

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR ES SCIENCES**

option : **MICROBIOLOGIE**

par

Kamel-Ridha MAOUI

**ETUDE GENETIQUE DES PLASMIDES DE**  
*RHIZOBIUM MELILOTI*  
**TRANSFERT, REARRANGEMENTS GENETIQUES,**  
**IMPLICATION DANS LE METABOLISME INTERMEDIAIRE**

Soutenu le 3 Juillet 1986 devant la Commission d'Examen

Mrs. J. GUILLAUME  
P. BOISTARD  
J. CURGY  
C. BONNIER  
Mme. S. BAZETOUX

A la mémoire de mon père

A ma mère

## REMERCIEMENTS

- o O o -

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois. Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur J. GUILLAUME pour m'avoir permis de réaliser ce travail.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur J. CURGY, de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette Thèse.

Je voudrais tout particulièrement remercier Monsieur le Directeur P. BOISTARD, à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Toulouse, d'avoir participé à mon travail par ses discussions fructueuses et d'avoir également accepté d'être le rapporteur de cette Thèse.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur le Recteur C. BONNIER de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, et Madame S. BAZETOUX, Maître de Conférences à la Faculté de Génétique d'Orsay qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je ne saurais oublier Christine et Patrice pour leur contribution à l'élaboration de cette Thèse.

J'adresse mes remerciements au Service de l'Accueil des Etudiants Etrangers du C.R.O.U.S. ainsi qu'à Monsieur VANEK pour l'aide et la sympathie qu'ils m'ont dispensées au cours de ces années.

Que Mlle M. DELECOURT soit remerciée de son extrême gentillesse et de sa collaboration efficace pour la dactylographie de ce Mémoire.

## R E S U M E

Les travaux décrits dans cette Thèse comportent deux parties.

A partir de la souche M5N1 de **Rhizobium meliloti**, nous avons isolé par la nitrosoguanidine un mutant auxotrophe (M5N1m3) exigeant en isoleucine-valine, tryptophane et arginine, incapable de fixer l'azote atmosphérique et qui induit des nodules dont la morphologie est altérée. Aucune relation n'a pu être établie entre l'inefficience et les caractères d'auxotrophie. Le transfert génétique des déterminants liés à l'efficience a pu être réalisé par conjugaison entre une souche efficiente [2011(RP4), souche donatrice] et le mutant auxotrophe inefficent (M5N1m3SR, souche réceptrice). Les recombinants obtenus induisent des nodules non défectueux et fixent l'azote atmosphérique, cependant l'étude de leur contenu plasmidique a révélé la disparition d'un plasmide indigène présent chez la souche initiale. En conclusion sont suggérées d'une part la mobilisation du pSym de la souche 2011 par le facteur RP4 et d'autre part l'incompatibilité du pSym avec le plasmide moyen indigène du mutant M5N1m3SR. Une quatrième mutagenèse nous a conduit à la mise en évidence de deux mégaplasmides chez la même souche M5N1, obtenue par délétion de l'une de ces molécules d'ADN.

Dans une seconde partie, nous démontrons que le plasmide moyen (ou pRme : 92 Md) du mutant auxotrophe M5N1m3SR existe soit à l'état autonome soit à l'état intégré dans le chromosome bactérien. L'intégration chromosomique du pRme s'accompagne d'un retour de la prototrophie totale mais pas de l'efficience. La réapparition d'un plasmide de même taille s'accompagne de la restauration des caractères phénotypiques du mutant M5N1m3SR. L'analyse par des enzymes de restriction et les études par hybridation d'ADN indiquent que le plasmide excisé dérive du pRme à l'état autonome.

Ces travaux constituent un apport conceptuel important sur la réorganisation structurale génomique chez **Rhizobium meliloti** et le rôle possible du plasmide moyen dans le métabolisme intermédiaire.

**Mots-clés :** **Rhizobium meliloti** - Plasmides - Fixation d'azote - Révertants - Mutagenèse - Electrophorèse - Hybridation moléculaire.



## S U M M A R Y

**Rhizobium meliloti** strain M5N1 was subjected to successive nitrosoguanidine (NTG) mutageneses, the third NTG treatment generated an auxotroph M5N1m3 which required isoleucine-valine, tryptophane, arginine, and failed to fix molecular nitrogen (Fix<sup>-</sup>). The nodules induced by mutant M5N1m3 were altered in their morphology. The phenotype Fix<sup>-</sup> of M5N1m3 was not linked to its nutritional requirements. Genes involved in symbiotic nitrogen fixation were transferred by conjugation from **Rhizobium meliloti** wild-type strain 2011(RP4) (donnor strain) to an auxotrophic and ineffective **Rhizobium meliloti** mutant M5N1m3SR (recipient strain). The recombinants induced the formation of nitrogen-fixing nodules which were morphologically similar to those of the donor. However, an alteration of the plasmid content of the Fix<sup>+</sup> recombinants was observed. These results suggest the mobilization of pSym of strain 2011 by RP4 and the incompatibility between the incoming megaplasmid and the indigenous middle-sized pRme plasmid of the recipient.

Evidence for the occurrence of two megaplasmids in **Rhizobium meliloti** strain M5N1 was reported since a mutant showing an extensive deletion in one of these very large plasmids was isolated after a fourth NTG mutagenesis.

A 92-megadalton plasmid, pRmeM5N1m3SRa, of **Rhizobium meliloti** mutant M5N1m3SR was shown to replicate autonomously and integrate into the bacterial chromosome. There was a correlation between the integration of this plasmid into the chromosome and reversion to prototrophy.

The excision of a plasmid, which exhibited the same electrophoretic mobility as pRmeM5N1m3SRa, resulted in restoration of starting nutritional requirements (Ile<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>, Arg<sup>-</sup>). Neither integration nor excision modified the symbiotic properties of this mutant. Restriction enzymes fingerprint analyses and molecular hybridization revealed that the new excision plasmid was derived from the indigenous autonomous plasmid pRmeM5N1m3SRa. The findings presented in this study are of conceptual support about the structural rearrangement of the **Rhizobium** genome and also the role that pRme may play in intermediary metabolism.

**Key words :** **Rhizobium meliloti** - Plasmids - Nitrogen fixation - Revertants - Mutagenesis - Electrophoresis - Molecular hybridization.

## ABREVIATIONS UTILISEES

- ADN** = acide désoxyribonucléique
- ARN** = acide ribonucléique
- Bet** = bromure d'éthidium
- CCC** = "covalently closed circular"
- CsCl** = chlorure de césium
- D.O.** = densité optique
- EDTA** = acide éthylène diamine tétra-acétique
- M** = molaire
- OC** = "open circular"
- PEG** = polyéthylène glycol
- P/V** = poids/volume
- SDS** = dodécyl sulfate de sodium

# TABLE DES MATIERES

- o O o -

AVANT - PROPOS	1
INTRODUCTION	
<u>GENERALITES</u>	3
<u>LE GENOME DE RHIZOBIUM</u>	5
I. - LE CHROMOSOME	7
II. - LES PLASMIDES DE <u>RHIZOBIUM</u>	10
2.1 - Historique	10
2.1.1 - Mise en évidence des plasmides	10
2.1.2 - Nomenclature des plasmides	11
2.1.3 - Méthodes de mise en évidence du rôle des plasmides dans la symbiose	12
2.1.3.1 - Corrélation entre les modifications du contenu plasmidique et les modifications des propriétés symbiotiques	12
2.1.3.2 - Transfert des caractères symbiotiques à fréquence élevée	14
2.1.3.3 - Hybridation moléculaire	15
2.1.3.4 - Mutagenèse : la transposition	15
2.2 - Méthodes d'isolement et caractérisation	15
2.2.1 - Méthodes d'isolement	15
2.2.1.1 - Lyse et dissociation du complexe chromosome-membrane	16
2.2.1.2 - Elimination du chromosome et des débris cellulaires	17
2.2.1.3 - Purification de l'ADN plasmidique	18
2.2.2 - Caractérisation des plasmides de <b>Rhizobium</b>	18
2.2.2.1 - Cinétique de réassociation	18
2.2.2.2 - Microscopie électronique	19
2.2.2.3 - Electrophorèse en gel d'agarose	19
2.2.2.4 - Profil avec les endonucléases de restriction	20
2.3 - Caractéristique et particularités	20
2.4 - Etudes d'homologie entre ADN	24
2.5 - Les plasmides Ti et Ri chez <b>Rhizobium</b>	25

2.6 - Les plasmides et les fonctions symbiotiques	28
2.6.1 - Plasmides et gènes nod	29
2.6.2 - Plasmides et gènes nif et fix	31
2.7 - Les plasmides et les fonctions non-symbiotiques	34
2.7.1 - Production de pigment	34
2.7.2 - Production de bactériocine	34
2.7.3 - Activité hydrogénasique : gènes hup	35
2.7.4 - Propriétés de transfert	36
2.7.5 - Propriétés d'incompatibilité	37
2.7.6 - Inhibition de la synthèse des exopolysaccharides	38
2.7.7 - Utilisation des opines	38
2.7.8 - Autres caractères	39
<b>III. - LE GENOME DE LA FORME ENDOSYMBIOTIQUE</b>	<b>39</b>

## MATERIEL ET METHODES

<b>I. - SOUCHES ET CULTURES BACTERIENNES</b>	<b>41</b>
1.1 - Souches bactériennes utilisées	41
1.2 - Cultures	41
<b>II. - MILIEUX DE CULTURE</b>	<b>41</b>
2.1 - Milieu TY	41
2.2 - Milieu RC	41
2.3 - Milieu R	43
2.4 - Gélose blanche	43
2.5 - Gélose bactériophage	43
2.6 - Milieu NT	44
<b>III. - BACTERIOPHAGES ET LYSOGENIE</b>	<b>44</b>
3.1 - Induction du prophage	44
3.2 - Dénombrement des particules phagiques infectieuses	45
<b>IV. - CROISSANCE BACTERIENNE</b>	<b>45</b>
4.1 - Numération des cellules viables	45
4.2 - Détermination du temps de génération	46
<b>V. - MUTAGENESE</b>	<b>46</b>
5.1 - Mode opératoire	47
5.2 - Technique des répliques sur velours	47
<b>VI. - TESTS DE NODULATION, EFFICIENCE ET ISOLEMENT DES BACTERIES A PARTIR DE NODULES</b>	<b>47</b>
6.1 - Test d'infectivité	48
6.2 - Isolement des bactéries à partir des nodules	48

<b>VII. - EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ADN BACTERIEN</b>	<b>48</b>
7.1 - Extraction et purification de l'ADN plasmidique	48
7.1.1 - Principe	49
7.1.2- Protocole	49
7.2 - Extraction et purification de l'ADN total	51
<b>VIII. - ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE</b>	<b>51</b>
8.1 - Principe	51
8.2 - Lyse directe sur le gel	52
8.2.1 - Principe	53
8.2.2 - Protocole	53
8.3 - Electrophorèse en gel analytique	54
8.4 - Electrophorèse en gel préparatif	54
<b>IX. - DIGESTION D'ADN PAR LES ENZYMES DE RESTRICTION</b>	<b>55</b>
9.1 - Généralités	55
9.2 - Hydrolyse	56
9.3 - Calcul de la masse moléculaire des fragments de restriction	56
<b>X. - HYBRIDATION MOLECULAIRE</b>	<b>56</b>
10.1 - Transfert et fixation de l'ADN sur nitrocellulose	56
10.2 - Préparation de sondes d'ADN	57
10.3 - Hybridation des "blots"	58
10.4 - Lavage des blots et autoradiographie	58
<b>XI. - ETUDE DES PROTEINES SOLUBLES PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS</b>	<b>58</b>

## RESULTATS

### CHAPITRE I : ISOLEMENT DE MUTANTS INEFFICIENTS ET TRANSFERT GENETIQUE DE L'EFFICIENCE PAR CONJUGAISON

<b>I. - ISOLEMENT DE MUTANT FIX<sup>-</sup>.</b>	<b>61</b>
<b>II. - ETUDE DE REVERTANTS</b>	<b>64</b>
<b>III. - TRANSFERT PAR CONJUGAISON DES DETERMINANTS GENETIQUES LIES A L'EFFICIENCE</b>	<b>64</b>
3.1 - Analyse des souches parentales	65
3.2 - Fréquence de transfert des marqueurs génétiques	65

3.3 - Analyse des recombinants	67
3.3.1 - Typage phagique	67
3.3.2 - Profil des protéines solubles	69
3.3.3 - Propriétés symbiotiques	69
3.3.4 - Contenu plasmidique	69
IV. - MISE EN EVIDENCE DE DEUX MEGAPLASMIDES CHEZ LA SOUCHE M5N1	72
DISCUSSION	75

## CHAPITRE I I : ETUDE DES REVERTANTS PROTOTROPHES

I. - ETUDE DU CONTENU PLASMIDIQUE DU MUTANT M5N1m3SR	81
II. - ISOLEMENT DE REVERTANTS PROTOTROPHES SPONTANES A PARTIR DU MUTANT M5N1m3SR ET DU TRANSCONJUGANT M5N1m3SR(RP4)	85
2.1 - Isolement de révertants prototrophes	85
2.2 - Contenu plasmidique des révertants prototrophes	85
III. - OBTENTION DE MUTANTS SPONTANES ILV <sup>-</sup> TRP <sup>-</sup> ARG <sup>-</sup> A PARTIR DU REVERTANT PROTOTROPHE C1	88
3.1 - Isolement de mutants auxotrophes à partir des révertants	90
3.2 - Contenu plasmidique de ces mutants auxotrophes	90
IV. - IDENTIFICATION DES REVERTANTS ET DES MUTANTS NOUVELLEMENT ISOLES	93
4.1 - Propriétés symbiotiques	93
4.2 - Typage phagique	96
4.3 - Fréquence de lysogénie	96
4.4 - Temps de génération	97
V. - ETUDE COMPARATIVE DES PROFILS DE RESTRICTION DES DEUX PLASMIDES ISSUS DES MUTANTS M5N1m3SR et C1.8	101
VI. - RECHERCHE ET DETECTION DE SEQUENCES HOMOLOGUES PAR LA METHODE DE SOUTHERN	106
VII. - DETECTION DES SEQUENCES HOMOLOGUES AU pRmeM5N1m3SRa CHEZ LE REVERTANT PROTOTROPHE C1	108
DISCUSSION	112

## BIBLIOGRAPHIE

Toutes les souches de **Rhizobium** à croissance rapide testées hébergent un ou plusieurs plasmides de différentes tailles. Des évidences génétiques et physiques indiquent qu'au moins 10 à 30 % de l'ADN est extrachromosomique. L'utilisation de différents outils génétiques, comme les facteurs sexuels à large spectre d'hôte, les éléments transposables, les recombinaisons *in vitro* et l'hybridation moléculaire ont permis d'analyser le rôle biologique des plasmides de **Rhizobium** dans le contrôle des propriétés symbiotiques. C'est ainsi que la majorité des gènes bactériens intervenant dans l'établissement et le déroulement des processus symbiotiques ont été localisés sur des plasmides de poids moléculaire élevé appelés pSym. D'autres marqueurs génétiques tels que la production de bactériocine, l'aspect morphologique des colonies, la production de pigments, etc... ont été également localisés sur les plasmides. Si certaines fonctions portées par ces plasmides ont pu être précisées, d'autres fonctions restent encore inconnues. Les plasmides de **Rhizobium** pourraient notamment être impliqués dans :

- 1) les processus d'infection des légumineuses : par exemple la spécificité d'hôtes pour des hôtes autres que les partenaires symbiotiques ;
- 2) la vie dans la rhizosphère ;
- 3) la vie dans le sol.

L'étude des plasmides, aux connaissances fondamentales desquelles plusieurs équipes dans le monde ont remarquablement contribué, présente une utilité pratique dans le domaine agro-alimentaire et notamment dans la sélection de souches super efficaces capables de fixer l'azote à grande échelle. Améliorer rationnellement les systèmes biologiques existants, initier de nouvelles voies évolutives mieux adaptées aux environnements industriels ou agricoles créés par l'homme et substituer aux engrais azotés synthétisés par voie chimique, un système biologique fixateur dérivé de la symbiose **Rhizobium**-légumineuse paraissent non seulement intéressants mais indispensables.

Cet ensemble de remarquables propriétés motive l'objet de notre travail. Celui-ci s'applique, en effet, à l'étude des plasmides de **Rhizobium meliloti** et en particulier ceux de la souche M5N1.

L'isolement, dans le Laboratoire, de mutants de **Rhizobium meliloti** inefficients nous a permis, dans un premier temps, de rechercher la fréquence de transfert des caractères génétiques liés à l'efficacité et de tenter de déterminer le support de cette efficacité.

D'autre part, l'isolement de mutants réverses et l'étude par la biologie moléculaire des plasmides impliqués dans le phénomène de réversion des caractères d'auxotrophie nous autorise à discuter de leur stabilité et de leur rôle dans ce phénomène au sein de la bactérie **Rhizobium**.

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, nous présentons une étude bibliographique concernant le génome de **Rhizobium** et particulièrement les plasmides de **Rhizobium**.



## GENERALITES

Isolé pour la première fois par BEIJERINCK en 1888, **Rhizobium** est une bactérie aérobie à Gram négatif. Le genre **Rhizobium** est classé avec le genre **Agrobacterium** dans la famille des **Rhizobiacées**, dont l'une des caractéristiques est d'induire la multiplication cellulaire chez certains végétaux : nodules racinaires pour **Rhizobium**, tumeurs pour **Agrobacterium tumefaciens**, proliférations racinaires pour **Agrobacterium rhizogenes**.

La bactérie **Rhizobium** peut exister sous deux formes : une forme libre (mobile, non fixatrice d'azote) dans le sol et une forme symbiotique (fixatrice d'azote) à l'intérieur des nodosités racinaires des légumineuses. Des études taxonomiques, telles que la composition en bases des ADN (DE LEY et RASSEL 1965), l'hybridation ADN-ADN (GIBBINS et GREGORY 1972), les propriétés sérologiques (VINCENT et HUMPHREY 1970) et la taxonomie numérique (GRAHAM 1964), ont permis de séparer ce genre bactérien en deux groupes selon leur taux de croissance.

