADN λ (témoin)
- 2 - Héparine ajoutée après la préincubation de l'ADN avec l'extrait et les cofacteurs.
- 3 - Héparine préincubée avec l'ADN avant l'addition de l'extrait et des cofacteurs.

Les résultats que nous venons de décrire sont similaires à ceux qui ont été observés par YUAN et REISER (57) au cours de l'étude du mécanisme d'action de l'endonucléase de restriction. ECoP₁₅.

L'action d'une endonucléase de restriction sur un ADN entraîne généralement la formation de fragments qui sont visibles après électrophorèse. Or les résultats que nous obtenons nous amèneraient à conclure que l'ADN est totalement dégradé lors de l'incubation. Il nous a semblé intéressant d'étudier son devenir après l'action des enzymes de restriction. Pour cela nous avons utilisé de l'ADN λ qui a subi un marquage radioactif.

V. Digestion de l'ADN λ marqué au ^{35}S .

L'ADN λ a été marqué au ^{35}S à l'aide de DNase et d'ADN polymérase I. Il présente donc des extrémités libres car l'ADN polymérase I est capable de reconstituer la chaîne d'ADN qui a été dégradée par la DNase mais l'ADN polymérase I n'est pas capable de refermer la chaîne d'ADN. La molécule serait sous forme circulaire ouverte et donc susceptible d'être attaquée par des endonucléases de restriction et par des exonucléases.

Après avoir incubé l'ADN λ marqué, avec des quantités croissantes d'extrait cellulaire de $M_{11}\text{S}$, nous avons mesuré la radioactivité de l'ADN qui est retenu sur le filtre.

La figure 9 nous permet de constater une diminution de la radioactivité lorsque le volume d'extrait utilisé augmente. Il y a donc une disparition de l'ADN λ qui est proportionnelle à la quantité d'extrait utilisé. Nous obtenons une droite.

Nous savons que le filtre ne peut retenir que des fragments assez longs et des molécules intactes. Les petits fragments et les nucléotides passent à travers le filtre sans être retenus. L'ADN qui a disparu a donc été, soit coupé en très petits fragments, soit dégradé jusqu'au stade de nucléotides.

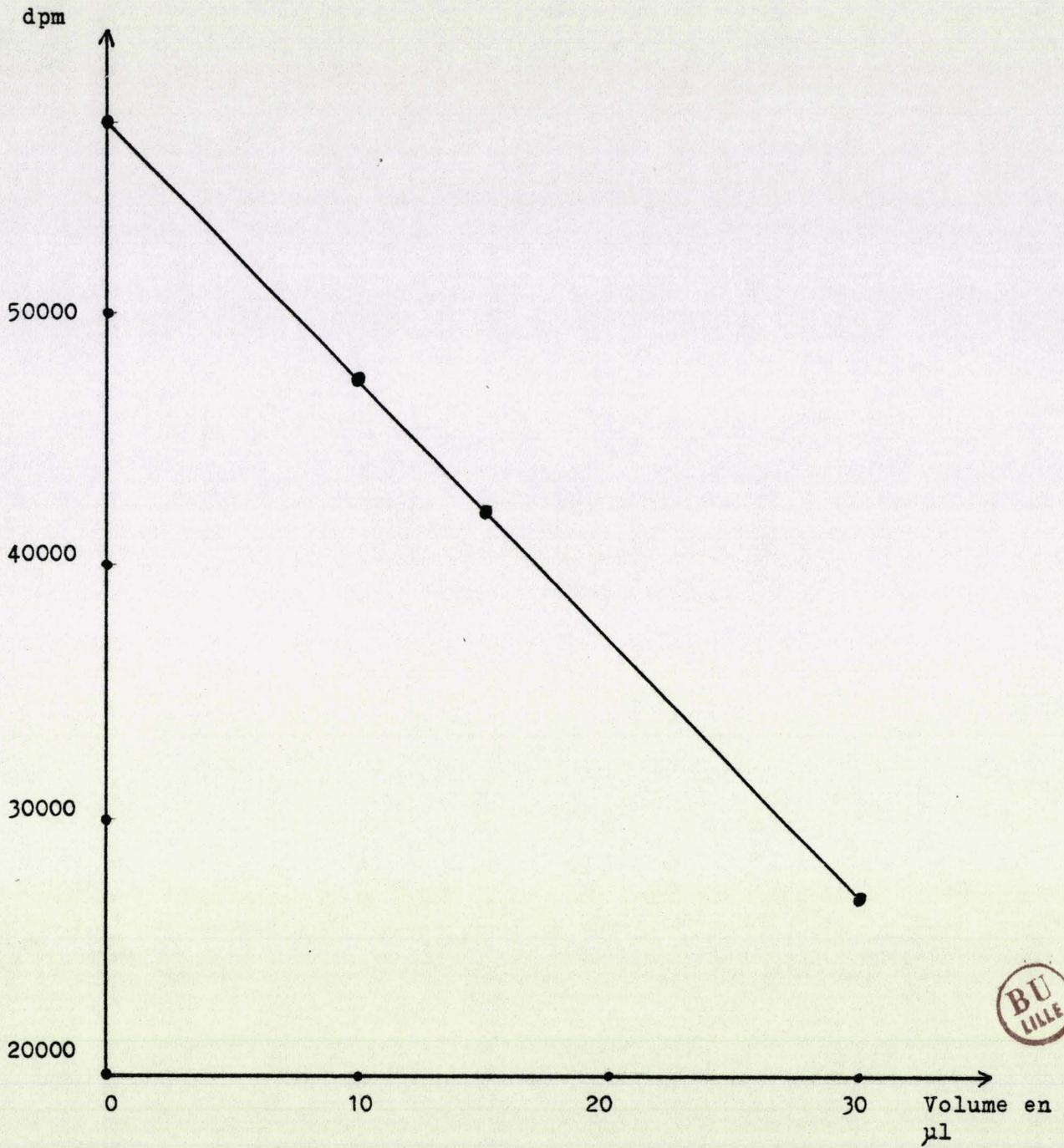


Fig. 9 : Mesure de la radioactivité de l'ADN λ qui est retenu sur le filtre en fonction du volume d'extrait cellulaire utilisé lors de l'incubation

Si l'ADN λ qui a disparu a été transformé en de nombreux petits fragments de quelques nucléotides cela nous amènerait à conclure qu'il existe une ou plusieurs endonucléases dans l'extrait. Il existerait de nombreux sites de coupure sur l'ADN. Ou nous sommes en présence d'une seule endonucléase qui reconnaîtrait de nombreux sites, la spécificité de l'enzyme serait alors assez faible, ou nous sommes en présence de plusieurs endonucléases qui reconnaîtraient chacune une séquence nucléotidique spécifique.