Il existe une spécificité d'hôte très étroite entre l'espèce végétale et l'espèce bactérienne. La reconnaissance des partenaires semble s'effectuer entre une glycoprotéine (lectine) de la plante (DAZZO et HUBBEL 1975) et des exopolysaccharides bactériens (BOHLOOL et SCHMIDT 1974, DAZZO et BRILL 1977). Cette spécificité d'hôte a servi de base pour la classification des espèces dans le genre **Rhizobium** (tableau 1).

Ces notions de classification posent de plus en plus de difficultés car on a mis en évidence des souches capables d'infecter de nombreuses espèces de légumineuses hôtes (DIXON 1969, SHANTHARAM et WONG 1982) et de plus la séparation entre les deux groupes à croissance rapide et lente a été remise en question par la découverte de **R. japonicum** à croissance rapide isolés en Chine (KEYSER et coll. 1982, HATTORI et JOHNSTON 1984).

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

Rhizobium à croissance rapide <sup>(1)</sup>		Rhizobium à croissance lente <sup>(1)</sup>	
Nom	Hôtes spécifiques principaux	Nom	Hôtes spécifiques principaux
<b>R. leguminosarum</b>	Pois, Févrolle, Lentille, Vesce	<b>R. japonicum</b>	Soja
<b>R. meliloti</b>	Luzerne, Melilot, Trigonel	<b>R. lupini</b>	Lupin
<b>R. phaseoli</b>	Haricot	<b>R. du "cowpea group"</b>	Nombreuses légumineuses
<b>R. trifolii</b>	Trèfle		

Tableau 1 - Les différents groupes d'inoculation Rhizobium-Légumineuse d'après VINCENT (1974).

(1) Pour des conditions de culture identiques : les Rhizobium à croissance rapide forment des colonies sur boîtes de Pétri en 3 à 7 jours ; les Rhizobium à croissance lente forment des colonies sur boîtes de Pétri en 7 à 21 jours.

La symbiose est un processus complexe et s'accompagne de profondes modifications tant morphologiques que physiologiques des deux partenaires. Ses principales caractéristiques, pour les symbioses actuellement les plus étudiées, sont les suivantes :

- Les bactéries pénètrent au niveau des poils absorbants racinaires, et, tout en s'y multipliant, progressent le long d'un cordon d'infection jusqu'au cortex de la racine. Les deux partenaires subissent alors une différenciation cellulaire : la racine développe un nodule et la bactérie se transforme en bactéroïde (DENARIE et TRUCHET 1979).
- A l'intérieur du nodule sont synthétisées des protéines spécifiques, les nodulines (VERMA 1980), et un pigment particulier, la leghémoglobine. Celle-ci est constituée d'une partie protéique-globine codée et synthétisée par la plante (SIDLOI-LUMBROSO et coll. 1978) et d'un hème synthétisé par la bactérie (CUTTING et SCHULMAN 1972, NADLER et AVISSAR 1977).
- C'est à l'intérieur du nodule qu'a lieu la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac grâce à une enzyme : la nitrogénase, dont les gènes sont localisés dans le génome bactérien ; la plante participe pourtant à l'activité de ce complexe enzymatique en créant des conditions favorables : approvisionnement en énergie par l'intermédiaire des photosynthétats, protection vis-à-vis de l'oxygène (DENARIE et TRUCHET 1979).

L'établissement de la symbiose et le fonctionnement du nodule sont des phénomènes complexes et supposent toute une série de contrôles génétiques. Chaque étape de la symbiose a pu être mise en évidence par l'inoculation de différents mutants symbiotiques.

VINCENT, en 1980, a proposé un modèle selon lequel l'établissement de la symbiose peut être décomposé en douze étapes (tableau 2).

## LE GENOME DE RHIZOBIUM

Les caractères d'une bactérie du genre **Rhizobium** sont gouvernés par des gènes localisés sur deux types de molécules d'acide désoxyribonucléique : le chromosome, vecteur des propriétés héréditaires de la bactérie, et les plasmides, éléments extrachromosomiques de taille variable.

	Étapes	Description
I	Colonisation de la racine	Multiplication des <b>Rhizobia</b> près des racines de la légumineuse
II	Adhésion à la racine	Attachement bactérien à la cellule de la plante
III	Présence d'acide nucléique bactérien	ADN bactérien à l'intérieur des cellules du cortex
IV	Branchement des poils	Branchement des poils racinaires
V	Courbure des poils	Courbure des poils racinaires
VI	Infection	Formation du cordon infectieux
VII	Initiation du nodule	Développement du méristème de la plante
VIII	Libération des bactéries	Libération intracellulaire des bactéries du cordon infectieux
IX	Développement du bactéroïde	Développement de la forme bactéroïde entière
X	Fixation de l'azote	Réduction de $N_2$ en $NH_4^+$ .
XI	Fonctions complémentaires	Fonctions biochimiques et physiologiques complémentaires
XII	Persistance des fonctions du nodule	Persistance des fonctions du nodule

Tableau 2 - Description des différentes étapes de la symbiose Rhizobium-Légumineuse, selon VINCENT (1980).

La taille du génome de différentes souches de **Rhizobium** a été étudiée par CHAKRABARTI et coll. en 1984 par analyse de la cinétique de réassociation d'ADN de **Rhizobium**. L'ADN utilisé dans cette étude est l'ADN cellulaire total et par conséquent tient compte de l'ADN plasmidique, les valeurs obtenues sont indiquées dans le tableau 3. Selon cette étude, la taille du génome des souches de **Rhizobium** à croissance rapide et à croissance lente peut être répartie respectivement en deux groupes :

- de 3.1 à 3.9  $10^9$  daltons
- de 5.4 à 7.7  $10^9$  daltons

Les deux groupes diffèrent d'un facteur compris entre 1.5 à 2. Si l'augmentation de la taille du génome est une étape primaire dans l'évolution, CHAKRABARTI et coll. (1984) pensent que les souches de **Rhizobium** à croissance lente ayant un génome de taille élevée pourraient être considérées comme plus avancées dans l'évolution que les souches de **Rhizobium** à croissance rapide.

## I. - LE CHROMOSOME

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

Ces dernières années, plusieurs laboratoires ont publié des cartes génétiques circulaires pour des souches de **Rhizobium** efficaces (figure 1) :

- MEADE et SIGNER (1977) et JULLIOT et BOISTARD (1979) pour la souche 2011 de **R. meliloti** ;
- KONDOROSI et coll. (1977) pour la souche 41 de **R. meliloti** ;
- BERINGER et coll. (1978) pour la souche 300 de **R. leguminosarum** ;
- CASADESUS et OLIVARES (1979) pour la souche GR4 de **R. meliloti** ;
- MEGIAS et coll. (1982a) pour la souche RS176 de **R. trifolii**.

Celles-ci ont été obtenues par conjugaison artificielle en utilisant des facteurs R des groupes d'incompatibilité plasmidiques P (P1 et P2). Ces plasmides (ex. : plasmides RP4, RK2, R68) sont en effet autotransférables (gènes tra : "transfer ability"), capables de se répliquer et d'exprimer leurs gènes de résistance dans la quasi-totalité des bactéries à Gram-négatif (plasmides à large spécificité d'hôte), parmi lesquelles **Rhizobium**. Leurs transferts interspécifiques ou intergénériques

Souche	Taille du génome exprimée en daltons x 10 <sup>9</sup> .
<i>R. meliloti</i> (SU216)	3.22
<i>R. phaseoli</i> (CC365)	3.46
<i>R. trifolii</i> (T19)	3.06
<i>R. leguminosarum</i> (SU391)	3.84
<i>R. japonicum</i> (SB16)	7.69
<i>R. japonicum</i> (CC409)	7.62
<i>R. lupini</i> (RL3001)	5.42
<i>R. sp. cowpea</i> (U8)	6.91

Tableau 3 - Estimation de la taille du génome de différentes souches de Rhizobium.

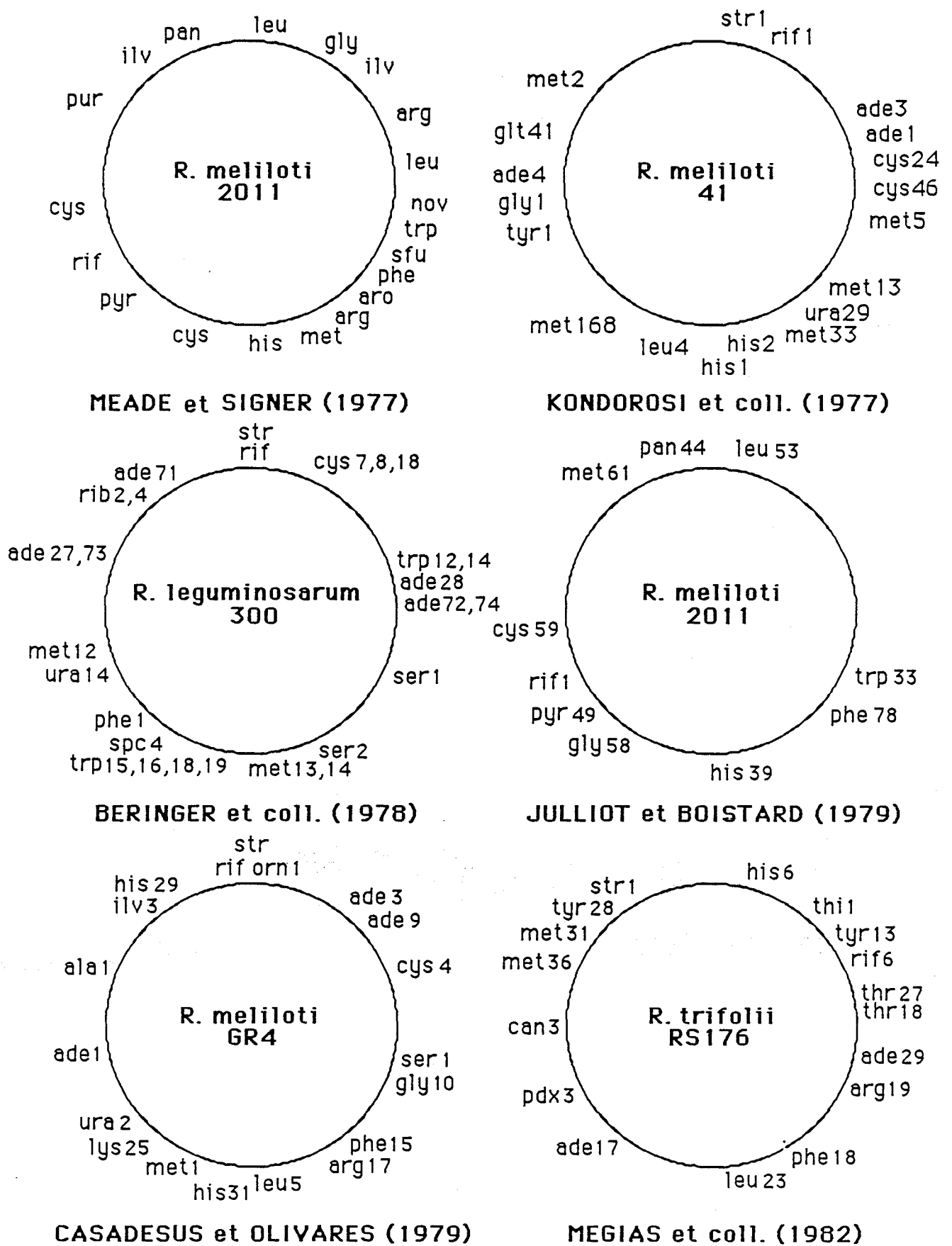


Figure 1 - Cartes génétiques circulaires de différentes souches de Rhizobium.

s'accompagnent souvent de mobilisations soit du chromosome bactérien (Cma : "Chromosome mobilization ability"), soit de plasmides (Pma : "Plasmid mobilization ability") soit de fragments d'ADN chromosomique ou plasmidique.

Une étude comparative des cartes génétiques de la souche 2011, 41 et 300, effectuée par KONDOROSI et coll. en 1980, montre une grande similitude dans la position de certains marqueurs.

Toutefois, aucune indication concernant les caractères d'infectivité ou d'efficacité n'avait pu être identifiée et localisée sur les chromosomes. Des essais de transfert fragment par fragment de chromosome de **R. trifolii**, **R. phaseoli** et **R. leguminosarum** n'ont abouti à aucun transfert de spécificité d'hôte, suggérant que les gènes impliqués dans le processus symbiotique sont localisés sur des éléments extrachromosomiques (BERINGER et coll. 1980). FORRAI et coll. (1983) et SANCHEZ et coll. (1983) ont cependant observé des déficiences symbiotiques engendrées par des mutations chromosomiques. Ceci permet de supposer que les gènes symbiotiques pourraient avoir un support chromosomique aussi bien que plasmidique.

## II. - LES PLASMIDES DE RHIZOBIUM

Comme chez les bactéries du genre **Agrobacterium**, il a été mis en évidence chez **Rhizobium** des plasmides.

### 2.1 - Historique

#### 2.1.1 - Mise en évidence des plasmides

La première hypothèse de l'existence d'un élément génétique extrachromosomique chez **Rhizobium** fut émise par HIGASHI en 1967, qui, par transfert de la spécificité d'hôte de **R. trifolii** à **R. phaseoli** avec élimination du donneur **R. trifolii** par un bactériophage spécifique, a obtenu des **R. phaseoli** capables de noduler le trèfle. Il en a donc conclu que la spécificité d'hôte était portée par un facteur épisomique. Cependant, quelques **R. trifolii** résistants au phage avaient pu survivre à cette sélection et étaient donc présents lors du test d'infectivité sur le trèfle.



La preuve directe de l'existence de plasmides fut apportée par des techniques physicochimiques, et notamment par l'utilisation de la méthode du lysat clarifié (CLEWELL et HELINSKI 1969) qui a permis d'obtenir des plasmides de faible poids moléculaire chez **Rhizobium** (KLEIN et coll. 1975, DUNICAN et coll. 1976, ZURKOWSKI et LORKIEWICZ 1976). Mais cette technique n'était pas applicable pour la détection et l'isolement de plasmides plus larges que 90 Mégadaltons (Md) (LEDEBOER et coll. 1976).

Cependant, l'utilisation de détergents fortement polaires entraînant la dissociation de l'ADN plasmidique des complexes membranaires (NUTI et coll. 1977) a permis de constater que tous les **Rhizobium** hébergent des plasmides de 90 Md à plus de 200 Md, non détectables dans les études ultérieures.

Les contraintes physiques inhérentes à ces méthodes excluaient la détection de tout ADN plasmidique de taille supérieure à 300 Md. Ainsi, certaines souches de **R. meliloti** semblaient dépourvues de plasmide, d'autres présentaient de manière irrégulière des plasmides dont les masses moléculaires dépassaient celles que l'on observait habituellement. Des méthodes beaucoup plus douces (ECKHARDT 1978, SCHWINGHAMER 1980) ont depuis révélé la présence de mégaplasmides (de masse moléculaire > 500 Md) chez **R. meliloti** (ROSENBERG et coll. 1982). L'investigation de la présence de grands plasmides chez les diverses espèces de **Rhizobium** a permis de décrire plus de 60 souches à croissance rapide possédant de grands plasmides (DENARIE et coll. 1981). Chez la plupart des souches étudiées, un ou plusieurs plasmides ont été détectés.

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

### 2.1.2 - Nomenclature des plasmides

Pour être conforme à la nomenclature proposée par SCIACKY et coll. (1978) pour les plasmides larges d'**A. tumefaciens** et en accord avec CASSE et coll. (1980), nous désignons les plasmides indigènes de **Rhizobium** : pRle, pRme, pRph, pRtr, pRja, pRlu, pRcg (pour **R. leguminosarum**, **R. meliloti**, **R. phaseoli**, **R. trifolii**,

*R. japonicum*, *R. lupini* et *R. cowpea group*), suivis par le nom de la souche dans laquelle le plasmide a été détecté et une série de lettre a, b, c etc.. dans le cas de plusieurs plasmides.

Ex. : Souche M5N1 (*R. meliloti*) possédant trois plasmides

- pRmeM5N1a (environ 92 Md : plasmide moyen)

↑     ↑     ↑     ↘  
plasmide    souche    le plus petit plasmide

**Rhizobium meliloti**

- pRmeM5N1b,c (2 mégaplasmites > 500 Md)

### 2.1.3 - Méthodes de mise en évidence du rôle des plasmides dans la symbiose

Ces plasmides ont longtemps été considérés comme cryptiques c'est-à-dire de phénotype inconnu. Sur la base d'arguments génétiques indirects (HIGASHI 1967, DUNICAN et CANNON 1971) plusieurs auteurs avaient émis l'hypothèse que ces plasmides pouvaient porter certains gènes impliqués dans le contrôle de la symbiose.

Cependant, la preuve la plus directe concernant un plasmide comme support des gènes *nif* a été apportée par DUNICAN et coll. (1976), qui ont transféré avec succès les gènes *nif* de *R. trifolii* à une souche de *Klebsiella aerogenes* déficiente du point de vue de la fixation d'azote, avec une fréquence de transfert élevée, en faveur d'un plasmide comme porteur des gènes *nif*.

De nombreux travaux de génétique et de biologie moléculaire ont depuis également démontré l'implication des plasmides de *Rhizobium* dans les processus symbiotiques.

#### 2.1.3.1 - Corrélation entre les modifications du contenu plasmidique et les modifications des propriétés symbiotiques

La perte totale d'un plasmide ou un changement physique détectable telle qu'une large délétion dans l'un des plasmides indigènes peut conduire à l'isolement de mutants altérés dans les propriétés symbiotiques. De tels changements s'effectuent spontanément ou après traitement par des agents chimiques (acridines oranges, SDS, etc..) ou par choc thermique (tableau 4) et peuvent être visualisés par électrophorèse en gel d'agarose (CASSE et coll. 1979).

Auteurs	Année	Phénotype	Espèces
Zurkowski et Lorkiewicz	1978	Nod <sup>-</sup>	<b>R. trifolii</b>
Casse et coll.	1979	Nod <sup>-</sup>	<b>R. leguminosarum</b>
Prakash et coll.	1980	Nod <sup>-</sup>	<b>R. leguminosarum</b>
Banfalvi et coll.	1981, 1985	Nod <sup>-</sup>	<b>R. meliloti</b>
Hooykaas et coll.	1981	Nod <sup>-</sup>	<b>R. trifolii</b>
Zurkowski	1982	Nod <sup>-</sup>	<b>R. trifolii</b>
Higashi et coll.	1983	Nod <sup>-</sup>	<b>R. trifolii</b>
Sadowsky et Bohlool	1983	Nod <sup>-</sup>	<b>R. japonicum</b> à croissance rapide

Tableau 4 - Phénotype symbiotique obtenu par délétion ou perte totale d'un plasmide.

Ainsi l'inaptitude à noduler, obtenue spontanément ou induite, fournit des preuves de l'implication des plasmides dans le processus de nodulation. Néanmoins, il n'est pas toujours possible d'associer la perte d'un plasmide à la perte d'une fonction. De même, la cure de larges plasmides par des agents physiques ou chimiques n'est pas toujours réalisable.

Les faibles fréquences de curage observées par de nombreux auteurs sont attribuées au poids moléculaire élevé des plasmides, au nombre faible de copies par cellule bactérienne ou peut être au fait que dans la population bactérienne certaines cellules possèdent le plasmide à l'état autonome d'autres à l'état intégré dans le chromosome (BRANDSCH et coll. 1982). Actuellement, aucun mégaplasmide ( $> 500$  Mdal) de *R. meliloti* n'a pu être curé suggérant que ces plasmides portent des gènes essentiels à la survie de la cellule bactérienne. Cependant, des délétions du mégaplasmide (pSym) peuvent être obtenues à une fréquence élevée, l'importance de ces délétions est variable selon la température d'incubation (TORO et OLIVARES 1986a).

### 2.1.3.2 - Transfert des caractères symbiotiques à fréquence élevée

Le transfert des caractères symbiotiques à une fréquence élevée (supérieure à celle des marqueurs chromosomiques) signifie que les gènes responsables des propriétés symbiotiques sont portés par des plasmides transmissibles. Ainsi, JOHNSTON et coll. (1978) après marquage d'un plasmide conjugatif d'une souche de *R. leguminosarum* par le transposon Tn5 (résistance à la kanamycine) (plasmide pRL1JI::Tn5) ont réussi à transférer à haute fréquence ( $\approx 10^{-2}$ ) la capacité de noduler le pois à un mutant de *R. leguminosarum* non infectieux pour cette légumineuse et à d'autres espèces de *Rhizobium*. Le transfert de la capacité de noduler le trèfle, de *R. trifolii* à des *R. leguminosarum* capables ou non de noduler leurs hôtes, ainsi qu'à des *A. tumefaciens* dépourvus de leur plasmide Ti, a également été décrit par HOOYKAAS et coll. (1981).

Des résultats similaires ont été obtenus par RUIZ-SAINZ et coll. (1984) qui ont réussi à transférer le plasmide pJB5JI::Tn5 de *R. leguminosarum* à une souche de *R. japonicum* à croissance rapide (USDA 194) avec une fréquence de transfert de l'ordre de  $10^{-2}$ ; les transconjugants issus de ce croisement induisent les premières étapes du développement des nodules sur le pois.

### 2.1.3.3 - Hybridation moléculaire

Localisés sur le chromosome, au nombre de 17, répartis en 7 ou 8 unités de transcription, les gènes nif de **Klebsiella pneumoniae** s'étendent sur une région de 24 kilobases (Kb) (ELMERIC 1979 ; AUSUBEL et CANNON 1980). Ces gènes ont été clonés (DIXON et coll. 1976, CANNON et coll. 1979) et constituent du fait de la conservation de séquence de la nitrogénase chez les différents organismes fixateurs d'azote des sondes très utiles pour la localisation des gènes nif chez les autres bactéries fixatrices. Les gènes de structure pour la nitrogénase ont ainsi pu être localisés chez **R. leguminosarum**, **R. trifolii**, **R. phaseoli** et **R. meliloti** sur des plasmides de très grande taille appelés plasmides symbiotiques (pSym) (NUTI et coll. 1979, PRAKASH et coll. 1981, BANFALVI et coll. 1981, ROSENBERG et coll. 1981).

### 2.1.3.4 - Mutagenèse : la transposition

La méthode de mutagenèse la plus utilisée actuellement pour l'étude des plasmides de **Rhizobium** est la transposition. En effet, les plasmides constituent une cible pour les transposons, ce qui permet l'isolement de mutants de **Rhizobium** affectés sur leurs propriétés symbiotiques. Les transposons sont des éléments génétiques transposables codant le plus souvent pour des résistances à des antibiotiques, capables de se déplacer au sein du génome bactérien. Véritables agents mutagènes génétiques, les transposons assurent à la fois l'inactivation des fonctions et le marquage génétique du segment d'ADN dans lequel ils sont insérés. Le transposon Tn5, qui porte un gène conférant la résistance à la kanamycine (BERG et coll. 1980) est le plus fréquemment utilisé pour l'obtention de mutants symbiotiques (BUCHANAN-WOLLASTON et coll. 1980, BANFALVI et coll. 1981, FORRAI et coll. 1983). Il faut signaler que le même transposon exprime la résistance à la streptomycine chez **Rhizobium** (PUTNOKY et coll. 1983, SELVARAJ et IYER 1984). Le transposon Tn7, codant pour la résistance à la spectinomycine, à la streptomycine et à la triméthoprime est également utilisé notamment pour sa propriété de s'insérer plus spécifiquement au niveau du pSym (BOLTON et coll. 1984).

## 2.2 - Méthodes d'isolement et caractérisation

### 2.2.1 - Méthodes d'isolement

Diverses méthodes ont permis la détection et l'isolement de molécules d'ADN plasmidique chez **Rhizobium**.

La méthode du lysat clarifié (CLEWELL et HELINSKI 1969) est appliquée à l'isolement des plasmides chez diverses bactéries Gram-négatives. Cette technique basée sur une lyse des cellules bactériennes par des détergents neutres suivie d'une centrifugation permet la séparation des plasmides du complexe chromosome-membrane. Cependant, chez **Rhizobium**, cette technique n'est applicable qu'à l'isolement de petits plasmides dont le poids moléculaire varie de 25 à 65 Md (DUNICAN et coll. 1976, ZURKOWSKI et LORKIEWICZ 1976). En effet, des difficultés sont rencontrées pour isoler des grands plasmides sous forme CCC, ce qui peut s'expliquer par le fait que ces plasmides ne sont pas dissociés du complexe chromosome-membrane lors du traitement.

Les plasmides de poids moléculaire élevé sont difficiles à isoler pour 2 raisons :

- d'une part, ils sont associés au complexe chromosome-membrane ;
- d'autre part, leur isolement doit se faire sous forme intact CCC : une cassure sur l'un des brins empêche l'obtention de ces molécules, or ils sont très sensibles à toute action mécanique ou enzymatique (nucléases).

Toutes les méthodes ayant permis l'isolement de tels plasmides chez **Rhizobium** sont basées sur l'utilisation de détergents fortement polaires tel que le sarkosyl ou le SDS qui aboutissent à une lyse plus complète que les détergents neutres.

Deux étapes sont déterminantes dans la préparation de ces plasmides.

#### 2.2.1.1 - Lyse et dissociation du complexe chromosome-membrane

La lyse cellulaire est réalisée en hydrolysant la paroi bactérienne par des enzymes : le lysozyme ou la pronase (GROSS et coll. 1979, HIRSCH et coll. 1980), et un détergent polaire : le SDS ou le sarkosyl. Un pré-lavage des bactéries dans une solution diluée de sarkosyl (0.1 %) suivi d'un choc osmotique pour faciliter l'accès de la paroi bactérienne au lysozyme, augmentent l'efficacité de la lyse (SCHWINGHAMER 1980) ce qui permet l'obtention de très grands plasmides à des fins analytiques et préparatives (SCHWINGHAMER 1980, ROSENBERG et coll. 1982). Les **Rhizobium** à croissance lente doivent être soumis à un pré-lavage dans du NaCl 0.5 M avant la lyse ou aucun plasmide ne peut être obtenu ; ceci serait dû à leurs exopolysaccharides.

La dissociation du complexe chromosome-membrane est effectuée par des traitements physiques tels que l'agitation du lysat (NUTI et coll. 1977) ou les chocs thermiques (HANSEN et OLSEN 1978) ; par des traitements chimiques telle que la lyse alcaline (CASSE et coll. 1979) et par des traitements enzymatiques à la RNase (ECKHARDT 1978), ou à la pronase (HIRSCH et coll. 1980), ou à la RNase et à la pronase (BECHET et GUILLAUME 1978).

### 2.2.1.2 - Elimination du chromosome et des débris cellulaires

Après la lyse, certaines méthodes utilisées pour enrichir la préparation en ADN plasmidique CCC utilisent la dénaturation irréversible de l'ADN linéaire à un pH supérieur à 12 (CASSE et coll. 1979, HIRSCH et coll. 1980) alors que l'ADN plasmidique protégé par sa structure superenroulée n'est que partiellement dénaturé, de plus, cette dénaturation partielle est réversible. L'élimination de l'ADN dénaturé et des débris cellulaires est réalisée par un traitement phénolique en présence de forte concentration en sel (CURRIER et NESTER 1976). L'ADN restant est ensuite précipité à l'éthanol. Cette technique a permis l'isolement de plasmides de poids moléculaire de 118 Md chez **R. japonicum** (GROSS et coll. 1979).

En limitant les actions mécanique au cours des diverses étapes, il est possible d'obtenir des plasmides de poids moléculaire supérieur à 300 Md chez **R. meliloti** et **R. leguminosarum** (CASSE et coll. 1979).

D'autres méthodes pour isoler l'ADN plasmidique sont basées sur la précipitation sélective du complexe chromosome-membrane en présence de SDS et de forte concentration en NaCl (HANSEN et OLSEN 1978). Contrairement à la technique précédente, l'ADN plasmidique est précipité par le PEG. La précipitation au PEG a permis d'isoler des plasmides de poids moléculaire supérieur à 250-300 Md chez **R. leguminosarum** (HIRSCH et coll. 1980) et **R. trifolii** (BEYNON et coll. 1980). Enfin, il existe d'autres méthodes où après lyse et dissociation des plasmides du complexe chromosome-membrane, les lysats sont directement soumis à une séparation par ultracentrifugation en gradient de densité (BECHET et GUILLAUME 1978, SPITZBARTH et coll. 1979) ou par électrophorèse en gel d'agarose (ECKHARDT 1978, ROSENBERG et coll. 1981).

### 2.2.1.3 - Purification de l'ADN plasmidique

Pour obtenir une quantité suffisante d'ADN plasmidique, il est nécessaire d'effectuer une ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium (ADACHI et IYER 1980). Cette méthode préparative permet l'obtention de plus de 200 µg d'ADN plasmidique pour 4 à 6 litres de culture et ceci pour la plupart des espèces de **Rhizobium**. Puisque cette technique est basée sur les différences structurales existantes entre l'ADN plasmidique et l'ADN chromosomique, elle ne permet pas de séparer les différents plasmides qui peuvent exister dans une même souche. Cette méthode est utilisée pour obtenir des plasmides de **Rhizobium** de plus de 200 Md qui pourront être analysés ultérieurement par exemple par microscopie électronique ou par les endonucléases de restriction. Pour une étude analytique, l'ultracentrifugation peut être réalisée en gradient de saccharose. En appliquant la technique de lyse alcaline suivie d'une ultracentrifugation en gradient alcalin de saccharose, NUTI et coll. (1977) ont été les premiers à démontrer d'une façon convaincante la présence de grands plasmides dans plusieurs espèces de **Rhizobium** et à fournir une estimation de leur poids moléculaire.

Des gradients neutres de saccharose ont également été utilisés avec succès pour la détection et l'estimation du poids moléculaire de très grands plasmides : approximativement 460 Md (ZURKOWSKI et LORKIEWICZ 1979).

## **2.2.2 - Caractérisation des plasmides de Rhizobium**

### 2.2.2.1 - Cinétique de réassociation

Cette méthode permet d'étudier la complexité moléculaire de l'ADN et de confirmer sa nature plasmidique même si les molécules d'ADN étudiées sont sous la forme OC ou linéaire. La procédure décrite initialement pour les plasmides d'**A. tumefaciens** (LEDEBOER et coll. 1976) donne une estimation du poids moléculaire avec une précision de 10 %.



### 2.2.2.2 - Microscopie électronique

L'étude des molécules d'ADN plasmidique en microscopie électronique permet de déterminer leur forme, leur taille, et donc leur masse moléculaire avec une précision plus grande que les autres techniques existantes. Cette technique a notamment été utilisée pour mesurer le poids moléculaire de grands plasmides de 90 à 200 Md chez **R. meliloti** (CASSE et coll. 1979, SPITZBARTH et coll. 1979) et supérieur à 350 Md chez **R. leguminosarum** (SCHWINGHAMER et DENNIS 1979). Tout récemment, le poids moléculaire exact du mégaplasme de **R. meliloti** a pu être déterminé grâce à son isolement en lyse très douce et analyse en microscopie électronique (BURKARDT et BURKARDT 1984). Sa longueur a permis de déterminer un poids moléculaire d'environ 1000 Md. La technique de microscopie électronique peut également servir à rechercher le long des molécules certaines séquences particulières, mesurer leur longueur et étudier leur répartition. BAZETOUX (1983) a montré l'existence de 3 paires de séquences répétées inversées dans le plasmide moyen (pRme) de la souche L5-30 et 1 paire seulement dans celui de la souche 41 de **R. meliloti**.

En utilisant la technique d'hétéroduplexe, des séquences homologues entre différents plasmides des **Rhizobiacées** ont pu être localisées avec précision et mesurées (PRAKASH et coll. 1981).

### 2.2.2.3 - Electrophorèse en gel d'agarose

La technique développée par MEYERS et coll. (1976) a été longtemps utilisée pour la caractérisation rapide des plasmides de **Rhizobium** (CASSE et coll. 1979, GROSS et coll. 1979, PRAKASH et coll. 1980, HIRSCH et coll. 1980). Actuellement la mise en évidence des plasmides chez diverses souches de **Rhizobium** est réalisée par la méthode de lyse directe sur le gel décrite par ECKHARDT (1978).

Le principal avantage de la technique en gel d'agarose réside dans la possibilité de détecter de très grandes molécules d'ADN plasmidique sous forme CCC. La mesure de la mobilité relative des molécules d'ADN plasmidique en gel d'agarose permet également d'estimer leur poids moléculaire si leur taille est inférieure à 150 Md. En effet, pour des molécules de taille supérieure, la mesure est faussée par la relation non logarithmique entre la mobilité et leur taille.

#### 2.2.2.4 - Profil avec les endonucléases de restriction

Une autre approche dans la caractérisation des plasmides de **Rhizobium** consiste à les hydrolyser avec les endonucléases de restriction puis à séparer les fragments obtenus sur un gel d'agarose. L'analyse des profils de restriction obtenus permet de comparer les plasmides de même classe issus de différentes souches de **Rhizobium** ; c'est ainsi que JOUANIN et coll. (1981) et ADACHI et coll. (1983) ont montré l'absence de structure globalement conservée chez les pRme. SADOWSKI et BOHLOOL (1983) ont obtenu des résultats similaires sur les plasmides de 100 à 200 Md avec des souches de **R. japonicum** à croissance rapide (photographies 1 et 2).

### 2.3 - Caractéristiques et particularités des plasmides de Rhizobium

La présence de grands plasmides constitue un trait commun entre les différentes espèces de **Rhizobium**. Des plasmides ont été détectés chez :

- **R. leguminosarum** (NUTI et coll. 1977),
- **R. phaseoli** (BEYNON et coll. 1980),
- **R. meliloti** (CASSE et coll. 1979),
- **R. trifolii** (ZURKOWSKI et LORKIEWICZ 1976, SCHWINGHAMER 1980),
- **R. japonicum** (GROSS et coll. 1979),
- **R. du "cowpea group"** (TSHITENGE et coll. 1975).

Le nombre et la taille des plasmides indigènes varient suivant les espèces et les souches (CASSE et coll. 1979, HIRSCH et coll. 1980). Toutefois, une identité dans le contenu plasmidique semble exister au sein d'une même espèce : les souches de **R. phaseoli** et celles de **R. trifolii** portent deux plasmides : le plus large étant supérieur à 300 Md ; les souches de **R. leguminosarum** hébergent trois à cinq plasmides : 1 à 2 plasmides de 110-120 Md, 2 plasmides de taille comprise entre 150 et 250 Md et souvent un plasmide estimé à une valeur supérieure à 300 Md.

Chez les trois espèces précédemment citées tout ou partie des gènes bactériens contrôlant la formation des nodules, et les gènes de structure de la nitrogénase sont localisés sur un seul et même plasmide : le pSym, dont la masse moléculaire varie suivant les espèces et les souches, entre 100 et 550 Md (KROL et coll. 1982a). De plus, il a été montré que les gènes bactériens contribuant à l'établissement des nodules (gènes nod) et à la fixation d'azote (gènes fix) sont étroitement associés

Photographie 1 - Profils de restriction obtenus par digestion de plasmides de *R. meliloti* par l'endonucléase de restriction HindIII. Canal A : ADN du phage  $\lambda$  digéré par HindIII ; B : 54032 ; C : 102F51 ; D : 12 ; E : L5-30 ; F : 41 ; G : 1322.