Si l'ADN λ disparu a été transformé en nucléotides. Nous serions également en présence d'une exonucléase non spécifique. L'ADN λ aurait été coupé en fragments qui auraient ensuite été totalement digérés par l'exonucléase. L'activité exonucléasique serait donc très importante dans l'extrait cellulaire de R. meliloti M₁₁S.

CHAPITRE IV

ESSAI DE PURIFICATION DES ENZYMES DE RESTRICTION

DE R. MELILOTI M₁₁S

Au cours de nos études nous nous sommes aperçus qu'il pourrait exister deux types d'enzymes capables d'agir sur l'ADN dans l'extrait brut de R. meliloti M₁₁S. Une ou plusieurs endonucléases de restriction qui entraîneraient la formation de fragments à partir de l'ADN λ et des exonucléases qui dégraderaient totalement les fragments d'ADN.

Pour essayer d'obtenir des fragments d'ADN il est important de tenter de purifier les endonucléases et de les séparer ainsi des exonucléases. Nous avons envisagé de fractionner les protéines par précipitation au sulfate d'ammonium et d'effectuer une chromatographie d'échange d'ions sur DEAE cellulose.

I. Fractionnement au sulfate d'ammonium des protéines de l'extrait cellulaire de M₁₁S.

1 - Quantité de protéines recueillies dans chaque fraction.

Nous avons fractionné les protéines contenues dans 4 ml d'extrait cellulaire dont la concentration en protéines était de 16,5 mg par ml. Nous avons récupéré trois fractions après précipitations successives par des concentrations en sulfate d'ammonium de 35, 55 et 75 %. Le volume et la concentration en protéines de chaque solution ont été déterminés (Tableau VI).

TABLEAU VI

	30 %	55 %	75 %
Volume en ml	0,3	3	2
Concentration en µg/µl	1	15,7	9,3
Quantité de protéines en mg	0,3	47,1	18,5

Quantités de protéines dans chacune des trois fractions obtenues par précipitation dans le sulfate d'ammonium à des concentrations de 30,55 et 75 %.

Nous pouvons constater que la quasi totalité des protéines initialement présentes dans l'extrait ont été précipitées.

Les résultats du tableau VI nous ont permis de déterminer le pourcentage en protéines recueillies dans chaque fraction par rapport au total des protéines (fig.10).



% par rapport
au total

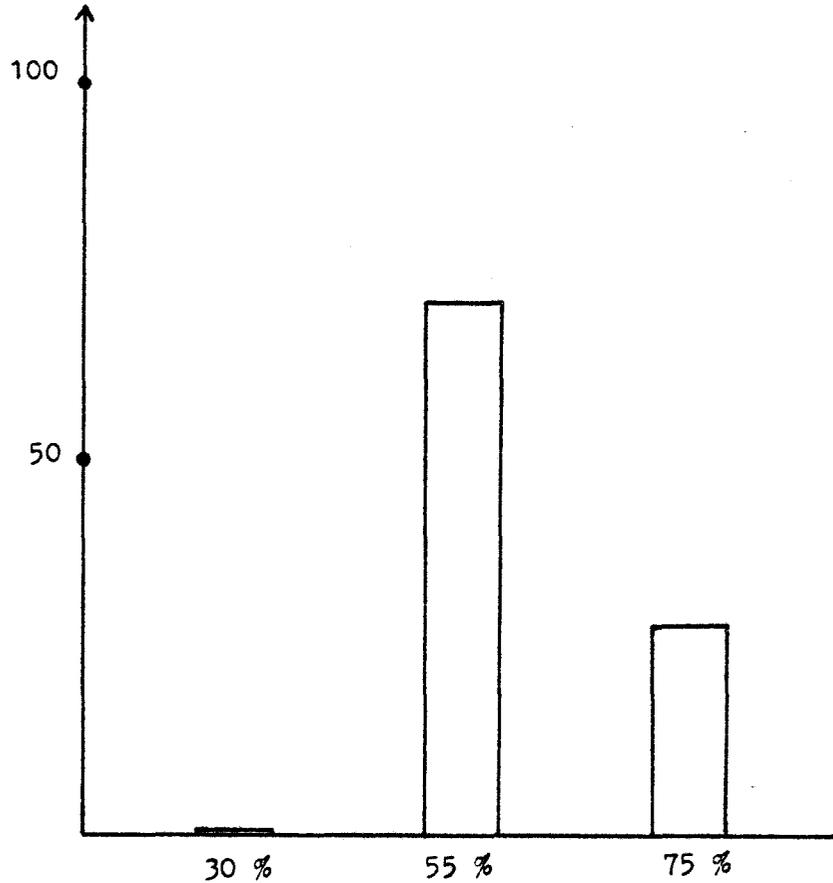


Fig. 10 : Pourcentage des protéines recueillies par rapport au total des protéines initialement présentes dans l'extrait brut. Les pourcentages sont donnés pour les trois fractions obtenues par le sulfate d'ammonium à des concentrations de 30, 55 et 75 %

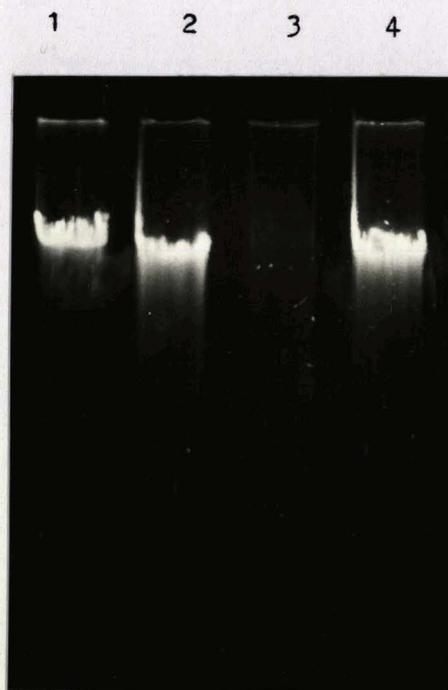
La fraction 30 % ne renferme presque pas de protéines, soit 0,45 pour cent du total. La fraction 55 % est celle qui renferme le plus de protéines. Par contre la dernière fraction n'en contient qu'environ 30 pour cent.

Nous avons tenté de détecter la présence des endonucléases de restriction dans chacune des fractions.

2 - Mise en évidence de l'activité endo-
nucléasique de restriction.

L'ADN λ a été incubé en présence de chacune
des fractions (PHOTO XII).

PHOTO XII



Electrophorèse de l'ADN λ après incubation avec
30 μ l de chacune des fractions recueillies
avec le sulfate d'ammonium

- 1 - ADN λ (témoin)
- 2 - Avec la fraction 30 %
- 3 - Avec la fraction 55 %
- 4 - Avec la fraction 75 %

Les fractions 30 et 75 % ne renferment pas d'activité endonucléasique de restriction car l'ADN est toujours intact après l'incubation (PHOTO XII, ligne 2 et 4). La fraction 55 % contient les protéines précipitant entre 30 et 55 % de sulfate d'ammonium. Nous n'observons plus de bande d'ADN lorsque l'incubation a lieu avec la fraction 55 % (PHOTO XII, ligne 3). Cette fraction renferme presque toute l'activité endonucléasique.