Photographie 2 - Profils de restriction obtenus par digestion de plasmides de *R. japonicum* à croissance rapide. Les échantillons non digérés sont visualisés dans les canaux I (PRC205), II (PRC194) et III (PRC0B2). Les trois canaux à la droite de chaque nombre sont les digestions obtenues par les endonucléases de restriction EcoRI (e), HindIII (h) et BamHI (b). Canal IV : ADN du phage  $\lambda$  non digéré.

sur les pSym de **R. leguminosarum** (BUCHANAN-WOLLASTON et coll. 1980), de **R. trifolii** (HOOYKAAS et coll. 1981, ROLFE et coll. 1981) et de **R. phaseoli** (LAMB et coll. 1982).

Les souches de **R. meliloti** abritent deux à cinq plasmides. Les différentes méthodes d'isolement décrites précédemment ont révélé la présence de deux classes de plasmides : l'une pouvant être isolée par la technique de dénaturation alcaline et dont les poids moléculaires se situent entre 90 et 200 Md et l'autre qui n'a pu être détectée que par la technique d'ECKHARDT (1978) et dont les poids moléculaires sont supérieurs à 500 Md (mégaplasmites). Ces mégaplasmites ont été détectés dans 27 souches de **R. meliloti** d'origines géographiques différentes et de groupes d'inoculation variés (ROSENBERG et coll. 1981).

En 1984, PÜHLER et coll. ont suggéré l'existence de deux mégaplasmites dans la souche 2011 de **R. meliloti**. La même année, par des expériences de génétique, SIMON montre que la souche 2011 de **R. meliloti** possède deux mégaplasmites d'une part, d'autre part qu'un seul mégaplasmitide porte les gènes impliqués dans la nodulation. En effet le croisement, entre la souche 2011 dont les plasmides indigènes ont été marqués par le nouveau transposon Tn5-Mob et **Agrobacterium** LBA290 comme souche réceptrice, a engendré deux types de transconjugants : nodulants inefficients ou non nodulants la luzerne. L'étude du contenu plasmidique de ces transconjugants par comparaison avec les souches parentales a révélé la présence d'un mégaplasmitide dans les deux groupes.

La présence de deux mégaplasmites dans certaines souches de **R. meliloti** a pu être réellement mise en évidence grâce à l'isolement de mutants présentant une délétion dans l'un des mégaplasmites (BANFALVI et coll. 1985, MAOUI et coll. 1985b). Toutefois, BANFALVI et coll. (1985) n'ont pas identifié de gènes symbiotiques sur le second mégaplasmitide. Depuis, la présence de deux mégaplasmites chez **R. meliloti** semble se généraliser, notamment avec les récents travaux de HYNES et coll. (1986) qui impliquent ce second mégaplasmitide dans le processus symbiotique. Actuellement, il n'existe pas de méthode de purification permettant la préparation de ces mégaplasmites en quantité suffisante, ce qui rend leur analyse très difficile.

Cependant **R. meliloti** diffère des espèces précédentes dans la mesure où la taille du pSym semble être identique dans toutes les souches. Les gènes nif et les gènes nod ont été trouvés associés sur le mégaplasmitide, caractéristique de l'espèce

**meliloti** (ROSENBERG et coll. 1981, 1982 ; BANFALVI et coll. 1981, 1983 ; KONDOROSI et coll. 1982).

Chez **R. japonicum**, sur 9 souches à croissance lente examinées, seule la souche 3I1b94 héberge plusieurs plasmides ; inversement, parmi toutes les souches à croissance rapide testées, seule la souche 0B3 ne possède qu'un plasmide (ATHERLY et coll. 1983). Ces observations suggèrent la présence d'un grand plasmide chez **R. japonicum** à croissance lente et de plusieurs plasmides de poids moléculaire élevé chez les **R. japonicum** à croissance rapide (où la plupart des souches étudiées possède un plasmide de plus de 450 Md) (APPELBAUM et coll. 1984, BROUGHTON et coll. 1984, HERON et PUEPPKE 1984). Cependant, aucun statut n'a été établi pour les souches de **R. japonicum**.

PRAKASH et ATHERLY (1984) ont démontré par hybridation moléculaire la présence de deux copies *nod* et *nif* sur un grand plasmide de deux souches de **R. japonicum** à croissance rapide (USDA193 et USDA205). APPELBAUM et coll. (1985) ont montré que les séquences *nod* et *nif* sont également localisées sur des grands plasmides dans huit souches de **R. japonicum** à croissance rapide, cependant ces mêmes gènes semblent être situés sur le chromosome dans deux autres souches. Ainsi la présence du *pSym* ne semble pas être un cas général dans les souches de **R. japonicum** à croissance rapide. Cette espèce de **Rhizobium** permet une meilleure compréhension de la symbiose soja-**Rhizobium japonicum** que celle à croissance lente.

Les contenus plasmidiques et l'implication dans la symbiose de plasmides de **Rhizobium** tropicaux à large spécificité d'hôte (**cowpea group**) capables de noduler de nombreuses légumineuses ainsi que d'autres plantes tropicales, sont actuellement à l'étude. Outre leur large spécificité d'hôte et leur contribution à la fertilité des sols de pays défavorisés, certains de ces **Rhizobium** présentent en plus d'autres particularités intéressantes comme la fixation asymbiotique de l'azote ou la formation de nodules sur la tige de la légumineuse associée : *Sesbania rostrata* (DREYFUS et DOMMARGUES 1981). Le contenu plasmidique des souches isolées à partir de nodules de tige (ORS571) et de racine (ORS502) a été examiné (DE LAJUDIE et coll. 1982). Chez la souche ORS571 un plasmide de 5.6 Md a été mis en évidence par la technique de MEYERS et coll. (1976), un plasmide de 100 Md a pu être détecté chez la souche ORS502 par les techniques d'ECKHARDT (1978) et de CASSE et coll. (1979).

## 2.4 - Etudes d'homologie entre ADN

Lors d'études portant sur les différents plasmides des **Rhizobiacées**, des homologies de séquences ont été détectées, notamment par hybridations moléculaires ADN-ADN de type SOUTHERN, entre plasmides de différentes souches de **Rhizobium** (PRAKASH et coll. 1980). La présence de séquences d'homologie a fourni des informations utiles concernant la conservation de séquences d'ADN au cours de l'évolution, et les liens de parenté qui peuvent exister entre les membres des **Rhizobiacées**.

Des expériences de renaturation ont été réalisées pour étudier l'homologie entre les plasmides de deux souches de **R. leguminosarum** JB897 et LPR1705 : les plasmides b et c de ces deux souches montrent un taux d'homologie entre eux de 80 %, l'homologie entre les petits plasmides a est encore plus importante (PRAKASH et coll. 1980).

PRAKASH et coll. (1981) ont par ailleurs montré que les plasmides de **R. leguminosarum** présentent un degré d'homologie considérable entre eux d'une part, avec ceux de la souche RCR5 de **R. trifolii** d'autre part, mais pas d'homologie avec le plus petit plasmide de la souche L5-30 (pRmeL5-30a) de **R. meliloti**. Ceci suggère une étroite parenté entre **R. leguminosarum** et **R. trifolii**.

JOUANIN et coll. (1981) ont également démontré par hybridation qu'une homologie significative existe entre les pRme de différentes souches de **R. meliloti**. Parmi les séquences homologues détectées, ils ont pu identifier une séquence conservée chez tous les plasmides analysés et dont la taille n'a pu être mesurée avec précision (de l'ordre de 3 à 4 Md).

ADACHI et coll. (1983) ont constaté que les pRme (125-200 Md) de quatre différentes souches de **R. meliloti** avaient beaucoup ou peu d'homologie de séquence entre eux.

L'utilisation de l'ADN de plasmides Ti (pTi) de souches à nopaline et à octopine d'**A. tumefaciens** comme sonde contre des "SOUTHERN BLOTS" du pRme41a digéré par HindIII a permis à BATUT et coll. (1982) de mettre en évidence une homologie entre trois régions différentes du pRme41a et les pTi. L'expérience inverse où l'ADN du pRme41a a servi de sonde, leur a permis de montrer que deux régions du pRme41a

sont homologues des régions B et C du pTi impliquées dans le contrôle des fonctions de réplication et d'autotransfert. Cependant, aucune homologie entre les pRme et la région T-DNA (ADN de transfert) des pTi n'a été observée. La séquence de 3 à 4 Md qui est fortement conservée chez tous les pRme étudiés est homologue aux séquences contenues dans la région D des pTi (porteuse de gènes de virulence).

D'autres auteurs ont également montré que les régions du pTi décrites précédemment par BATUT et coll. (1982) présentent une homologie avec les plasmides contrôlant des fonctions symbiotiques chez **R. leguminosarum**, **R. trifolii** et **R. phaseoli** (PRAKASH et SCHILPEROORT 1982).

Les données actuelles sur les homologies de séquences au sein des plasmides des **Rhizobiacées** font apparaître la présence de séquences conservées, laissant penser à une origine commune pour ces plasmides.

Sur la base des découvertes mentionnées ci-dessus, on pourrait également penser que les plasmides Ti et certains plasmides de **Rhizobium** ont une origine commune dans l'évolution. Cependant, les plasmides d'**Agrobacterium** et de **Rhizobium** n'appartiennent pas au même groupe d'incompatibilité (HOOYKAS et coll. 1979) ; en effet, les deux types de plasmides peuvent coexister d'une manière stable à l'intérieur d'une même cellule malgré leur forte homologie de séquence.

## 2.5 - Les plasmides Ti et Ri chez Rhizobium

Une étroite parenté entre les **Agrobacterium** et les **Rhizobium** basée sur des études taxonomiques a été décrite par plusieurs auteurs (GRAHAM 1964, DE LEY et coll. 1966, WHITE 1972, GIBBINS et GREGORY 1972). Il est maintenant bien établi que ce sont de grands plasmides, appelés plasmides Ti (pTi) et Ri (pRi) (Tumor inducing et Root inducing) qui induisent respectivement les tumeurs du collet et les proliférations racinaires chez la plupart des Dicotylédones (SCHELL et VAN MONTAGU 1979, MOORE et coll. 1979).

Des études de transfert du plasmide Ti ainsi que le contrôle de son expression chez diverses espèces de **Rhizobium** ont été entreprises. Notamment, HOOYKAAS et coll. (1977, 1979), PRAKASH et coll. (1980) ont décrit le transfert des plasmides pTi à octopine ou à nopaline ou les deux plasmides cointégrés chez **R. trifolii**. Ce transfert est obtenu par mobilisation avec le facteur RP4 ou dans des conditions

particulières. Les transconjugants ayant acquis l'un des plasmides ou la forme cointégrée sont devenus capables d'induire des tumeurs et d'exprimer les caractères codés par le pTi telle que l'utilisation de l'octopine ou de la nopaline.

Les transconjugants ayant acquis le pTi à octopine induisent des nodules uniquement sur la plante hôte alors que les transconjugants ayant reçu les plasmides cointégrés provoquent la nodulation non seulement sur leur propre hôte (trèfle) mais également sur le pois, bien que les nodules formés soient inefficients. La nodulation du pois par des mutants de **R. trifolii** a déjà été décrite (HEPPER 1978), par conséquent, des études complémentaires sont nécessaires pour exclure que des événements mutationnels soient à l'origine de l'extension de la spécificité d'hôte décrite précédemment.

Le transfert réciproque du pTi de **R. trifolii** à des souches d'**Agrobacterium** dépourvues de pTi n'est possible que si les gènes de transfert du plasmide Ti sont induits. Ceci montre que le système de régulation des gènes de transfert du pTi fonctionne non seulement chez **Agrobacterium** mais aussi chez **R. trifolii**.

Des études de réassociation cinétique (G. OOMS, résultats non publiés) ainsi que des analyses électrophorétiques en gel d'agarose ont montré que les plasmides Ti et les plasmides indigènes de **R. trifolii** peuvent coexister d'une manière stable chez les transconjugants. Ceci indique que les plasmides de **R. trifolii** sont compatibles avec le groupe inc Rh.1 formé par les plasmides Ti à octopine et à nopaline (HOOYKAAS et coll. 1979). Le plasmide cointégré RP4::Ti (à octopine) a été transféré à différentes souches efficaces chez différentes espèces de **Rhizobium** en particulier à **R. leguminosarum**, **R. meliloti**, **R. phaseoli** et **R. trifolii** (HOOYKAAS et coll. 1979). Les propriétés symbiotiques et oncogéniques sont résumées dans le tableau 5.

Alors que le caractère de dégradation de l'octopine est exprimé dans tous les transconjugants des différentes espèces testées, citées ci-dessus, l'expression de la virulence est variable : elle est totalement exprimée chez les transconjugants de **R. trifolii**, faiblement chez les transconjugants de **R. leguminosarum** et **R. phaseoli** et non exprimée chez les transconjugants de **R. meliloti** (HOOYKAAS et coll. 1979). La différence de virulence des transconjugants des différentes souches résulterait probablement des différents composants de surface, responsables de l'attachement de la bactérie à la plante, que possèdent les souches de **Rhizobium**.



Souches réceptrices	Propriétés des souches réceptrices				Propriétés des transconjugants			
	Occ	Vir	Nod	Fix	Occ	Vir	Nod	Fix
<i>A. tumefaciens</i> C58 (dépourvu de pTi)	-	-	-		+	+	-	-
<i>R. leguminosarum</i> 1105	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>R. leguminosarum</i> 1039	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>R. meliloti</i> 2011	-	-	+	+	+	-	+	+
<i>R. meliloti</i> CIAT20	-	-	+	+	+	-	+	+
<i>R. trifolii</i> 5	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>R. trifolii</i> 0403	-	-	+	+	+	+	+	+

**Tableau 5 - Propriétés symbiotiques et oncogéniques des souches d'*Agrobacterium* et de *Rhizobium* avant et après le transfert du plasmide cointégré RP4::Ti (à octopine).**

Fix : Fixation d'azote dans les nodules  
 Nod : Nodulation de la plante hôte  
 Occ : Utilisation de l'octopine  
 Vir : Induction de la tumeur

Les découvertes mentionnées ci-dessus indiquent clairement que la formation de tumeurs et de nodules sur les racines peut être induite par un seul et même organisme. Cependant, l'expression de la fixation d'azote est affectée par la présence des plasmides Ti dans les deux souches de **R. leguminosarum** testées bien que les plasmides Ti du groupe inc Rh.1 soient compatibles avec les plasmides de **Rhizobium**.

Les seuls travaux concernant le transfert du plasmide Ri à des souches de **Rhizobium** ont été effectués par STROBEL et coll. (1985). L'introduction du plasmide Ri marqué par le Tn5 dans la souche BL116 de **R. meliloti** engendre des transconjugants incapables d'induire une prolifération racinaire des plantes Dicotylédones testées ; cependant, ces transconjugants sont capables de provoquer une nodulation abondante et de fixer l'azote à un taux plus élevé que la souche d'origine.

Le fait que les plasmides Ti sont maintenus d'une manière stable et que leurs marqueurs génétiques sont exprimés partiellement chez **Rhizobium**, est en accord avec la parenté établie par les études taxonomiques entre les **Agrobacterium** et les **Rhizobium**.

## 2.6 - Les plasmides et les fonctions symbiotiques

Ces dernières années les travaux se sont focalisés sur l'organisation et l'expression des gènes symbiotiques des **Rhizobium**.

L'isolement de mutants altérés dans les fonctions symbiotiques est indispensable pour étudier la symbiose **Rhizobium**-légumineuses. De tels mutants permettent de localiser et de caractériser les gènes impliqués dans ce phénomène. Selon le phénotype apparent, les mutants de **Rhizobium** incapables de fixer l'azote en symbiose avec les légumineuses hôtes sont classés dans deux principaux groupes :

- les bactéries Nod<sup>-</sup> qui sont incapables de former des nodules sur la plante-hôte ;
- les bactéries Fix<sup>-</sup> qui forment des nodules mais sont déficientes dans la fixation d'azote et/ou la persistance des fonctions du nodule.

Plusieurs gènes impliqués dans le processus symbiotique ont été identifiés récemment grâce à la mutagenèse par transposition et aux techniques de biologie moléculaire. Parmi ces gènes, certains interviennent dans les étapes précoces de la symbiose tels que les gènes Hsp (spécificité d'hôte), les gènes Hac (courbure des poils)

et les gènes nod (LONG et coll. 1982, HADLEY et coll. 1983, SCHOFIELD et coll. 1983, KONDOROSI et coll. 1984) alors que les autres interviennent dans les étapes tardives de la symbiose : gènes nif et fix (ROSENBERG et coll. 1981, SCOTT et coll. 1982, CORBIN et coll. 1983, DOWNIE et coll. 1983a, FORRAI et coll. 1983, ZIMMERMAN et coll. 1983, SZETO et coll. 1984). Certains de ces gènes notamment les gènes nod, nif et fix ont pu être localisés au sein du génome de **Rhizobium** sur des grands plasmides appelés pSym.

### 2.6.1 - Plasmides et gènes nod

L'expression de plusieurs gènes appartenant à la fois à la bactérie et à la plante hôte est indispensable pour une symbiose efficace (VEEGER et NEWTON 1984). Bien que des recherches restent à réaliser pour identifier ces gènes et caractériser leurs activités, les expériences indiquent qu'au cours de la nodulation il existe une série d'événements compliqués lors desquels la plante influence l'expression des gènes bactériens impliqués dans la nodulation (EGELHOFF et coll. 1985, INNES et coll. 1985, ROSSEN et coll. 1985) et réciproquement les bactéries influencent l'expression des gènes de la plante. Il y aurait alors une induction et une répression d'un certain nombre de gènes appartenant à la fois à la plante et à la bactérie (VERMA et LONG 1983).

Bien que le processus de reconnaissance, d'infection et de développement du nodule soit complexe (VINCENT 1980), il semble qu'un nombre restreint de gènes étroitement liés entre eux soient impliqués dans la nodulation chez **R. leguminosarum**, **R. trifolii** et **R. meliloti** (DOWNIE et coll. 1983b, SCHOFIELD et coll. 1984, KONDOROSI et coll. 1984). Par exemple un fragment de 14 Kb du pSym de **R. trifolii** est suffisant pour conférer la capacité de noduler le trèfle à une souche de **R. trifolii** dépourvue de son pSym ainsi qu'à **A. tumefaciens** (SCHOLFELD et coll. 1984).

Par mutagenèse intensive de telles régions avec le transposon Tn5, plusieurs gènes impliqués dans le processus de nodulation ont été identifiés (KONDOROSI et coll. 1984, DJORDJEVIC et coll. 1985a, DOWNIE et coll. 1985) et leurs séquences déterminées (ROSSEN et coll. 1984, TOROK et coll. 1984, EGELHOFF et coll. 1985, JACOBS et coll. 1985). Ces études ont permis d'identifier une région contenant quatre gènes intervenant dans la nodulation : nod A, nod B, nod C et nod D qui codent pour des protéines fortement homologues dans leurs séquences en acides aminés et dans leurs fonctions chez les différentes espèces de **Rhizobium**

(KONDOROSI et coll. 1984, DJORDJEVIC et coll. 1985a, JACOBS et coll. 1985, DOWNIE et coll. 1985, MARVEL et coll. 1985). Les gènes nod A, B et C sont adjacents sur le pSym, orientés dans la même direction et transcrits en ARN messager polycistronique ; le gène nod D est juxtaposé au gène nod A mais orienté dans la direction inverse et transcrit séparément (EGELHOFF et coll. 1985, INNES et coll. 1985). Chez *R. leguminosarum* (ROSSEN et coll. 1985) et *R. meliloti* (MULLIGAN et LONG 1985) le gène nod D est impliqué dans la régulation de l'opéron nod ABC en présence d'exsudats de plante. Les gènes nod ABC sont interchangeableables et peuvent fonctionner aussi bien chez *R. trifolii*, *R. leguminosarum* et *R. meliloti* (KONDOROSI et coll. 1984, FISCHER et coll. 1985, DJORDJEVIC et coll. 1985b).

Par ailleurs, à côté des gènes nod communs, une région adjacente contrôlant la spécificité d'hôte pour la nodulation (hsn) a été identifiée chez *R. meliloti* (KONDOROSI et coll. 1984) et *R. trifolii* (DJORDJEVIC et coll. 1985b).

Les fonctions précises des gènes nod, dont le nombre ne cesse de croître, et leurs régulations restent encore inconnues. Ceci s'explique par l'impossibilité d'isoler les ARN messagers de ces gènes et leurs produits peptidiques chez les *Rhizobium* à l'état libre.

Les protéines des gènes nod ont été obtenues uniquement par fusion des gènes avec des promoteurs forts d'*E. coli* (SCHMIDT et coll. 1984) ou en utilisant le système de traduction *in vitro* chez *E. coli* (DOWNIE et coll. 1985). C'est ainsi que, pour la souche 41 de *R. meliloti*, SCHMIDT et coll. (1984) ont identifié trois polypeptides de poids moléculaire 23 000, 28 500 et 44 000 correspondant respectivement aux produits des gènes nod A, B et C.

Des études génétiques et physiologiques de trente mutants de *R. leguminosarum*, obtenus par transposition sur le caractère nod, ont permis à WIJFFELMAN et coll. (1985) de séparer la région nod du plasmide pRL1JI en deux parties, une partie contenant les gènes nod communs impliquée dans la courbure des poils racinaires (Hac) et la formation de racines épaisses et courtes (Tsr), une autre partie impliquée dans l'efficacité de la nodulation. Les gènes nod sont indispensables pour l'induction du phénotype Tsr (VAN BRUSSELL et coll. 1986).

Afin de mieux comprendre la régulation des gènes *nod*, INNES et coll. (1985) ont utilisé le mini-Mu-lac bacteriophage (MudI1734) pour obtenir une transcription fusionnée des gènes *nod* de *R. trifolii* à l'opéron lac d'*E. coli*. Les fonctions lac-*nod* leur ont permis de déterminer l'activité du promoteur du gène *nod* en utilisant le test de la  $\beta$ galactosidase. Seul le gène *nod D* est exprimé par le *Rhizobium* à l'état libre, cultivé dans des milieux standards ; par contre, les autres gènes *nod* (A, B, C) non exprimés précédemment sont activés quand le *R. trifolii* est cultivé en présence de la plante hôte : le trèfle. Des résultats similaires ont été obtenus par MULLIGAN et LONG (1985) chez *R. meliloti*.

Les processus impliqués dans les premières étapes de développement du nodule peuvent être indépendants. En effet, l'introduction chez *A. tumefaciens* et *E. coli* d'un fragment de mégaplasmide (20 à 40 Kb) de *R. meliloti* portant les gènes codant pour les fonctions initiales de nodulation, induit la formation de nodules inefficients sur les racines de luzerne. Les nodules ainsi formés montrent un développement vasculaire et méristématique normal, mais sont souvent dépourvus de bactéries et ne possèdent pas les cordons d'infection. Ces données suggèrent que l'infection par pénétration dans le cordon n'est peut être pas une étape obligatoire pour l'initiation de nodules (HIRSCH et coll. 1984, 1985).

### 2.6.2 - Plasmides et gènes *nif* et *fix*

La fixation biologique de l'azote est catalysée par le complexe enzymatique : la nitrogénase. Chez tous les organismes fixateurs d'azote, on observe une remarquable similarité du système nitrogénase : celui-ci est composé de deux protéines riches en soufre : le composé I (également appelé dinitrogénase), de poids moléculaire (PM) 220 000, comprend quatre sous-unités formées chacune d'une seule chaîne d'acides aminés ; il contient en outre 24 atomes de fer et 2 atomes de molybdène ; le composé II (dinitrogénase réductase), de PM = 55 000, est constitué de 2 sous-unités protéiques et de 4 atomes de fer. Sa séquence en acides aminés ne varie pas ou peu d'une espèce à l'autre (EADY et POSTGATE 1974). C'est chez *K. pneumoniae* que les gènes de structure de la nitrogénase ont été initialement caractérisés et clonés : les gènes *nif D* et *nif K* codant pour la dinitrogénase et le gène *nif H* codant pour la dinitrogénase réductase (BRILL 1980). Le clonage de ces gènes ont permis la localisation de l'information homologue chez *Rhizobium*. Mais l'homologie au plan moléculaire du système nitrogénase ne tend pas vers l'identité parfaite ne serait-ce qu'au plan de l'organisation des gènes *nif* détectés. Chez *K. pneumoniae*,

ceux-ci sont disposés en opéron continu : nif HDK (BRILL 1980). Il en est de même chez les espèces de *Rhizobium* à croissance rapide tel que *R. meliloti* (CORBIN et coll. 1983), *R. leguminosarum* (KROL et coll. 1982b) et *R. trifolii* (SCOTT et coll. 1983a) où ces gènes ont été localisés à côté des gènes de nodulation communs (nod A, B, C) à une distance minimale entre eux de 11 Kb chez *R. trifolii* et une distance maximale de 20 Kb chez *R. meliloti* (LONG et coll. 1982, DOWNIE et coll. 1983, KONDOROSI et coll. 1984, SCHOFIELD et coll. 1984, LAMB et coll. 1985).

Chez les *Rhizobium* à croissance lente, notamment *R. japonicum*, *R. parasponia* et *R.* du groupe *cowpea*, les gènes de structure de la nitrogénase sont organisés en deux opérons séparés : l'opéron nif DK et l'opéron nif H (KALUZA et coll. 1983, SCOTT et coll. 1983b, ADAMS et CHELM 1984). Chez *R. japonicum* nif H est situé en aval de nif DK à une distance de 17 à 20 Kb ; cependant les deux opérons sont transcrits dans la même direction (FISCHER et HENNECKE 1984, ADAMS et coll. 1984).

Chez *K. pneumoniae* les 17 gènes nif sont organisés en 7 ou 8 opérons (figure 2). L'un de ces opérons, l'opéron nif LA régule l'expression des autres opérons nif : le gène nif L réprime les opérons nif en présence d'oxygène ou d'ammonium (BUCHANAN-WOLLASTON et coll. 1981a, HILL et coll. 1981) alors que le produit du gène nif A active les autres opérons nif à l'exception de son propre opéron (BUCHANAN-WOLLASTON et coll. 1981b). L'opéron nif LA est également contrôlé par un système général de régulation d'azote : gènes ntrA (glnA), ntrB (glnL) et ntrC (glnG) communs à toutes les bactéries entériques testées (McFARLAND et coll. 1981).

Chez les *Rhizobium* à croissance lente, le mécanisme de régulation des deux opérons n'est pas connu alors que chez les *Rhizobium* à croissance rapide, l'opéron nif HDK est activé d'une manière similaire à *K. pneumoniae* : en effet, les gènes HDK de *R. meliloti* sont sous le contrôle direct d'un activateur de transcription (gène "nif A like" ou fix D) qui présente une homologie structurale et fonctionnelle au gène nif A de *K. pneumoniae* (ZIMMERMAN et coll. 1983, SZETO et coll. 1984, WEBER et coll. 1985). Des gènes de régulation "nif A like" ont également été découverts chez *R. leguminosarum* (DOWNIE et coll. 1983a, SCHETGENS et coll. 1985). Le nombre total de gènes fix n'est pas encore déterminé. Après mutagenèse au hasard de souches de *R. meliloti*, la fréquence de mutants auxotrophes obtenus est similaire à celle des mutants Fix<sup>-</sup> prototrophes, ce qui suggère qu'un grand nombre de gènes fix sont impliqués dans la fixation d'azote.

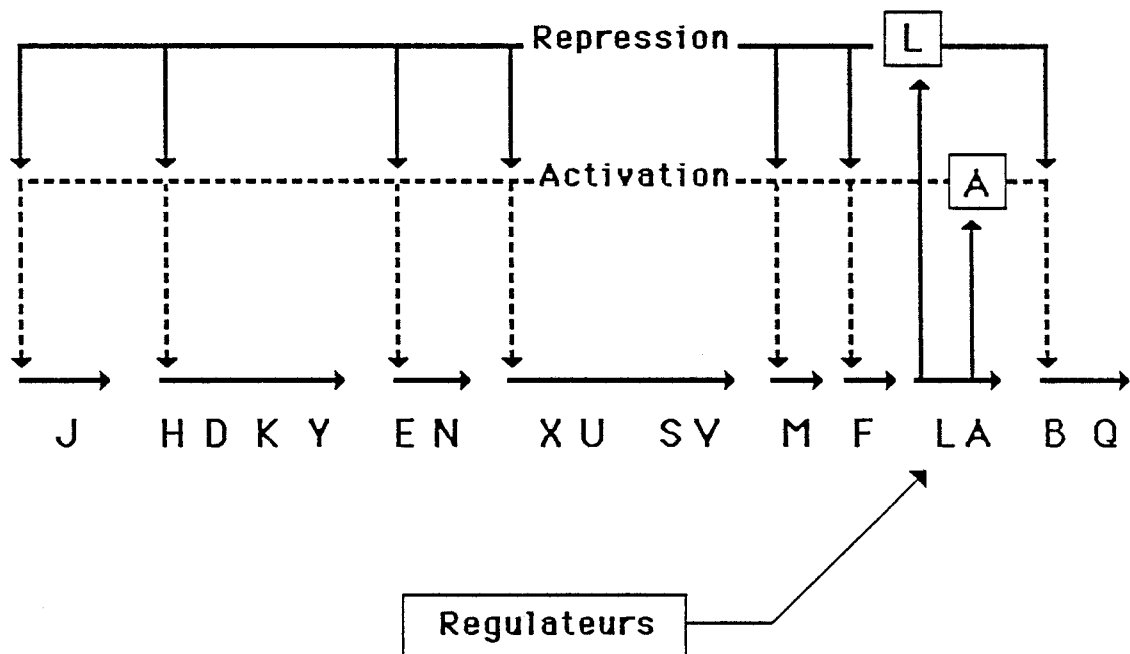


Figure 2 - Organisation et régulation des gènes *nif* chez *K. pneumoniae*.

Chez **R. leguminosarum**, ROSSEN et coll. (1984) ont localisé le gène fix Z homologue au gène nif B de **K. pneumoniae**. Récemment, chez **R. meliloti**, AGUILAR et coll. (1985) ont caractérisé le gène fix F localisé près des gènes nod A, B, C et transcrit à l'état symbiotique. BATUT et coll. (1985) ont également localisé une région fix située à plus de 200 Kb de la région nod-nif chez **R. meliloti**.

## 2.7 - Les plasmides et les fonctions non symbiotiques

D'autres fonctions associées ou non aux propriétés symbiotiques sont codées par des gènes localisés sur les plasmides indigènes de **Rhizobium**. Certaines fonctions peuvent être utilisées comme marqueurs de sélection pour les plasmides indigènes et faciliter énormément les études génétiques.

### 2.7.1 - Production de pigment

La production de pigment (probablement de la mélanine), dont le rôle physiologique est encore inconnu, est caractéristique des souches de **R. phaseoli**, celle-ci est obtenue sur milieu minimum additionné de tyrosine ou sur milieu riche contenant de la tryptone et de l'extrait de levure. Les souches de **R. leguminosarum** et **R. trifolii** examinées ne produisent pas de pigment. BEYNON et coll. (1980) ont établi une corrélation entre la perte de la production de pigment, la perte de la capacité de former des nodules efficaces sur la plante hôte (haricot) et la délétion ou la perte totale du plasmide pRP1JI d'une souche de **R. phaseoli** ; ceci suggère que la production de pigment est contrôlée par un plasmide impliqué dans les fonctions symbiotiques.

### 2.7.2 - Production de bactériocine

L'une des propriétés non symbiotiques la mieux connue est la production de bactériocine chez divers isolats de **R. leguminosarum**. Cette propriété est transmissible à haute fréquence parmi les souches de **Rhizobium**, suggérant la localisation extrachromosomique de ce caractère (HIRSCH 1979, HIRSCH et coll. 1980). HIRSCH (1979) et WIJFFELMAN (résultats non publiés) ont étudié respectivement 97 et 52 souches de **R. leguminosarum** pour leur aptitude à produire la bactériocine et les ont réparties en deux groupes selon le poids moléculaire de la bactériocine produite (bactériocine de faible poids moléculaire ou bactériocine de poids moléculaire moyen). Cependant, bien qu'un seul type de bactériocine soit produite par les diverses souches de **R. leguminosarum**, celles-ci possèdent les gènes



codant pour les deux types de bactériocine. Ainsi, chez les souches produisant de la bactériocine de poids moléculaire moyen, les gènes codant pour la bactériocine de faible poids moléculaire sont réprimés et vice-versa ; une corrélation a même été établie entre la répression de la bactériocine de faible poids moléculaire et la présence de plasmides autotransmissibles portant les gènes codant pour la bactériocine de poids moléculaire moyen. Ces plasmides peuvent être transmis à d'autres **Rhizobiacées** ; les fonctions codées par ces plasmides peuvent également s'exprimer chez d'autres souches de **R. leguminosarum**, **R. trifolii**, **R. phaseoli** et **A. tumefaciens** (HIRSCH et coll. 1980).

### 2.7.3. - Activité hydrogénasique : gènes hup

Certaines souches de **R. leguminosarum** et **R. japonicum** possèdent une activité hydrogénase (Hup : "Hydrogen uptake") qui permet un recyclage de tout ou partie de l'hydrogène produit secondairement par la nitrogénase au cours de la réduction de l'azote atmosphérique. Puisque la production d' $H_2$  nécessite l'hydrolyse d'ATP, c'est-à-dire de l'énergie, ce recyclage par oxydation de l' $H_2$  permet la récupération d'une partie de l'énergie (plus d'1/3, SCHUBERT et coll. 1978), sous forme d'ATP, utilisée comme source d'énergie par la nitrogénase (EMERICH et coll. 1979). Les souches Hup<sup>+</sup> sont généralement à l'origine de symbioses beaucoup plus efficaces (ALBRECHT et coll. 1979, DE JONG et coll. 1982). Les gènes hup, bien que courants chez les microorganismes fixateurs libres d'azote, sont assez rares chez les **Rhizobium** : 20 % des souches de **R. japonicum** recyclent activement l'hydrogène ; la plupart des souches de **R. leguminosarum** sont Hup<sup>-</sup> ou, à quelques exceptions près, très peu efficaces ; **R. trifolii** et **meliloti** ne semblent pas posséder ces gènes (EVANS et coll. 1981).

Comme chez la plupart des fixateurs libres (LIM et coll. 1980) chez **R. leguminosarum**, les gènes impliqués dans ce système récupérateur d'énergie ont été localisés sur un plasmide, en l'occurrence le pSym, à proximité des gènes de nodulation (BREWIN et coll. 1980a). Bizarrement, chez **R. japonicum**, l'activité Hup semble liée à l'absence de plasmide mais la possibilité que ces gènes soient portés par un plasmide non détectable par les méthodes actuelles, n'est pas à exclure (CANTRELL et coll. 1982). Les gènes hup (hydrogen uptake) de **R. japonicum** 122DES ont été caractérisés par HAUGHLAND et coll. (1984) ; ces gènes seraient organisés en 2 à 3 unités de transcription s'étendant sur approximativement 15 kb. Récemment, HOM et coll. (1985), à partir d'une banque de cosmides, ont isolé chez **R. japonicum**, par des expériences de complémentation avec des mutants Nif<sup>-</sup> Hup<sup>-</sup>, un gène impliqué à la fois dans l'activité nitrogénasique et hydrogénasique (nif/hup gene).