II. Fractionnement des protéines par chromatographie d'échange d'ions.

1 - Profil d'élution des protéines.

Les protéines de l'extrait cellulaire brut sont fractionnées par chromatographie d'échange d'ions sur diéthylaminoéthyl cellulose. Les éluions sont réalisées par des solutions de K_2HPO_4 / KH_2PO_4 en concentrations croissantes.

Le profil d'élution des protéines par le gradient discontinu fait apparaître 4 pics (fig. 11). Le premier pic correspond aux protéines qui ne sont pas retenues sur la colonne, les pics suivants sont constitués par des protéines éluées à des concentrations de K_2HPO_4 / KH_2PO_4 de 0,1 M, 0,2 M et 0,4 M.

2 - Dosage des protéines dans les fractions recueillies.

Le contenu en protéines de chacune des fractions est donné dans un tableau VII.

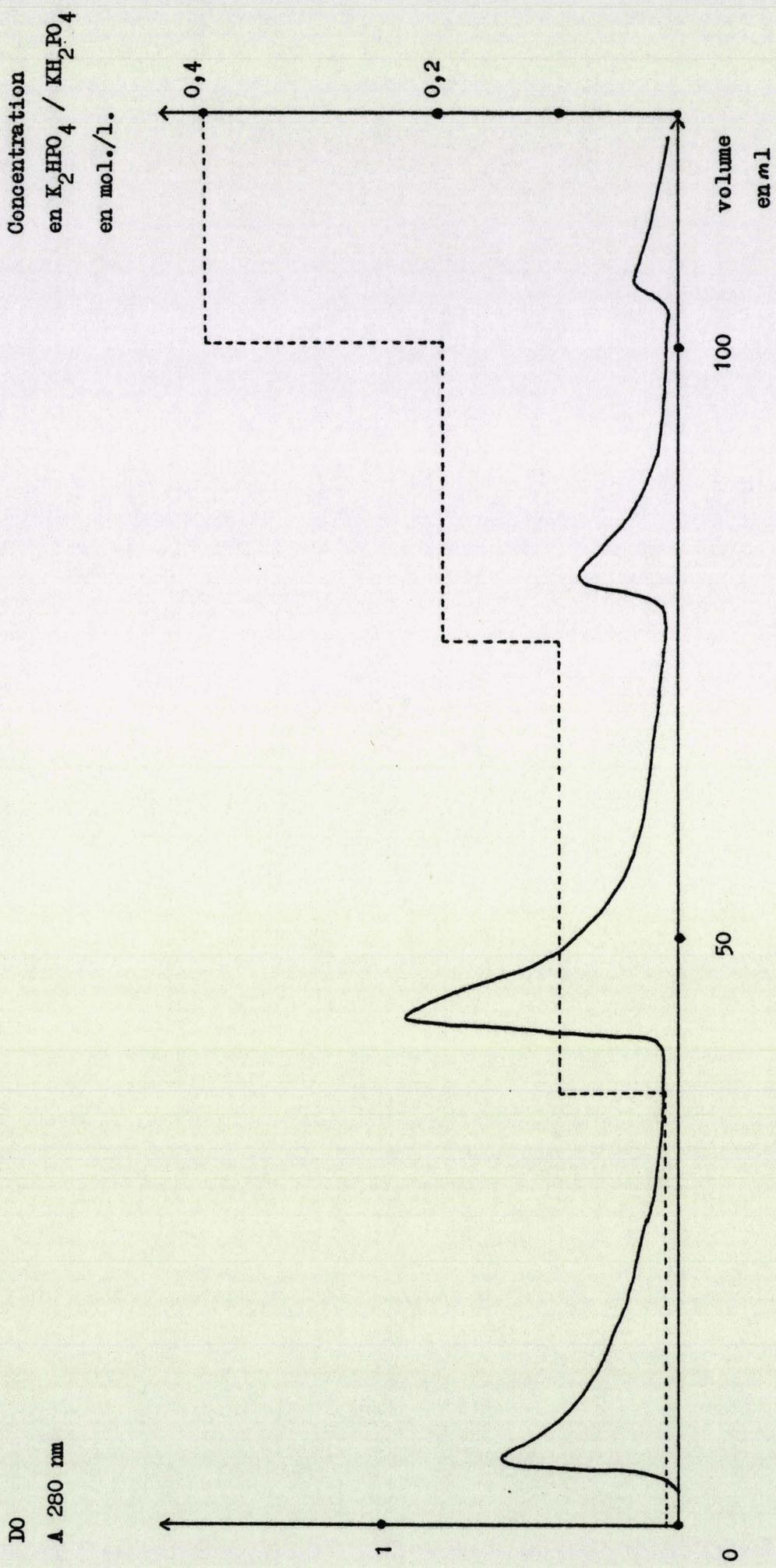


Fig. 11 : Profil d'élution des protéines de l'extrait de $M_{1,5}$ par un gradient discontinu en K_2HPO_4 / KH_2PO_4 sur DEAE cellulose



TABLEAU VII

	:	:	:	:	:
Fractions	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:
Protéines	:	:	:	:	:
en mg	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:
Pourcentage	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:



Quantité des protéines et pourcentage, par rapport au total des protéines de l'extrait, de chacune des fractions recueillies après chromatographie sur DEAE cellulose de
12 ml d'extrait renfermant
180 mg de protéines

Presque toutes les protéines présentes dans l'extrait ont été recueillies. La fraction qui en renferme le plus est celle qui a été obtenue après élution par la solution 0,1 M. Les fractions 0,1 M et 0,2 M renferment près de 75 % du total des protéines.

La fraction 0,01 M renferme 8,5 mg de protéines qui passent dans la colonne sans être retenues par l'échangeur d'ions. La mesure de la DO donnait une valeur élevée

(fig. 11) pour cette fraction, ce qui serait dû au fait que la fraction 0,01 M renfermerait des substances non protéiques qui absorberaient en UV.

Nous avons ensuite essayé de détecter la présence d'une activité endonucléasique de restriction dans toutes les fractions.

3 - Mise en évidence de l'activité endonucléasique de restriction.

Un volume de chaque fraction renfermant environ 150 µg de protéines a été incubé avec de l'ADN λ en présence des trois cofacteurs.