Une amélioration sensible du rendement des légumineuses cultivées devrait être obtenue par dissémination de ce système Hup dans les **Rhizobium** (DE JONG et coll. 1982, CANTRELL et coll. 1983). Cependant, SØRENSEN et WYNDAELE (1986) ont étudié l'effet du transfert des plasmides pSym et des gènes hup sur l'efficacité de souches de **R. leguminosarum** et en ont conclu que les pSym et le chromosome jouaient un rôle plus important pour l'accumulation d'azote par la plante que le système Hup.

#### 2.7.4 - Propriétés de transfert

Les études génétiques et biochimiques des fonctions codées par les plasmides indigènes de **Rhizobium** sont rendues difficiles par leur nombre et leur taille. Certains plasmides indigènes de diverses espèces de **Rhizobium** (KONDOROSI et coll. 1983a) portent toutes les informations nécessaires pour exprimer les fonctions de transfert ( $\text{Tra}^+$ ) (BEDMAR et OLIVARES 1980, PANKHURST et coll. 1983). L'auto-transmissibilité de tels plasmides est démontrée en étudiant le transfert des marqueurs symbiotiques ou non symbiotiques localisés sur ces plasmides. Cependant, la plupart des plasmides de **Rhizobium** ne possèdent pas les gènes de transfert ( $\text{ra}^-$ ) et ne sont donc pas auto-transmissibles. Dans certains cas, de tels plasmides peuvent être mobilisés soit par les plasmides du groupe d'incompatibilité P1 (SCOTT et RONSON 1982), soit lorsqu'il existe une homologie entre les deux plasmides. Cette homologie peut être créée naturellement par transposition *in vivo* d'éléments génétiques transposables d'un plasmide à l'autre (HOOYKAAS et coll. 1982, McCOMBIE et coll. 1983), ou artificiellement par insertion *in vitro* d'un fragment du plasmide à mobiliser dans le plasmide mobilisateur (VINCZE et coll. 1982) ou par exemple par insertion *in vivo* de la région de mobilisation (mob) du plasmide mobilisateur dans le plasmide à mobiliser (KONDOROSI et coll. 1982, SIMON et coll. 1983, SIMON 1984).

Des phénomènes de recombinaison *in vivo* peuvent engendrer des plasmides "R-prime" constitués d'un plasmide IncP1 dans lequel est inséré un fragment d'ADN chromosomique (JOHNSTON et coll. 1978 a et b, KISS et coll. 1980) ou plasmidique (KOWALCZUK et coll. 1981, FORRAI et coll. 1983, BANFALVI et coll. 1983) de **Rhizobium**. Le fragment inséré, bénéficiant des propriétés de transfert et de réplication de son vecteur, peut conduire à la restauration du phénotype symbiotique sauvage chez la légumineuse associée si les gènes qu'il porte sont venus compléter les gènes symbiotiques déficients de la souche de **Rhizobium** inoculée à la légumineuse.

### 2.7.5 - Propriétés d'incompatibilité

Les expériences de transfert par conjugaison ou par mobilisation de plasmides entre espèces identiques ou différentes de **Rhizobium** ont permis à plusieurs auteurs de constater le phénomène d'incompatibilité pouvant exister entre les plasmides de **Rhizobium**. Des études détaillées ont confirmé que chez **R. leguminosarum** les plasmides auto-transmissibles qui portent les gènes codant pour la production de bactériocine sont incompatibles entre eux (BREWIN et coll. 1980b, BREWIN et coll. 1982). Cependant le plasmide auto-transmissible de la souche TOM de **R. leguminosarum**, portant les gènes impliqués dans la spécificité d'hôte et la nodulation, est compatible avec un plasmide de la souche 300 de **R. leguminosarum** portant les mêmes fonctions (BREWIN et coll. 1980c) : ces deux plasmides peuvent coexister soit dans la souche 300 ou TOM de **R. leguminosarum**. Des observations analogues ont été décrites concernant la compatibilité des pSym de différentes souches de **Rhizobium** (HOOYKAAS et coll. 1982). Ainsi, le pSym1 de la souche 1001 de **R. leguminosarum** est compatible avec le pSym5 d'une souche de **R. trifolii**, les deux plasmides peuvent coexister dans les deux espèces et les fonctions symbiotiques sont exprimées dans les deux cas. Cependant, la coexistence des plasmides symbiotiques de différentes espèces est surprenante du fait qu'ils portent des séquences d'ADN présentant une homologie importante. Le plasmide pRL1JI de **R. leguminosarum** marqué par le transposon Tn5 est également compatible avec les plasmides indigènes de certaines souches de **R. trifolii** (DJORDJEVIC et coll. 1982) et **R. phaseoli** (ZURKOWSKI 1981) : la nodulation est réduite dans le cas des transconjugants de **R. phaseoli**, mais elle est rétablie par élimination du pRL1JI. Pour les plasmides pRL1JI, pRL3JI et pRL4JI (production de bactériocine) et certains plasmides impliqués dans la nodulation de différentes souches de **R. leguminosarum**, BREWIN et coll. (1982) ont suggéré la classification suivante : sur la base que les plasmides impliqués dans la production de bactériocine ne peuvent coexister dans la même cellule en tant que réplicons séparés : pRL1JI, pRL3JI, pRL4JI et pRL6JI appartiennent à un même groupe d'incompatibilité. Les plasmides pRL5JI et pRL10JI (impliqués dans la nodulation) peuvent d'une part se maintenir d'une manière stable avec les plasmides cités ci-dessus et d'autre part, coexister également ensemble dans la même cellule, ils appartiennent à un deuxième et troisième groupe d'incompatibilité. Les plasmides (Nod) de **R. phaseoli** appartiendraient à un quatrième groupe.

Au cours de nos travaux (MAOUI et coll. 1985a), nous avons suggéré que le pSym de la souche 2011 de **R. meliloti** est incompatible avec le plasmide moyen du mutant M5N1m3SR de la même espèce, ce qui pourrait expliquer l'absence de tels plasmides dans certaines souches de **R. meliloti**. Contrairement à nos observations, la mobilisation des deux mégaplasmides de la souche 2011 au mutant ZB121 (Nod<sup>-</sup> Fix<sup>-</sup>) de **R. meliloti** n'entraîne pas l'élimination du plasmide moyen indigène (BANFALVI et coll. 1985).

Les mégaplasmides pRme41b et pRme41c sont compatibles, l'introduction de ces mégaplasmides dans des souches de **R. meliloti** entraîne la perte du plasmide homologue. Un fragment d'ADN portant des gènes probablement impliqués dans le phénomène "d'exclusion de surface" a été localisé sur le pRme41b. Ce fragment situé à 50 Kb des gènes nod montre une forte homologie avec un segment d'ADN du pRme41c (BANFALVI et coll. 1985).

#### 2.7.6 - Inhibition de la synthèse des exopolysaccharides

Cette fonction a été mise en évidence par BORTHAKUR et coll. (1985) : après clonage d'une région du plasmide indigène pRP2JI de **R. phaseoli** dans des vecteurs à large spécificité d'hôte et transfert de ces vecteurs à la souche d'origine et à d'autres souches de **Rhizobium**, ces auteurs ont pu déterminer le rôle de cette région dans l'inhibition de la synthèse des exopolysaccharides. Le gène responsable de cette fonction, appelé gène psi (pour polysaccharide inhibition), est localisé dans une région étroitement liée aux gènes symbiotiques (nod et nif). Le gène psi joue un rôle important dans la symbiose ; en effet, la nodulation est supprimée quand ce gène est transféré à une souche sauvage nodulante ; de plus, des mutants contenant le gène psi mutagénisé par le Tn5 (psi::Tn5) deviennent inefficients. Cependant la participation exacte de ce gène dans les fonctions symbiotiques demeure obscure. La fonction du gène psi serait de réprimer dans le bactéroïde l'expression des gènes tels que ceux impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides, qui sont normalement exprimés dans les **Rhizobium** à l'état libre.

#### 2.7.7 - Utilisation des opines

La production et l'utilisation des opines sont codées par des gènes localisés sur le plasmide Ti d'**A. tumefaciens** (MONTROYA et coll. 1977). Des substances analogues aux opines ont été détectées dans les nodules induits par

certaines souches de **Rhizobium** (TEMPE et coll. 1982). Les gènes codant pour le catabolisme de tels composés semblent être localisés sur le mégaplasmide de la souche L5-30 de **R. meliloti**. Certaines souches de **Rhizobium** sont capables d'utiliser les opines d'**Agrobacterium** et leurs dérivées : dans la souche 41 de **R. meliloti**, cette aptitude est codée par le pSym (KONDOROSI et coll. 1983b). Cependant, nous ignorons actuellement si le métabolisme des opines est impliqué directement dans la fixation symbiotique de l'azote.

### 2.7.8 - Autres caractères

Des expériences indiquant que les plasmides de **Rhizobium** codent pour des fonctions non symbiotiques telles que l'aptitude à induire la  $\beta$ -galacturonase (PALOMARES et coll. 1977) ont été décrites pour différentes souches de **Rhizobium**. Une corrélation entre la perte de la nodulation de **Rhizobium** et celle de l'aptitude à former des colonies muqueuses a été établie par SANDERS et coll. (1978). De même, PRAKASH et coll. (1980) ont isolé des mutants  $\text{nod}^-$  non muqueux de la souche LPR1705 de **R. leguminosarum**. Récemment HYNES et coll. (1986) ont montré que le second mégaplasmide de la souche 2011 code pour la production d'exopolysaccharides. Actuellement, les gènes vitaux, gènes intervenant dans les processus de métabolisme général, ont été localisés uniquement sur le chromosome bactérien (KONDOROSI et coll. 1977, CASADESUS et OLIVARES 1979). L'identification d'autres gènes localisés sur les plasmides et qui pourraient intervenir directement ou indirectement dans les fonctions symbiotiques ou l'adaptation aux conditions des sols, etc..., l'étude de leurs fonctions, leurs contrôles et leurs organisations pourraient nous aider à mieux comprendre la symbiose **Rhizobium**-légumineuses et à isoler des souches plus efficaces et mieux adaptées aux conditions de l'environnement.

## III. - LE GENOME DE LA FORME ENDOSYMBIOTIQUE

De nombreux auteurs ont observé les différences de contenu génétique entre les formes libres et endosymbiotiques de **Rhizobium**. BISSELING et coll. (1977), chez **R. meliloti**, **R. trifolii** et **R. phaseoli**, ainsi que REIJINDERS et coll. (1975) et PAAU et coll. (1977, 1979), chez **R. leguminosarum**, ont décrit que le contenu en ADN du bactéroïde était quantitativement égal ou supérieur à celui de la forme libre. Ces auteurs expliquent cette différence par l'amplification des gènes symbiotiques essentiels pour la fixation de l'azote ou par une accumulation de l'ADN due à l'apparition de bactéroïdes polyploïdes.

Cependant, BERGERSEN (1974) observe une diminution de l'ADN de *R. lupini*, dans des nodules âgés de 6 semaines. De même PAAU et coll. (1978) constatent le même phénomène chez le bactéroïde immature ou sénescant de *R. meliloti*.

Une diminution de la température de dénaturation et du GC% de l'ADN du bactéroïde de *R. japonicum* impliquant un changement de l'ADN cellulaire au cours de la transformation physiologique a été observée par AGARWAL et METHA (1974).

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

L'activité de la nitrogénase, mesurée par la réduction d'acétylène, peut augmenter de plus de 1 000 fois en 3 à 4 jours au cours de la maturation du bactéroïde. Une synthèse constitutive de la nitrogénase due à une transcription d'ARN synthétisés *de novo*, a été observée chez les bactéroïdes de *R. leguminosarum* par VAN DEN BOS et coll. (1983). Une forte expression des gènes *nif* a également été décrite, chez le bactéroïde de *R. leguminosarum* par rapport à la bactérie libre où ces gènes s'expriment peu ou pas du tout (KROL et coll. 1980 et 1982a) ; cependant aucune amplification de ces gènes n'a pu être décelée. Il s'agit donc vraisemblablement d'une augmentation de la traduction de ces gènes qui seraient essentiels pour l'association symbiotique.

Les modifications qui surviennent entre le passage de la forme libre à la forme symbiotique (bactéroïdes) ne sont pas encore expliquées. Il est cependant certain que le contact de la plante agit fortement sur l'expression du génome de son symbionte (ROSSEN et coll. 1985, EGELHOFF et LONG 1985, INNES et coll. 1985, VAN BRUSSEL et coll. 1986).

MATERIEL ET METHODES

## I. - SOUCHES ET CULTURES BACTERIENNES

Tous les repiquages sont effectués sous une hotte à flux laminaire.

### 1.1 - Souches bactériennes

Toutes les souches de *Rhizobium* utilisées dans cette étude sont Nod<sup>+</sup> et Fix<sup>+</sup> (tableau 6).

Le transconjugant 2011(RP4) a été sélectionné après conjugaison en utilisant la souche 2011m9b(RP4) comme bactérie donatrice.

### 1.2 - Cultures

- Les souches sont entretenues par repiquages réguliers en tube de gélose inclinée. Elles sont conservées à 30°C dans une étuve bactériologique.
- Les cultures en milieu liquide sont réalisées en milieu TY. Pour la préparation des plasmides, des fioles à toxine contenant 1 litre de milieu TY sont inoculées avec une culture sur gélose inclinée âgée de deux jours remise en suspension avec 10 ml d'eau stérile. La croissance est poursuivie de 18 h à 24 h à 30°C sur une table d'agitation rotative.

## II. - MILIEUX DE CULTURE

Tous les milieux de culture sont autoclavés à 120°C pendant 20 min avant ensemencement.

### 2.1 - Milieu TY [Tryptone Yeast, BERINGER (1974)]

La composition de ce milieu est ainsi définie :

Bacto-tryptone Difco .....	5	g
Extrait de levure Difco .....	3	g
CaCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O .....	1,3	g
Eau distillée qsp .....	1000	ml

Le pH est ajusté à 7.2, gélosé à 12 % avec de l'agar Difco, ce milieu sert au dénombrement des colonies bactériennes.



Souches	Origine	Isolement	Phénotype
2011	M. DENARIE ; Toulouse (France)	<b>Medicago sativa</b>	sauvage
M5S	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	<b>Medicago sativa</b> LILLE	sauvage
M5N1	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	<b>Medicago sativa</b> LILLE	mutant spontané non muqueux (M5S)
M3S	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	<b>Medicago sativa</b> LILLE	sauvage
M19S	Université des Sciences et Techniques de Lille, Laboratoire de Microbiologie	<b>Medicago sativa</b> LILLE	sauvage
2004	M. DYE ; Rothamsted Experimental Station (Grande-Bretagne)	non connu	sauvage
444	G. TRUCHET ; Marseille (France)	non connu	sauvage
Ls2a	M. OBATON ; Institut National de Recherches Agronomiques (France) (I.N.R.A.)	non connu	sauvage
L5-30	M. KOWALSKI ; (Pologne)	non connu	sauvage
U45	Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (C.S.I.R.O.)	<b>Medicago sativa</b> URUGUAY 1963	sauvage
Tu20	Station de Recherches de Microbiologie de Dijon	non connu	sauvage
AK630	M. KONDOROSI ; (Hongrie)	<b>Medicago sativa</b>	mutant spontané non muqueux (41)

Tableau 6 - Origine des souches utilisées

## 2.2 - Milieu RC [Rhizobium complet de LAIRD (1932) modifié par DELATTRE (1971)]

Composition :

$K_2HPO_4$ .....	1	g
$MgSO_4, 7H_2O$ .....	0,2	g
Extrait de levure Difco .....	1	g
Eau distillée qsp .....	1000	ml

Le pH est ajusté à 7.2. La source de carbone (glucose ou fructose) est additionnée à la concentration finale de 1 %. Ce milieu peut être gélosé par addition d'agar Difco à 12 % (RCG).

## 2.3 - Milieu R [Rhizobium DELATTRE (1971)]

Composition :

$K_2HPO_4$ .....	0,5	g
$NH_4NO_3$ .....	0,2	g
$MgSO_4, 7H_2O$ .....	0,2	g
Eau distillée qsp .....	1000	ml

Le milieu R est utilisé couramment pour les dilutions. Le milieu minimum de croissance est le milieu R auquel on ajoute les vitamines, thiamine et biotine, et une source de carbone, glucose ou fructose, à une concentration respective de  $5 \cdot 10^{-4}$  g/l,  $10^{-5}$  g/l et 10 g/l. Ces deux vitamines, quoique non indispensables chez *Rhizobium meliloti* accélèrent considérablement sa croissance.

## 2.4 - Gélose blanche

Utilisée pour les numérations sur boîtes. Agar Difco : 0.75 % dans l'eau bidistillée.

## 2.5 - Gélose bactériophage

Composition :

$Na_2HPO_4, 12H_2O$ .....	0,45	g
$Na_2SO_4, 10H_2O$ .....	0,06	g

KNO <sub>3</sub> .....	0,6	g
FeCl <sub>3</sub> .....	0,01	g
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O .....	0,1	g
Mannitol .....	10	g
Eau bidistillée qsp .....	1000	ml

## 2.6 - Milieu NT [NICOL et THORNTON (1941)]

La culture des plantules de luzerne se déroule sur le milieu de NICOL et THORNTON de composition suivante :

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5	g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0,2	g
NaCl .....	0,1	g
FePO <sub>4</sub> .....	1	g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	2	g
FeCl <sub>3</sub> .....	0,01	g
Eau distillée qsp .....	1000	ml

La gélose bactériophage ainsi que le milieu NT sont autoclavés pendant 30 min à 105°C.

## III. - BACTERIOPHAGES ET LYSOGENIE

Trois phages ( $\Phi$ 7,  $\Phi$ 11,  $\Phi$ 12) spécifiques de la souche M5N1 ont été sélectionnés pour l'identification des clones analysés au cours de cette étude.

### 3.1 - Induction du prophage

Les bactéries lysogènes telle que la souche M5N1 peuvent libérer spontanément leur prophage. Ce phénomène peut être accentué par l'action d'agents physiques ou chimiques appelés inducteurs. Pour nos expériences, nous avons utilisé les rayons ultraviolets (U.V.), à une dose de 80 ergs/mm<sup>2</sup>.s pendant 6 sec.