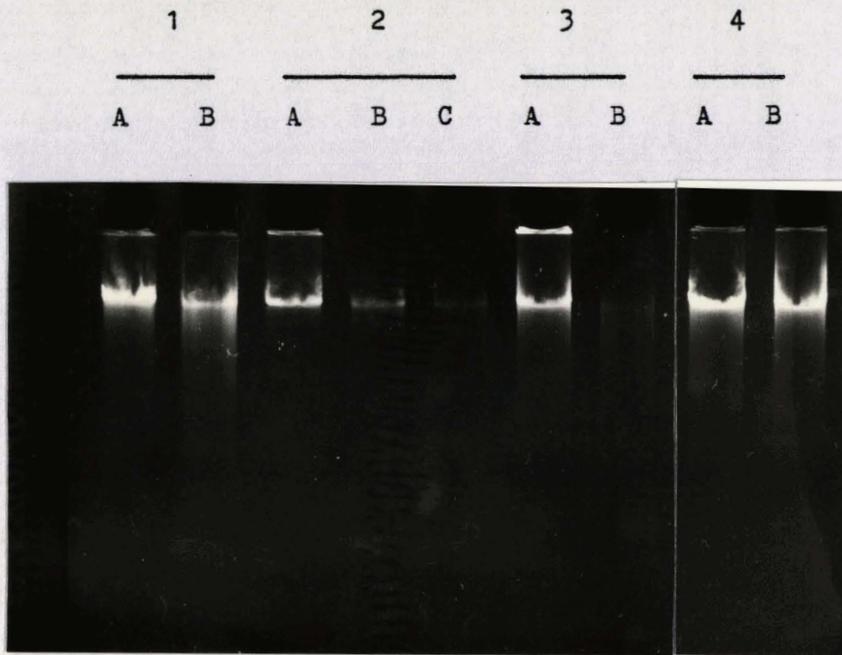
Nous avons constaté (PHOTO XIII, 1B) que l'ADN était encore intact après l'électrophorèse lorsque la fraction 0,01 M était utilisée. Cette fraction ne renferme donc pas d'activité endonucléasique. C'est le cas également de la fraction 0,4 M (PHOTO XIII, 4B).



L'incubation en présence de la fraction 0,1 M provoque une digestion partielle de l'ADN λ après 30 min. La dégradation devient totale après 60 min. (PHOTO XIII, 2B et 2C). La fraction 0,1 M renferme donc des endonucléases.

Lorsque l'incubation a lieu avec la fraction 0,2 M, nous pouvons constater qu'il n'y a plus d'ADN λ (PHOTO XIII, 3B) après 30 min. Cette solution renferme donc des endonucléases en plus grande quantité que dans la fraction 0,1 M puisqu'il faut deux fois plus de temps à la fraction 0,1 M pour dégrader l'ADN λ qu'il n'en faut à la fraction 0,2 M.

PHOTO XIII



Electrophorèse de l'ADN λ préalablement incubé avec les fractions obtenues par chromatographie sur DEAE cellulose en présence des trois cofacteurs.

- | | |
|---------------------|------------------------|
| 1 - Fraction 0,01 M | A - Témoin |
| | B - Incubation 60 min. |
| 2 - Fraction 0,1 M | A - Témoin |
| | B - Incubation 30 min. |
| | C - Incubation 60 min. |
| 3 - Fraction 0,2 M | A - Témoin |
| | B - Incubation 30 min. |
| 4 - Fraction 0,4 M | A - Témoin |
| | B - Incubation 60 min. |

L'activité endonucléasique de restriction est retrouvée dans les fractions 0,1 M et 0,2 M. Celles-ci contiennent environ 75 % du total des protéines de l'extrait.

4 - Electrophorèse des protéines.

Nous avons effectué une électrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines de l'extrait cellulaire brut de la souche M₁₁S ainsi que des fractions renfermant les enzymes de restriction.

L'extrait cellulaire renferme une quantité importante de protéines car de nombreux pics apparaissent en électrophorèse après lecture du gel à 588 nm (fig. 12). De même les fractions 0,1 M (fig. 13) et 0,2 M (fig. 14) contiennent de nombreuses protéines.

L'existence d'un nombre important de protéines dans les deux fractions 0,1 M et 0,2 M fait que les résultats de la digestion de l'ADN λ sont similaires à ceux obtenus avec l'extrait brut. Il est donc important de poursuivre la purification des enzymes de restriction de façon à pouvoir les étudier. Nous avons tenté de continuer la purification mais nous nous sommes trouvés confrontés au manque de stabilité de ces enzymes. En effet lorsque nous avons utilisé l'extrait brut, nous avons constaté qu'après environ 5 jours de conservation à - 20°C, l'extrait ne renfermait plus d'activité endonucléasique de restriction. Lorsque la conservation avait lieu à + 4°C, l'activité disparaissait plus rapidement.

De même, au cours de nos essais de purification des enzymes sur une colonne de DEAE cellulose, nous n'avons pas récupéré l'activité endonucléasique lorsque les protéines ont été éluées par des solutions de KH_2PO_4 / K_2HPO_4 de 0,05 M ; 0,1 M ; 0,15 M et 0,2 M. L'augmentation de la pureté des enzymes diminuerait leur stabilité. Il est donc indispensable de trouver un remède à l'instabilité de ces enzymes si l'on désire poursuivre leur étude.

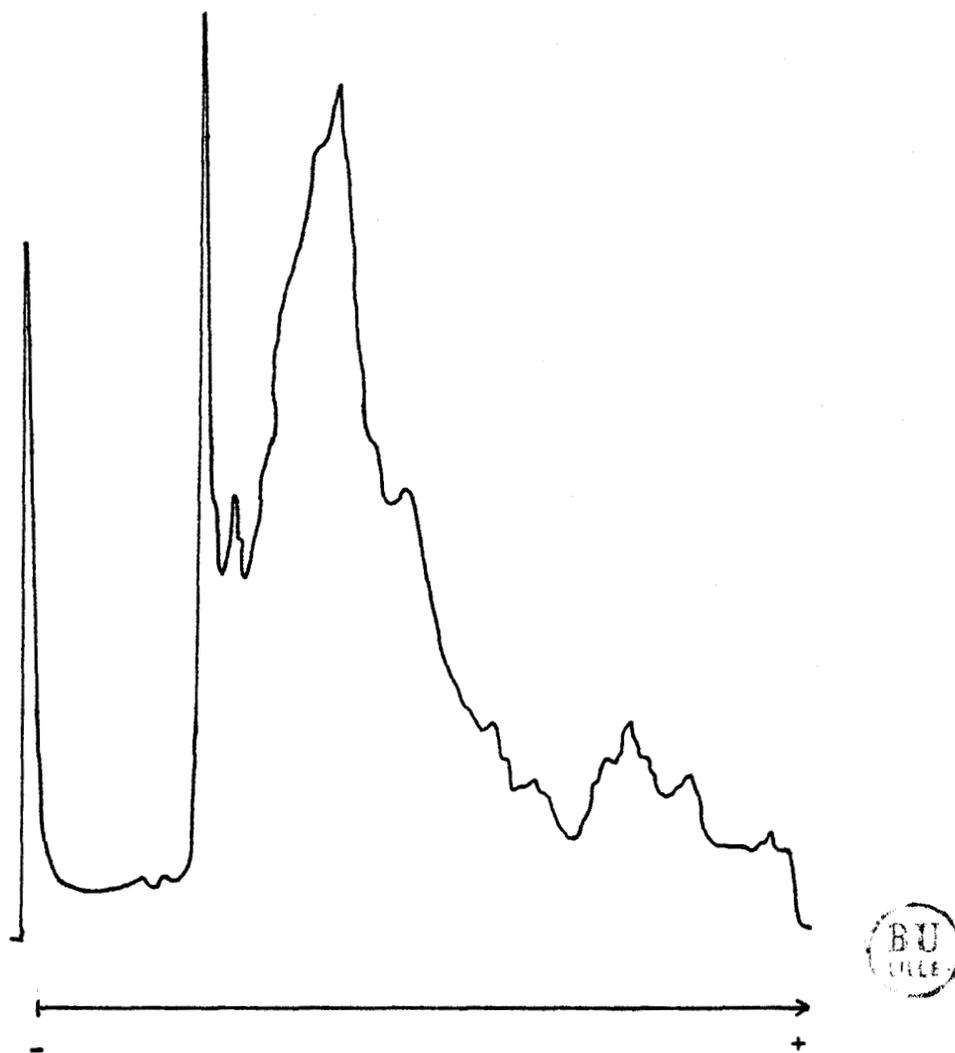


Fig. 12 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide de l'extrait cellulaire de la souche M₁₁S de R. meliloti

La lecture du gel a été effectuée à 588 nm.

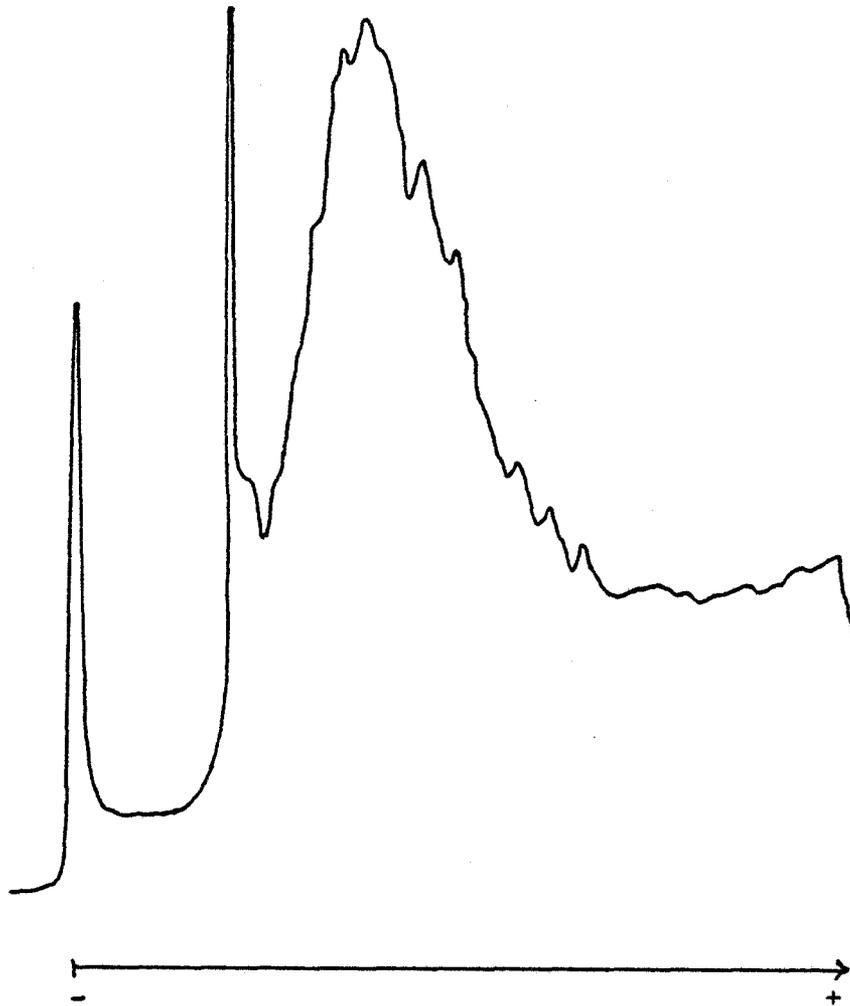


Fig. 13 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines de la fraction 0,1 M obtenue par chromatographie sur DEAE cellulose de l'extrait cellulaire de la M₁₁S

La lecture du gel a été effectuée à 588 nm.