10 ml d'une culture bactérienne de D.O. 0.2 sont irradiés par une lampe germicide à U.V. de type "Mazda" TG15 d'une puissance de 15 watts. La culture est ensuite incubée à 30°C pendant 15 heures, à l'obscurité pour éviter le phénomène de photoréactivation.

Après une centrifugation de 12 000 g pendant 15 min, le surnageant est filtré sur membrane Millipore de porosité 0.22  $\mu\text{m}$ . Les bactériophages produits sont détectés selon la technique du "spot", qui consiste à déposer une goutte de surnageant de chaque souche traitée sur le tapis bactérien de la souche indicatrice (M3S). Après une incubation à 28°C, pendant environ 15 heures, les boîtes sont examinées. La présence de phage dans un surnageant donné se traduit par l'apparition d'une zone de lyse claire sur le tapis bactérien sensible.

### **3.2 - Dénombrement des particules phagiques infectieuses**

La technique retenue est celle décrite par ADAMS (1959). La suspension phagique à doser est soumise à une série de dilutions allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-9}$ . 0.1 ml de ces dilutions sont mélangés à 0.3 ml de culture bactérienne sensible en phase exponentielle de croissance. Après 20 min à température ambiante, on ajoute 3 ml de gélose bactériophage fondue et maintenue à 50°C. L'ensemble est ensuite étalé sur milieu TY gélosé, puis incubé à 28°C pendant environ 15 h. Les bactéries en se multipliant, forment un tapis. Une bactérie infectée, après lyse, libère des phages qui vont à leur tour infecter les bactéries voisines et ainsi de suite. Il se forme alors une plage de lyse, visible à l'oeil nu.

Un phage est à l'origine d'une plage de lyse. On peut donc déterminer facilement le titre de la suspension phagique initiale en multipliant le nombre de plages de lyse par le facteur de dilution. Ce titre est ramené en nombre de particules phagiques infectieuses par ml, encore appelées "unité formant plage" (ufp).

## **IV. - CROISSANCE BACTERIENNE**

### **4.1 - Numération des cellules viables**

On réalise pour les suspensions bactériennes à numérer une série de dilutions dans le milieu R jusque  $10^{-6}$ . On prélève 0.1 ml de dilution que l'on mélange à 4 ml de gélose blanche préalablement fondue et maintenue à 50°C. L'ensemble est étalé sur milieu solide (méthode de la double couche).

Après solidification, les boîtes sont incubées à 30°C ; la lecture se fait après 3 à 5 jours d'incubation.

## 4.2 - Détermination du temps de génération

Afin de déterminer le temps de génération de la souche étudiée, nous avons établie la courbe de croissance en suivant la densité optique des cultures au moyen d'un biophotomètre. L'incubation est réalisée à 30°C. Le temps de génération en phase exponentielle est calculé suivant les formules :

$$K = \frac{\log_N (\text{DO}_f) - \log_N (\text{DO}_i)}{T \text{ (heure)}}$$

$$\mu = \frac{K}{\log_N 2 = 0,692}$$

$$g(H) = \frac{1}{\mu}$$

$$\log_N 2 = 0,692$$

$$g(H) = \frac{1}{\mu}$$

$$g(H) = \frac{1}{\mu}$$

où  $\log_N (\text{DO}_f)$  : logarithme de la densité optique finale en phase exponentielle

$\log_N (\text{DO}_i)$  : logarithme de la densité optique initiale en phase exponentielle

T : le temps en heure

K : taux de croissance Népérien

$\mu$  : taux de croissance numérique : nombre de divisions par unité de temps (par heure)

g : temps de génération

## V. - MUTAGENESE

La N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG), Fluka A.G. Buchs S.G., est conservée à - 20°C à l'obscurité.

### 5.1 - Mode opératoire

L'agent mutagène : la NTG, est dissoute dans le tampon Tris-maléique (Tris 90 mM - acide maléique 50 mM, pH 6,65) sous agitation à 37°C pendant 30 min. Puis à 10 ml d'une culture bactérienne, en phase exponentielle de croissance, préalablement centrifugée, lavée et reprise dans le tampon Tris-maléique, on ajoute la NTG à une concentration finale de 300 µg/ml. L'ensemble est incubé à 30°C pendant 30 min. Après action de l'agent mutagène, les bactéries sont lavées et reprises dans le milieu minimum additionné de pénicilline G (3 000 unités/ml) et de saccharose (25 g/100 ml). Après incubation 15 h à 30°C, les bactéries sont centrifugées pour éliminer la pénicilline. Le culot est ensuite repris dans le milieu minimum et étalé sur milieu riche (RCG additionné de glucose à 1 %) afin d'effectuer des répliques.

### 5.2 - Technique des répliques sur velours pour la détection des mutants auxotrophes

Les boîtes étalées sur milieu riche sont incubées à 30°C jusqu'à ce que les colonies apparues atteignent environ 1 mm de diamètre ; on procède alors aux répliques par la méthode de LEDERBERG (1952). On fixe un morceau de velours stérile sur un bloc à répliques (cylindre en métal) grâce à un collier à vis. On applique sur ce velours la boîte avec les colonies de 1 mm de diamètre afin que chaque colonie laisse une empreinte sur le velours. Puis on applique une boîte de milieu minimum glucosé, puis une boîte de milieu riche. La boîte 1 sert à l'identification des mutants exigeants en un élément se trouvant dans le milieu riche : acide aminé, base nucléique, source d'azote organique, etc... La boîte 2, contenant le milieu riche sert de contrôle. Les colonies se développant sur la boîte-mère et sur la deuxième boîte et non sur la première boîte sont présumées mutants auxotrophes. Leurs exigences sont déterminées par la méthode de HOLLIDAY (1956).

## VI. - TEST DE NODULATION, EFFICIENCE, ISOLEMENT DES BACTERIES A PARTIR DE NODULES

Le principal intérêt des bactéries du genre *Rhizobium* réside dans les propriétés qu'ils manifestent en présence des légumineuses, c'est-à-dire leur pouvoir de nodulation et celui de fixation d'azote.

## **6.1 - Test d'infectivité**

Le principe du test consiste à mettre une légumineuse cultivée aseptiquement en présence de la souche à étudier et d'observer la formation de nodules. La stérilisation des graines de luzerne est réalisée par le chlorure mercurique à 0.25 % additionné d'une goutte de détergent, sous agitation pendant 10 min. Les graines sont ensuite rincées une dizaine de fois à l'eau distillée stérile, puis, déposées sur milieu RCG glucosé et placées à 30°C. La germination s'effectue au bout de 2 à 4 jours. Les plantules sont alors cultivées en tube stérile dans 15 à 18 ml d'une solution de NICOL et THORNTON (1941). Dès que les racines secondaires apparaissent, on inocule chaque tube par environ  $10^6$  bactéries provenant d'une culture bactérienne auparavant centrifugée et lavée deux fois par du milieu de NICOL et THORNTON (1941). L'efficacité est déterminée selon la technique de HARDY (1968) qui consiste à mesurer la réduction de l'acétylène en éthylène (MAOUI 1980).

## **6.2 - Isolement des bactéries à partir de nodules**

Les nodules sont prélevés à partir de la racine, mis à tremper 1 min dans le mélange éthanol 95 % - eau oxygénée, puis lavés une dizaine de fois à l'eau distillée stérile. Ils sont ensuite déposés stérilement dans une boîte de milieu RCG glucosé. La boîte est incubée à 30°C pendant 48 heures afin de contrôler la stérilité de la surface des nodules. Le nodule est ensuite introduit dans un tube contenant 2 ml d'une solution stérile de saccharose 20 %, écrasé à l'aide de l'extrémité d'un agitateur stérile. On procède à une série de dilutions et on étale 0.1 ml de la dilution  $10^{-4}$  sur milieu RCG glucosé. Les clones apparus sont purifiés et leurs caractères sont analysés par la méthode des répliques (LEDERBERG 1952).

## **VII. - EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ADN BACTERIEN**

### **7.1 - Extraction et purification de l'ADN plasmidique**

La méthode employée est celle décrite par JOUANIN et coll. (1981) et dérive de la technique de lyse alcaline de CURRIER et NESTER (1976).

### 7.1.1 - Principe

La méthode utilise la différence de sensibilité à la dénaturation des ADN plasmidiques et chromosomiques. Pour cela, après lyse des bactéries par l'action simultanée d'un détergent (SDS) et d'une enzyme protéolytique (pronase), la solution est alcalinisée : le pH est tel que l'ADN chromosomique est totalement dénaturé, alors que l'ADN plasmidique, protégé par sa structure superenroulée, ne l'est que partiellement : à la neutralisation la majeure partie de cet ADN plasmidique se renature en restant en solution, alors que l'ADN chromosomique se renature en formant des réseaux de très haute masse moléculaire qui précipitent avec les protéines en présence d'une forte concentration en NaCl. Après l'élimination de la majorité de l'ADN chromosomique et des protéines par centrifugation, l'ADN plasmidique est précipité par addition de PEG (HUMPHREYS et coll. 1975), puis purifié par un gradient de CsCl-Bet.

### 7.1.2 - Protocole

Les bactéries sont récoltées en début de phase stationnaire par centrifugation (4 000 g, 30 min, 4°C), puis lavées avec du tampon TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA<sub>Na</sub><sub>2</sub> 20 mM, pH 8) et centrifugées à nouveau (40 000 g, 10 min, 4°C). Le culot bactérien peut être conservé, congelé à - 20°C ou employé immédiatement. Les bactéries (1.5 g) sont alors remises en suspension dans 85 ml de tampon TE et homogénéisées par passage au Potter, puis lysées par addition de 5 ml de SDS à 20 % et 10 ml de Pronase à 5 mg/ml [Pronase E (Serva), autopurifiée dans le TE, 90 min à 37°C, cette autopurification a pour but d'éliminer les éventuelles nucléases contaminantes]. Le lysat donne une solution claire et très visqueuse après incubation 20 min à 37°C.

Après refroidissement à température ambiante, le lysat est amené à pH  $12.45 \pm 0.05$  en ajoutant goutte à goutte de la soude 3N (solution fraîche), et en agitant doucement avec une spatule (l'électrode est auparavant étalonnée à pH 12.45 avec du tampon référence Beckman). Lorsque ce pH est atteint le lysat est laissé 10 min à température ambiante puis neutralisé par 20 ml de tampon Tris-HCl 2M pH 7. Du chlorure de sodium qsp 1M est ensuite ajouté et l'ensemble incubé à 0°C au minimum 1 heure. Les protéines et l'ADN chromosomique sont alors éliminés en grande partie par centrifugation (10 min, 27 000 g, 4°C). L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est alors précipité par addition d'une solution à 50 % (P/V) de



PEG6000 en qsp 10 % final. La précipitation est poursuivie à 4°C pendant une nuit. Une centrifugation à basse vitesse (650 g, 20 min, 4°C) permet de récupérer l'ADN sous la forme d'un culot. Ce dernier est dissous dans 5 ml de tampon TE.

A ce stade, une électrophorèse en tampon Tris-Borate sur une fraction aliquote (100 µl) permet de vérifier la présence de l'ADN plasmidique.

L'ADN superenroulé est séparé de l'ADN linéaire contaminant (ADN chromosomique et ADN plasmidique cassé) par ultracentrifugation à l'équilibre en gradient de densité de chlorure de césium-bromure d'éthidium. La solution d'acides nucléiques est additionnée de 0.3 ml de sarkosyl à 5 % (P/V), 9.6 g de CsCl, et du tampon TE qsp 11.7 ml. Cette solution est centrifugée (40 000 g, 20 min, 4°C) afin d'éliminer la plus grande partie de l'ARN qui sédimente sous forme d'un culot ainsi que les résidus protéiques qui forment une pellicule en surface. On ajoute alors 0.3 ml d'une solution de Bet (10 mg/ml dans le tampon TE) en prenant soin de conserver le tube à l'obscurité (le complexe ADN-Bet étant photosensible). Après 48 heures de centrifugation (BECKMAN L265B, rotor 50 Ti, 140 000 g, 20°C), les tubes sont examinés sous lumière ultraviolette (360 nm). Deux bandes fluorescentes en orange :

- la bande supérieure est constituée d'ADN ayant davantage fixé le Bet : il s'agit de l'ADN sous forme linéaire ;
- la bande inférieure est constituée d'ADN moins accessible au Bet car de conformation superenroulée, caractéristique de l'ADN plasmidique.

On prélève tout d'abord la bande d'ADN linéaire par le haut du tube à l'aide d'une pipette Pasteur. On procède ensuite de même pour recueillir l'ADN plasmidique en ayant soin d'utiliser une pipette Pasteur à large ouverture pour préserver au maximum la structure CCC. A ce stade, une légère contamination de l'ADN CCC par l'ADN linéaire est toujours possible. Pour la préparation d'une sonde radioactive, l'ADN plasmidique est récupéré par perforation du tube sur le côté latéral à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille. Une deuxième ultra-centrifugation permet d'éliminer toute trace d'ADN linéaire contaminant.

A la fraction d'ADN plasmidique prélevée du gradient est ajouté un volume de butanol saturé en CsCl. Le Bet, très soluble dans le butanol, passe en totalité dans la phase alcoolique ; la phase aqueuse est récupérée, complétée à 12 ml avec du tampon TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA Na<sub>2</sub> 0.5 mM, pH 8) et centrifugée

(BECKMAN L265B, rotor 50 Ti, 150 000 g, 16 h, 20°C). L'ADN sédimente sous forme d'un culot. Cette méthode présente le double avantage d'éliminer le CsCl en solution dans le surnageant et de permettre la concentration de l'ADN. La quantité d'ADN plasmidique obtenue est déterminée par mesure de la D.O. à 260 nm.

## **7.2 - Extraction et purification de l'ADN total (chromosome + plasmides)**

La méthode employée est celle décrite par BERNS et THOMAS (1965) légèrement modifiée par MIELENZ et coll. (1979).

10 ml d'une culture bactérienne en phase stationnaire sont récoltées par centrifugation. Les cellules sont lavées deux fois avec du tampon SSC (NaCl 150 mM, citrate trisodique 15 mM, pH 7) et conservées à - 20°C. Pour isoler l'ADN total, les cellules sont remises en suspension dans du tampon SSC à raison de 1 ml par 0.1 g de bactéries (poids humide). A cette suspension cellulaire, on ajoute de la protéinase K à raison de 1 mg/ml puis du SDS à une concentration finale de 1 %. Le mélange est agité doucement et incubé 2 heures à 37°C. Au lysat ainsi obtenu on ajoute un volume de phénol saturé avec du tampon STE (NaCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTANa<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.4) et on agite jusqu'à homogénéisation des deux solutions. Pour parfaire la déprotéinisation, le traitement est répété deux fois. La phase phénolique est éliminée par deux traitements à l'éther. L'ADN ainsi purifié, contenu dans la phase aqueuse, est précipité par deux volumes d'éthanol froid en présence d'acétate de sodium (concentration finale 0,2 M) puis enroulé autour de l'extrémité d'une pipette Pasteur. L'ADN séché quelques minutes à température ambiante est remis en suspension dans 1 ml de tampon SSC puis dialysé contre du SSC 0.1X pendant 24 h (avec 3 changements de bain). La concentration de l'ADN est calculée par mesure de la D.O. à 260 nm.

## **VIII. - ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE**

### **8.1 - Principe**

L'électrophorèse en gel d'agarose est actuellement la méthode la plus utilisée pour la séparation, l'identification et la purification de molécules (ou fragments) d'ADN. Celles-ci, étant chargées négativement (groupement phosphate), migrent vers l'anode lorsqu'elles sont placées dans un gel traversé par un champ électrique, à une vitesse qui dépend de leur masse moléculaire et de leur encombrement stérique.

Les molécules d'ADN traversent un gel d'agarose à une vitesse qui est inversement proportionnelle au logarithme décimal de leur masse moléculaire. On établit expérimentalement la relation suivante :

$$\log MM = A \log MR + B$$

ou MM = Masse Moléculaire d'une molécule  
 MR = Mobilité Relative mesurée sur le gel  
 A et B = constantes caractéristiques de l'électrophorèse, déterminées grâce à des molécules d'ADN témoin dont les masses moléculaires sont connues. Les molécules témoins doivent avoir la même configuration spatiale que les molécules dont on veut calculer les masses moléculaires.

Les molécules d'ADN plasmidique peuvent se présenter sous trois formes différentes : une forme superhélicoïdale et les formes circulaire ouverte et linéaire qui dérivent toutes deux de la forme superhélicoïdale par cassure(s) d'un ou des deux brins de l'ADN. Une préparation d'ADN plasmidique est généralement constituée d'un mélange de ces trois formes qui, bien qu'ayant la même masse moléculaire, n'ont pas les mêmes vitesses de migration dans le gel d'agarose en raison de leurs encombrements stériques différents. Les molécules présentant à la fois la même masse moléculaire et la même configuration spatiale migrent à la même vitesse et forment une bande dans le gel qui peut être visualisée grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium. Ce colorant intercalant qui présente une forte affinité pour les acides nucléiques (ADN ou ARN) émet une radiation rouge-orangée (590 nm - spectre visible) lorsqu'il est irradié en U.V. (260 nm).

Ainsi, il est possible de déterminer, grâce à un témoin de poids moléculaire connu (fragments obtenus par digestion de l'ADN du phage  $\lambda$  par EcoRI-BamHI par exemple), le poids moléculaire des fragments de restriction d'un ADN quelconque et d'en déduire celui de l'ADN entier.

## **8.2 - Lyse directe sur le gel**

La méthode employée [technique d'ECKHARDT (1978) modifiée par SIMON] permet la visualisation rapide par électrophorèse du contenu plasmidique de souches de **Rhizobium**. Appliquée à un faible nombre de bactéries, elle permet de mettre en évidence, grâce à la lyse directe des bactéries dans l'alvéole du gel d'agarose, les mégaplasmides de **Rhizobium meliloti**. Ces plasmides de grande taille étaient, dans les méthodes précédentes, éliminés du fait des contraintes physiques trop importantes.