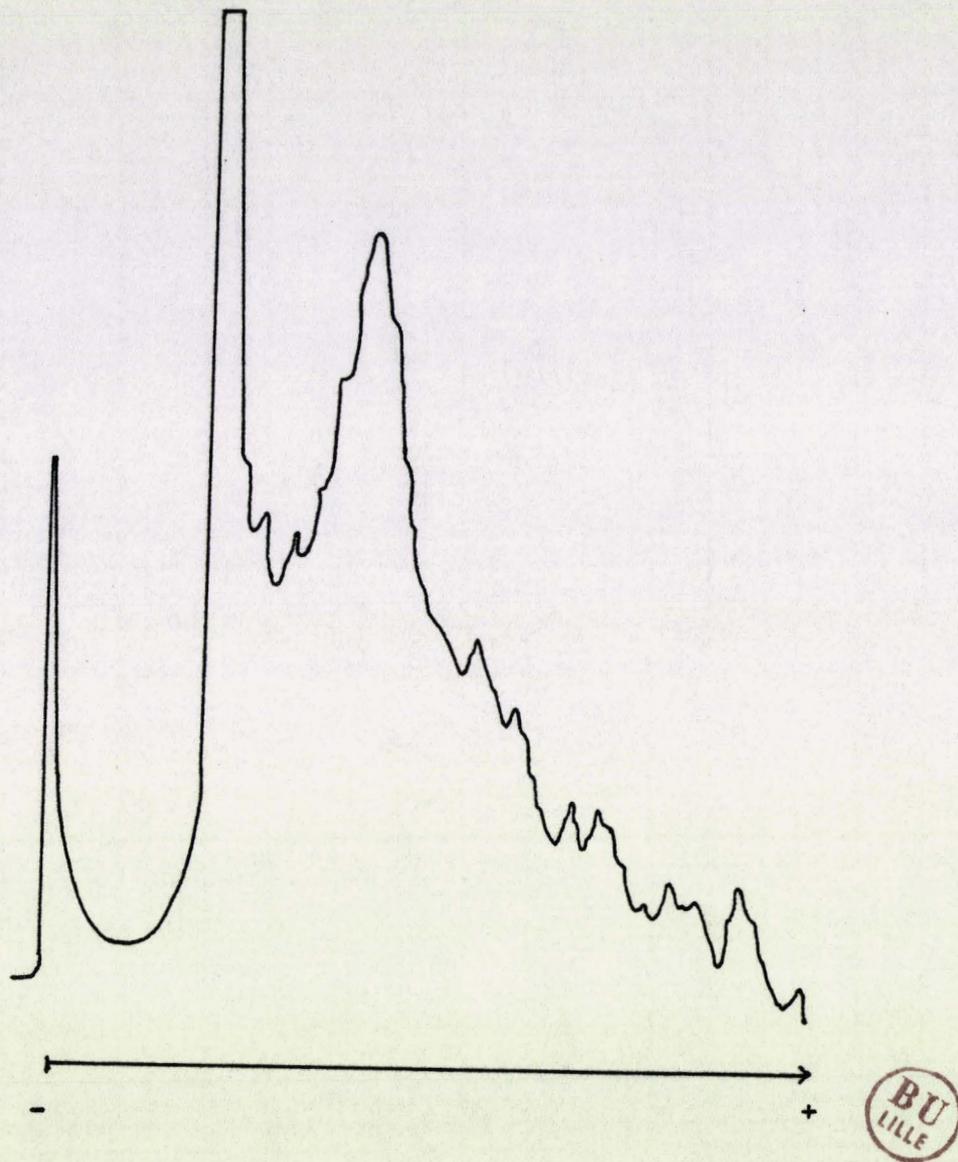


Fig. 14 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines de la fraction 0,2 M obtenue par chromatographie sur DEAE cellulose de l'extrait cellulaire de la $M_{11}S$

La lecture du gel a été effectuée à 588 nm.

CONCLUSION

Au cours de nos travaux, nous nous sommes attachés à étudier l'activité de restriction chez Rhizobium meliloti.

Dans un premier temps nous avons mis en évidence que certaines souches de R. meliloti étaient capables de sélectionner les bactériophages susceptibles de les infecter. Nous avons en effet constaté que le bactériophage 6 qui s'est développé chez la souche M₁₁S (Ø6.M₁₁S) pouvait infecter d'autres cellules de cette souche. Par contre le même phage n'infecte pas la souche 2011. Le même phénomène se reproduit avec le Ø6.2011 qui a une croissance optimale chez la 2011 mais pas chez la M₁₁S.

Ces résultats ne seraient pas dus à un changement dans l'adsorption des phages sur les bactéries (65). La sélection s'exercerait donc sur l'ADN qui, seul, pénètre dans la cellule. Il existerait donc une sorte de "système immunitaire" bactérien qui agirait sur l'ADN.

Nous nous sommes donc donné pour objectif de vérifier cette affirmation par des expériences in vitro. Pour cela nous avons extrait le plasmide RP₄ contenu dans deux souches différentes (la 2011(RP₄) et la M₁₁S(RP₄)) puis nous avons mis chaque plasmide en présence des extraits cellulaires des souches 2011 et M₁₁S. L'ADN a ensuite été visualisé par électrophorèse en gel d'agarose.

Les résultats que nous avons obtenus tendent à prouver l'existence d'enzymes de restriction-modification chez R. meliloti M₁₁S et 2011. En effet le plasmide RP₄ de la 2011(RP₄) est modifié spécifiquement par la souche 2011. Des séquences nucléotidiques de l'ADN auraient été méthylées par des enzymes de R.M. Par conséquent l'ADN ne peut plus être coupé par les enzymes de restriction de la 2011, puisque les sites reconnus par les endonucléases et les méthylases d'un système de R.M. seraient les mêmes.

Par contre le RP₄ issu de la 2011(RP₄) est dégradé par l'extrait de la M₁₁S parce que les sites spécifiques reconnus par les endonucléases de la M₁₁S n'ont pas été modifiés. Ceci prouve qu'ils sont différents des sites reconnus par les enzymes de la 2011.

Des expériences effectuées avec le RP₄ extrait de la M₁₁S ont confirmé ces résultats.

L'existence d'endonucléases de restriction ayant été mise en évidence, nous avons essayé de déterminer le type des enzymes. Nous avons mis de l'ADN de bactériophage λ avec l'extrait cellulaire de la M₁₁S en présence d'un, de deux ou des trois cofacteurs qui interviennent habituellement dans l'activité des endonucléases.

Les enzymes n'agissent pas lorsque le Mg²⁺ est présent seul. Ce ne serait donc pas des enzymes de type II. Par contre l'association Mg²⁺ - ATP entraîne une digestion de l'ADN. Les endonucléases pourraient être de type III. Cependant nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse selon laquelle la S-Adenosyl méthionine (SAM) serait présente dans l'extrait cellulaire après dialyse (54), dans ce cas les enzymes agiraient avec les trois cofacteurs et seraient donc de type I. Mais il est possible que des enzymes de type I et de type III coexistent dans le même extrait. En effet la souche M₁₁S renferme plusieurs plasmides et de l'ADN chromosomique, ce qui rend vraisemblable l'existence de plusieurs systèmes de restriction-modification au sein de cette souche, car chaque type d'ADN peut coder la synthèse d'un système différent.

L'action d'une endonucléase de restriction provoque ordinairement l'apparition de fragments d'ADN. Or nous avons systématiquement constaté une disparition totale de l'ADN.

Lorsque l'ADN du bactériophage λ marqué au ^{35}S est mis à incuber avec des quantités croissantes d'extrait cellulaire, puis filtré, nous constatons une diminution progressive de la radioactivité. L'ADN qui a disparu a donc été, ou coupé en très petits fragments, ou dégradé jusqu'au stade de nucléotides. Ceci pourrait être dû à deux causes différentes.

- l'extrait renfermerait plusieurs endonucléases de restriction spécifiques qui transformeraient l'ADN en de nombreux très petits fragments.

- mais nous pourrions surtout avoir affaire à deux types d'activité enzymatique. L'ADN serait coupé en fragments par des endonucléases. Les fragments seraient ensuite totalement digérés par des exonucléases non spécifiques.

Afin de visualiser des fragments d'ADN, nous devons séparer les endonucléases de restriction des exonucléases. Nous avons, pour cela, effectué des essais de purification par fractionnement au sulfate d'ammonium et par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE cellulose. Nous avons remarqué que les protéines responsables des deux activités précipitent à des concentrations de sulfate d'ammonium comprises entre 30 et 55 %. Les enzymes sont également éluées avec les mêmes concentrations de K_2HPO_4 / KH_2PO_4 comprises entre 0,01 M et 0,2 M. De plus les endonucléases et les exonucléases utiliseraient les mêmes cofacteurs (Mg^{2+} et ATP). L'activité endonucléase n'en est que plus difficile à visualiser.

Nous avons tenté de poursuivre la purification mais nous nous sommes trouvés confrontés au manque de stabilité des enzymes de restriction. HEUMANN (68) a signalé récemment des difficultés similaires lors de ses essais de purification.

Il est donc impératif de trouver un remède à l'instabilité de ces enzymes si l'on désire poursuivre leur étude.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - FRED E.B., BALDWIN I.J. and Mc COY E. (1932)
Root nodule bacteria and leguminous plants.
University of Wisconsin Press, 342 p. Wisconsin

- 2 - VICENT J.M. (1974)
Root nodule symbioses with Rhizobium. The biology of nitrogen fixation.
(A. Quispel, Editor) Frontiers of biology, 33 : 265-341

- 3 - AYANABA A. (1982)
Les bactéries et l'économie de l'azote.
Science et Société, 2 : 203-212

- 4 - STRUZYK-NICOLAIDIS M.J. (1985)
La reconnaissance Rhizobium meliloti - luzerne : rôle d'une lectine végétale et des polysaccharides bactériens.
Mémoire de diplôme d'ingénieur, Conservatoire National des Arts et Métiers de LILLE.

- 5 - EVANS J., BARNET Y.M. and VICENT J.M. (1979)
Effect of a bacteriophage on the colonisation and nodulation of clover roots by a strain of Rhizobium trifolii.

- 6 - LECLERC H., IZARD D., HUSSON M.O., WATTRE P. et JAKUBCZAK E. (1983)
Microbiologie générale. Ed. DOIN - PARIS

- 7 - BRADLEY D.E. and KEY D. (1960)
The fine structure of bacteriophages.
J. Gen. Microbiol., 23 : 553-563

- 8 - LINDBERG A.A. (1973)
Bacteriophage receptors.
Ann. Rev. Microbiol., 27 : 205-241

- 9 - HERSHEY A.D. and CHASE M. (1952)
Independant functions of viral protein and nucleic acid in
the growth of bacteriophage.
J. Gen. Physiol., 36 : 39-56

- 10 - WATSON J.D. (1976)
Molecular biology of the gene
3^d Ed. W.A. BENJAMIN, INC Menlo Park (California)

- 11 - BERTANI G. and WEIGLE J.J. (1953)
Host-controlled variation in bacterial viruses.
J. Bacteriol., 65 : 113-121

- 12 - KRUGER D.H. and BICKLE T.A. (1983)
Bacteriophage survival : multiple mechanisms for avoiding
the DNA restriction systems of their hosts.
Microbiol. Rev., 47 : 345-360

- 13 - ARBER W. (1965)
Host-controlled modification of bacteriophage
Ann. Rev. Microbiol., 19 : 365-378

- 14 - ARBER W. and DUSSOIX D. (1962)
Host specificity of DNA produced by Escherichia Coli.
I. Host controlled modification of bacteriophage Lambda.
J. Mol. Biol., 5 : 18-36

- 15 - BRON S. and LUXEN E. (1980)
Restriction and modification in Bacillus subtilis
Mol. Gen. Genet., 179 : 103-110,111-117
- 16 - BOUSSEMAER J.P., SCHRAUWEN P.P. and SOURROUILLE J.L. (1980)
Multiple modification and restriction system in lactic streptococci and their significance in defining a phage typing system.
J. Dairy Res., 47 : 401-403
- 17 - DUSSOIX D. and ARBER W. (1965)
Host specificity of DNA produced by Escherichia Coli
IV. Host specificity of infectious DNA from bacteriophage lambda.
J. Mol. Biol., 11 : 238-246
- 18 - HOFNUNG M. (1975)
Restriction-Modification. Dans "Bactéries et bactériophages".
Cours de l'Institut Pasteur, Microbiologie générale, Vol. 1,
Ediscience / MC GRAW-HILL - PARIS
- 19 - UETAKE H., TOYAMA S. and HAGIWARA S. (1964)
On the mechanism of host-induced modification
Multiplicity activation and thermolabile factor
responsible for phage growth restriction
Virology, 22 : 202-213
- 20 - ARBER W.(1965)
Host specificity of DNA produced by Escherichia Coli
J. Mol. Biol., 11 : 247-256
- 21 - SCHWINGHAMER E.A. (1965)
Host-controlled modification of Rhizobium bacteriophage
Aust. J. Biol. Sci., 18 : 333-343

- 22 - BECHET M. et GUILLAUME J.B.(1978)
Mise en évidence d'ADN extrachromosomique chez Rhizobium meliloti
Can. J. Microbiol., 24 : 960-966
- 23 - CORRAL E., MONTOYA E. and OLIVARES J.(1978)
Sensitivity to phages in Rhizobium meliloti as a plasmid consequence.
Microbios Letters, 5 : 77-80
- 24 - SAHIM L.
Approche génétique de la relation phage-bactérie chez Rhizobium meliloti.
Thèse de docteur de 3e cycle n° 1 060, Université des Sciences et Techniques de LILLE.
- 25 - CHATTORAJ D.K., OBEROI Y.K. and BERTANI G. (1977)
Restriction of bacteriophage P₂ by the E. Coli RI plasmid and in vitro cleavage of its DNA by the ECoRI endonuclease.
Virology, 81 : 460-470
- 26 - JACOBY G.A. and SUTTON L. (1977)
Restriction and modification determined by a Pseudomonas R plasmid.
Plasmid, 1 : 115-116
- 27 - CHOPIN A., CHOPIN M.C., MOILLO-BATT A. and LANGELLA P. (1984)
Two plasmid-determined restriction and modification systems in Streptococcus lactis.
Plasmid, 11 : 260-263
- 28 - ARBER W. and LINN S. (1969)
DNA modification and restriction
Ann. Rev. Biochem., 38 : 467-500

- 29 - TAKANO T. and WATANABE T. (1966)
specific inactivation of infectious λ DNA by sonicates of
restrictive bacteria with R. factors.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 25 : 192-198
- 30 - MESELSON M., YUAN R. and HEYWOOD J. (1972)
Restriction and modification of DNA
Ann. Rev. Biochem., 41 : 447-446
- 31 - PRASHER D.C., CONARRO L. and KUSHNER S.R. (1983)
Amplification and purification of exonuclease I from E. Coli
K₁₂.
J. Biol. chem., 258 : 6340-6343
- 32 - OHI S. and SUEKA N. (1973)
Adenosine triphosphate-dependant deoxyribonuclease in Bacillus
subtilis.
J. Biol. chem., 248 : 7336-7344
- 33 - MILLER R.V. and CLARK (1976)
Purification and properties of two deoxyribonucleases of
Pseudomonas aeruginosa
J. Bacteriol., 127 : 794-802
- 34 - DUSOIX D. and ARBER W. (1962)
Host specificity of DNA produced by Escherichia Coli
II. Control over acceptance of DNA from infected phage λ .
J. Mol. Biol., 5 : 37-49
- 35 - SMITH H.O. and NATANS O. (1973)
A suggested nomenclature for bacterial host modification and
restriction systems and their enzymes.
J. Mol. Biol., 81 : 419-423

- 36 - MESELSON M. and YUAN R. (1968)
DNA restriction enzyme from E. Coli
Nature, 217 : 1110-1114
- 37 - YUAN R., BICKLE T.A., EBBERS W. and BRACK C. (1975)
Multiple steps in DNA recognition by restriction endonuclease
from E. Coli K.
Nature, 256 : 556-560
- 38 - ESKIN B. and LINN S. (1972)
The DNA modification and restriction enzymes of E. Coli B.
J. Biol. chem., 247 : 6183-6191
- 39 - TIMKO J., HORWITZ A.H., ZELINKA J and WILCOX G. (1981)
Characterization of a site-specific restriction endonuclease
from Streptomyces auréofaciens
J. Bacteriol., 145 : 873-877
- 40 - CLANTON D.J., WOODWARD J.M. and MILLER R.V. (1978)
Identification of a new sequence-specific endonuclease, NgoII,
from Neisseria gonorrhoeae
J. Bacteriol., 135 : 220-273
- 41 - REISER J. and YUAN R. (1977)
Purification and properties of the P₁₅ specific restriction
endonuclease from E. Coli.
J. Biol. chem., 252 : 451-456
- 42 - HABERMAN A. (1974)
The bacteriophage P₁ restriction endonuclease.
J. Mol. Biol., 89 : 545-563

- 43 - YUAN R., HAMILTON D.L. (1980)
Role of ATP in the cleavage mechanism of the ECoP₁₅
restriction endonuclease.
J. Mol. Biol., 144 : 501-519
- 44 - BRZEZINSKI R. and PIEKAROWICZ A. (1982)
Steps in the reaction mechanism of the Haemophilus influenzae Rf
restriction endonuclease.
J. Mol. Biol., 154 : 615-627
- 45 - HADI S.M., BÄCHI B. and SHEPHERD J.C.W. (1979)
DNA recognition and cleavage by the ECoP₁₅ restriction
endonuclease.
J. Mol. Biol., 134 : 655-666
- 46 - PIEKAROWICZ A., BICKLE T., SHEPHERD J.C and INEICHEN K. (1981)
The DNA sequence recognised by the HinFIII restriction
endonuclease.
J. Mol. Biol., 146 : 167-172
- 47 - VOVIS G.F. and ZINDER N.D. (1975)
Methylation of f1 DNA by a restriction endonuclease from E. Coli B
J. Mol. Biol., 95 : 557-568
- 48 - SMITH J.D., ARBER W. and KÜHNLEIN U (1972)
Host specificity of DNA produced by E. Coli
XIV. The role of nucleotide methylation in in vivo B -
specific modification.
J. Mol. Biol., 63 : 1-8
- 49 - KÜHNLEIN U. and ARBER W. (1972)
Host specificity of DNA produced by E. Coli
XV. The role of nucleotide methylation in in vitro B-specific
modification.
J. Mol. Biol., 63 : 9-19

- 50 - GREENE P.J., HEYNEKER H.L., BOLIVAR E. and RODRIGUEZ R.L. (1978)
A general method for the purification of restriction
enzymes.
Nucl. Acids Res., 5 : 2373-2380
- 51 - CHEN KAN N., LAUTENBERGER J.A., EDGELL M.H. and
HUTCHISON C.A. (1979)
The nucleotide sequence recognized by the E. Coli K₁₂
restriction and modification enzymes.
J. Mol. Biol., 130 : 191-209
- 52 - BRACK C., EBERLE H., BICKLE T.A. and YUAN R. (1976)
Mapping of recognition sites for the restriction endonuclease
from E. Coli K₁₂ on bacteriophage PM₂ DNA
J. Mol. Biol., 108 : 583-593
- 53 - BÄCHI B., REISER J. and PIRROTA V. (1979)
Methylation and cleavage sequences of the ECoP₁ restriction-
modification enzyme.
J. Mol. Biol., 128 : 143-163
- 54 - YUAN R., BURCKHARDT J. and HAMILTON D.L. (1982)
The methylated state of DNA sequence and its effect on the
functions of the restriction endonuclease from E. Coli K.
Ed. Cancer biology program by Academic Press - USA.
- 55 - YUAN R. and MESELSON M. (1970)
A specific complex between a restriction endonuclease and its
DNA substrate.
Proc. Nat. Acad. Sc. USA, 65 : 357-362
- 56 - BURCKHARDT J., WEISEMANN J., HAMILTON D.L. and YUAN R. (1981)
Complexes formed between the restriction endonuclease ECoK
and heteroduplex DNA.
J. Mol. Biol., 153 : 425-440

- 57 - YUAN R. and REISER J. (1978)
Steps in the reaction mechanism of the E. Coli plasmid
P₁₅ specific restriction endonuclease.
J. Mol. Biol., 122 : 433-445
- 58 - DELATTRE J. M. (1971)
Introduction à une étude génétique du genre Rhizobium
Thèse de docteur ingénieur, n° 121, Université des Sciences
et Techniques de LILLE.
- 59 - ADAMS M.H. (1956)
Bacteriophages
Interscience publishers, NEW YORK - LONDON
- 60 - BETLACH M.C., HERSHFELD V., CHOW L., BROWN W., GOODMAN N.M.
and BOYER M.W. (1976)
A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid
controlling the ECoRI restriction and modification of DNA.
Fed. Proc., 35 : 2037-2043
- 61 - AAIJ C. and BORST P. (1971)
The gel electrophoresis of DNA.
Biochem. Biophys. Acta, 269 : 192-200
- 62 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951)
Protein measurement with the follin phenol reagent
J. Biol. chem., 193 : 265-275
- 63 - CATTERALL J.F. and WELKER N.E. (1977)
Isolation and properties of a thermostable restriction
endonuclease (EndoR. Bst 1503)
J. Bacteriol., 129 : 1110- 1120

- 64 - IDZIOREK T. (1982)
Etude électrophorétique des protéines solubles du genre Rhizobium. Application taxonomique.
D.E.A., Université des Sciences et Techniques de LILLE
- 65 - SAHIM L. (1981)
Aspects de la Restriction-modification chez R. meliloti
Diplôme d'études approfondies, Université des Sciences et
Techniques de LILLE
- 66 - PIEKAROWICZ A. and BRZEZINSKI R. (1980)
Cleavage and methylation of DNA by the restriction
endonuclease HinfIII isolated from Haemophilus
influenzae Rf.
J. Mol. Biol., 144 : 415-429
- 67 - KOHRING G.W., MAYER F. and MAYER H. (1985)
Immunoelction microscopic localization of the restriction
endonuclease ECoRI in Escherichia Coli BS 5.
Eur. J. cell. Biol., 37 : 1-6
- 68 - HEUMANN W., ROSCH A., SPRINGER R., WAGNER E. and
WINKLER K.P. (1984)
In Rhizobiaceae five different species are produced by
rearrangements of one genome, induced by DNA - damaging
agents.
Mol. Gen. Genet., 197 : 425-436