### 8.2.1 -Principe

Le traitement des bactéries au lysozyme qui produit des sphéroplastes, a lieu dans l'alvéole du gel (les cellules de **Rhizobium** étant préalablement sensibilisées à l'action du lysozyme par un traitement au sarkosyl 0.1 %, SCWHINGHAMER 1980). La suspension de sphéroplastes est lysée par un détergent, le SDS, qui migre lentement au travers de celle-ci, grâce à un faible champ électrique. Dès que les membranes sont complètement dissoutes, un champ électrique plus important fait pénétrer et migrer les molécules plasmidiques dans le gel. L'ADN n'étant pas manipulé au cours de l'expérience, les contraintes physiques sont réduites au minimum.

### 8.2.2 -Protocole

Les électrophorèses sont réalisées verticalement (l/L/e : 14 cm - 16 cm - 0.3 cm - Biorad Protean Cell). L'agarose (Sigma, grade 1 - IBF indubiose A37NA) est dissoute à chaud dans le tampon d'électrophorèse TBE (Tris 89 mM, EDTANa<sub>2</sub> 2.5 mM, Borate 89 mM, pH 8.3, préparé et stocké à température ambiante, 12 fois concentré). Ce tampon d'électrophorèse permet d'obtenir un champ électrique élevé (jusqu'à 10 volts/cm) sans provoquer d'échauffement excessif ou l'effondrement du gel. Les gels sont néanmoins réfrigérés pendant la durée de l'électrophorèse.

Les souches de **R. meliloti** sont cultivées dans le milieu TY jusqu'en début de phase exponentielle de croissance (D.O. 0.3 à 0.5 à 600 nm). On prélève l'équivalent de 0.5 ml de culture à D.O. 0.3 que l'on verse dans des tubes "Eppendorf" de capacité 1.5 ml et auquel on ajoute un volume de tampon TE (Tris 50 mM, EDTANa<sub>2</sub> 20 mM, pH 8) contenant 0.1 % de sarkosyl. Après quelques inversions le tube est placé dans la glace puis centrifugé 4 min à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire repris dans 60 µl de tampon d'électrophorèse TBE contenant 25 % de saccharose, 1 unité/ml de RNaseA et additionné de lysozyme à 1 mg/ml au moment de la manipulation. La suspension est brièvement homogénéisée et immédiatement déposée dans une alvéole d'un gel d'agarose dont la concentration varie de 0.5 à 0.8 % selon le type d'expérience envisagée. On ajoute ensuite, dans chaque alvéole, 90 µl de tampon d'électrophorèse contenant 1 % de SDS, 0.4 % d'agarose et 0.05 % de bleu de bromophénol (témoin de migration). L'ensemble est soumis à une différence de potentiel de 30 volts (15 mA) pendant une heure durant laquelle s'effectue la lyse cellulaire, puis à une différence

de potentiel de 130 volts pendant approximativement trois heures (colorant témoin en bas de gel). Après électrophorèse le gel est plongé dans un bain de Bet à 1 µg/ml puis placé à l'obscurité pendant 30 min. Le gel est ensuite déposé sur un transilluminateur U.V. Products C63 et est soumis à une longueur d'onde de 302 nm afin de visualiser le complexe DNA colorant.

### **8.3 - Electrophorèse en gel analytique**

Les électrophorèses sont réalisées horizontalement (l/l/e : 10 cm - 21 cm - 0.8 cm - Biorad electrophoresis cell 1415). Le tampon utilisé est le Tris-Borate (TBE, décrit précédemment). Les conditions de migration sont les suivantes : 3 à 4 heures à 5 volts/cm. Le Bet à 1 µg/ml final est ajouté dans l'agarose fondue avant de couler le gel. Ce type d'électrophorèse est utilisé essentiellement pour la mise en évidence des fragments engendrés par hydrolyse avec les enzymes de restriction. La concentration du gel varie de 0.7 à 1.5 % selon la taille des fragments à séparer.

### **8.4 - Electrophorèse en gel préparatif**

Tampon d'électrophorèse : Tris-Acétate (TAE) : Tris-Acétate 40 mM, EDTANa<sub>2</sub> 2 mM, pH 8. Ce type d'électrophorèse est employé pour la préparation de fragments d'ADN utilisés pour la fabrication des sondes. Nous avons utilisé pour réaliser notre expérience, une concentration en agarose de 0.6 %. L'électrophorèse est conduite sous une tension constante de 2 à 3 volts/cm pendant 12 à 16 heures. La migration est suivie aux U.V. (360 nm) et, quand elle est suffisante, une "fenêtre" est découpée dans l'agarose sous la bande désirée et on y coule un gel d'agarose (Bio-Rad) à 0.3 % (P/V). L'électrophorèse est reprise dans les mêmes conditions que précédemment et quand toute la bande d'ADN a pénétré dans le gel à 0.3 %, elle est découpée, placée dans un tube avec de l'EDTANa<sub>2</sub> 20 mM final (pH 7.4) et congelée pendant une heure à -70°C, puis décongelée à 37°C. Ce cycle de gel/dégel est répété trois fois et a pour effet de casser le réseau d'agarose et de libérer l'ADN dans le surnageant. Celui-ci est ensuite filtré dans une seringue sur laquelle est adaptée un filtre millipore de 0.45 µ de diamètre. L'ADN est ensuite purifié sur "elutip" : DEAE cellulose (SCHLEICHER et SCHULL), dont le principe est le suivant : à basse force ionique l'ADN se fixe sur l'élutip alors qu'à haute force ionique il est élué. L'échantillon est percolé au travers de la colonne "elutip". Ensuite, la colonne est lavée avec 3 ml de tampon de charge (Tris-HCl 20 mM, pH 7.4 ; EDTANa<sub>2</sub> 10 mM ; NaCl 200 mM). L'éluion s'effectue avec 500 µl de tampon d'éluion (Tris-HCl 20 mM, pH 7.4 ; EDTANa<sub>2</sub> 10 mM ; NaCl 1 M).

Après "elutip", l'ADN est précipité à l'éthanol à - 20°C pendant 24 heures : l'ADN est ensuite centrifugé à 10 000 tours/min pendant 10 min. Le culot d'ADN est séché, repris dans 100 µl d'eau bidistillée et microdialysé sur membrane de microdialyse (Millipore).

La quantité d'ADN récupérée est évaluée par comparaison avec une gamme étalon, sur un gel d'agarose coulé dans une boîte de Pétri : 3 ml d'agarose à 1 % contenant 5 µg/ml de Bet. 2 µl des dilutions d'une gamme étalon de 4 à 100 µg/ml d'ADN sont déposés sur le gel et également 2 µl de l'échantillon à évaluer ; 10 min plus tard la boîte de Pétri est photographiée sous U.V. 302 nm et l'évaluation est faite suivant la brillance de l'échantillon par rapport à la gamme étalon.

## IX. - DIGESTION D'ADN PAR LES ENZYMES DE RESTRICTION

### 9.1 - Généralités

Les endonucléases de restriction utilisées sont commercialisées par Boehringer et sont conservées à - 20°C.

Chaque enzyme nécessite des conditions de réaction particulières, les variables les plus importantes étant la température d'incubation et la composition du tampon de réaction ; celles-ci sont spécifiées par le fabricant.

Des températures élevées (10 min à 65°C ; 5 min à 70°C) inactivent les endonucléases (certaines sont résistantes à 65°C). De même, des concentrations supérieures à 10 % en glycérol (les enzymes sont conservées dans un tampon contenant 50 % de glycérol) ou plus de 10 mM d'EDTA inhibent la réaction enzymatique (l'EDTA chélate les ions  $Mg^{++}$  qui sont indispensables à la réaction). Ces propriétés sont utilisées pour interrompre les réactions.

Lorsque le volume final de la réaction est trop important et ne peut être introduit totalement dans les alvéoles du gel d'agarose, après avoir arrêté la réaction, on pratique une précipitation de l'ADN que l'on reprend dans un volume au plus égal à celui de l'alvéole ou bien l'échantillon est soumis à une évaporation sous vide ce qui réduit le volume initial.

## 9.2 - Hydrolyse

L'ADN à hydrolyser est mélangé dans le tampon de digestion préconisé par le fabricant, puis incubé à 37°C en présence de l'enzyme à raison de 2 à 5 unités par µg d'ADN pendant 2 heures. La réaction est ensuite arrêtée par addition de 0.2 volume de tampon d'arrêt (tampon d'arrêt 5X : glycérol 50 % ; EDTANa<sub>2</sub> 100 mM, pH 7.4 ; bleu de bromophénol 0.1 %). L'échantillon d'ADN à analyser est ainsi alourdi par le tampon d'arrêt et peut être directement déposé dans l'un des puits du gel d'agarose.

## 9.3 - Calcul de la masse moléculaire des fragments de restriction

Après hydrolyse, les fragments de restriction d'une molécule donnée ainsi qu'un témoin de migration contenant des fragments de masses moléculaires connues sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose en tampon TBE. Le témoin permet d'établir une courbe d'étalonnage du gel :  $\log MM = f(d)$ ,  $d$  étant la distance parcourue dans le gel. L'estimation de la masse moléculaire des fragments se fait donc directement sur la courbe.

# X. - HYBRIDATION MOLECULAIRE

## 10.1 - Transfert et fixation de l'ADN sur nitrocellulose (Technique de SOUTHERN-BLOT, 1975)

Après électrophorèse, le gel d'agarose contenant l'ADN que l'on désire transférer est photographié avec une règle graduée apposée le long de l'un des côtés. Pour faciliter le transfert des mégaplasmides et des grands fragments d'ADN, il est nécessaire d'y introduire des coupures préalablement. Ceci est réalisé en soumettant le gel à l'action des U.V. pendant au moins 15 min (HEPBURN et HINDLEY 1979). Le gel est ensuite agité doucement dans un bain de dénaturation (NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M) pendant 1 heure pour mettre l'ADN sous forme simple brin ce qui facilite sa fixation sur nitrocellulose et permet l'hybridation avec les sondes. Le gel est ensuite neutralisé par deux bains d'une heure chacun de tampon de neutralisation (Tris-HCl 0.5 M pH 7, NaCl 1.5 M) (la nitrocellulose étant sensible au pH alcalin). Le transfert s'effectue ensuite de la manière suivante : sur une cuve remplie de tampon de transfert (SSC 6X : NaCl 0.9 M, citrate trisodique 0.09 M, pH 7.2), une plaque de verre sert de support au dispositif. 2 bandes superposées de papier Whatman 3 M, coupées à la largeur du gel, sont saturées en tampon et déposées sur la plaque de

façon à ce que les 2 extrémités des bandes trempent dans le tampon. Le gel est déposé sur ces bandes, arrosé de tampon et recouvert d'une feuille de nitrocellulose ; il faut éviter à ce stade toute bulle d'air entre le gel et le papier pour éviter un mauvais transfert. On évite le contact entre la nitrocellulose et le papier 3 M en plaçant tout autour du gel une bande de papier aluminium. La nitrocellulose est ensuite recouverte d'une feuille de papier Whatman 1 M saturée en tampon de transfert et l'ensemble est surmonté d'un bloc de papier filtre qui, en pompant le tampon à travers le gel, crée un flux de liquide qui transfère les fragments d'ADN sur la nitrocellulose.

Après 10 à 20 heures de transfert, la fixation covalente de l'ADN sur la nitrocellulose est obtenue par cuisson de celle-ci, à 80°C pendant 2 h.

### **10.2 - Préparation de sondes d'ADN**

Le milieu réactionnel utilisé est celui d'un kit commercial préparé par les laboratoires BRL (Bethesda Research Laboratories). Le précurseur radioactif est du dATP marqué au <sup>35</sup>S fourni par NEN (New England Nuclear) (activité spécifique : 1186 Ci/mmmole).

0.3 µg d'ADN sont incubés 1 h à 15°C en présence du précurseur radioactif, des trois autres désoxyribonucléotides froids (dCTP, dGTP, dTTP) et des deux enzymes nécessaires à la réaction : la DNA polymérase I et la DNaseI, dans des conditions décrites par le fournisseur.

La cinétique de la réaction est suivie par précipitation d'un aliquote à l'acide perchlorique : 1 µl du mix réactionnel est prélevé et placé dans un tube contenant 200 µl de DNA entraîneur à 400 µg/ml. On ajoute un volume d'acide trichloracétique à 20 %, l'ensemble est laissé 10 min dans la glace puis filtré et compté. Lorsque l'incorporation est maximale, après environ 1 h d'incubation à 15°C, la réaction est stoppée par addition de 1 ml de tampon STE (Tris-HCl 10 mM pH 7.1, NaCl 100 mM, EDTANa<sub>2</sub> 1 mM) additionné de protéinase K à 200 µg/ml, pendant 10 min. L'ADN marqué est alors séparé des nucléotides radioactifs libres par "elutip" (technique décrite précédemment). La sonde ainsi obtenue est dénaturée par addition de NaOH 0.6 N finale pendant 30 min à température ambiante. La neutralisation est réalisée par addition d'HCl 0.6 N et de 2.5 ml d'H<sub>2</sub>O. La sonde est comptée dans les conditions décrites plus haut et conservée à - 20°C.



### 10.3 - Hybridation des blots

Une étape de préhybridation est nécessaire pour saturer les sites de fixations des supports avant l'hybridation et éviter ainsi la fixation aspécifique de la sonde.

Tampon d'hybridation : formamide 50 %, polyvinylpyrrolidone 0.02 %, sérum albumine bovine 0.02 %, ficoll 400 0.02 %, hepes 0.05 M pH 6.8, SSC 2X, 100 µg/ml d'ADN de thymus de veau simple brin préparé en dissolvant de l'ADN (Sigma) dans de l'eau distillée, et en le dénaturant, après sonication, par chauffage à 100°C pendant 10 min.

Les "blots" sont placés dans des sachets en plastique et préhybridés dans du tampon d'hybridation à 41°C pendant 12 h. La sonde est ajoutée à raison de 0.05 µg d'ADN par "blot" et la réaction d'hybridation s'effectue à 41°C pendant 24 à 48 h.

### 10.4 - Lavage des "blots" et autoradiographie

Après hybridation des "blots", le tampon contenant la sonde est enlevé et conservé à - 20°C pour une réutilisation éventuelle. Les "blots" sont ensuite lavés deux fois à 50°C par une solution de :

- premier lavage : SSC 2X, SDS 0.1 % et deux fois par une solution de
- second lavage : SSC 0.1X, SDS 0.1 %, chacun des bains durant 10 min. Les "blots" sont ensuite séchés, enveloppés dans du "scello-frais" et mis en contact d'un film Kodak X-AmatA1L. L'ensemble est placé à - 70°C pendant un temps variant entre 24 h à 3 semaines puis les films sont révélés.

## XI. - ETUDE DES PROTEINES SOLUBLES PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMDE - SDS -

Les protéines solubles sont préparées selon la méthode de KERSTERS et DE LEY (1975). La culture bactérienne, en début de phase stationnaire, est centrifugée à 10 000 g pendant 10 min afin d'obtenir un culot. Les cellules sont lavées une première fois dans du tampon phosphate 0.01 M pH 7 puis dans du tampon Tris-HCl 3 mM pH 7, elles sont reprises dans le tampon Tris-HCl. Après sonication, les bactéries non lysées et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 15 000 g pendant

15 min à 4°C. Le surnageant est ensuite centrifugé à 80 000 g pendant 5 h à 4°C (rotor SW50.1). Le surnageant obtenu contient les protéines solubles, il peut être conservé à - 20°C.

La concentration des protéines dans le surnageant est déterminée selon la méthode de LOWRY et coll. (1951). L'électrophorèse, la coloration du gel ainsi que les photographies sont réalisées dans les mêmes conditions décrites par LAEMMLI (1970).

CHAPITRE I

ISOLEMENT DE MUTANTS INEFFICIENTS ET  
TRANSFERT GENETIQUE DE L'EFFICIENCE

PAR CONJUGAISON

L'un des moyens d'approche pour étudier les gènes de **Rhizobium** impliqués dans la symbiose est l'isolement, par mutagenèse, de mutants symbiotiquement défectueux. Le fait que les propriétés symbiotiques ne s'expriment que dans le micro-environnement du nodule rend l'approche du problème très ardue, puisque l'isolement des mutants va nécessiter, comme unique moyen de sélection, le passage sur plantes d'un nombre important de clones. Une approche indirecte du problème de la localisation des gènes responsables de la symbiose a été rendue possible grâce à l'obtention, par un agent mutagène chimique, de mutants auxotrophes inefficients.

Dans la littérature concernant l'association **Rhizobium**-légumineuses, certains auteurs ont remarqué en effet que l'exigence en bases nucléiques (DENARIE 1969) ou la résistance à certains antibiotiques (SCHWINGHAMER 1967, HENDRY et JORDAN 1969, ABDEL-WAHAB et coll. 1976, DENARIE et coll. 1976) pouvaient constituer des critères de sélection de mutants inefficients. Ainsi, DENARIE (1969), par action de la nitrosoguanidine, obtient une mutation provoquant l'auxotrophie pour l'adénine et la perte du pouvoir fixateur d'azote chez **Rhizobium meliloti**. C'est pourquoi nous avons entrepris d'isoler par mutation des auxotrophes et d'étudier l'effet de ces mutations sur les propriétés symbiotiques.

Le test de la réduction de l'acétylène en éthylène (HARDY et coll. 1968, SCHWINGHAMER et coll. 1970) est utilisé dans l'évaluation de l'efficacité des mutants isolés. Ce test a contribué largement aux progrès scientifiques concernant la fixation de l'azote biologique. Grâce à sa spécificité, il permet la mise en évidence de l'action enzymatique de la nitrogénase qui est une protéine d'origine bactérienne codée par les gènes *nif*. Contrairement aux bactéries fixatrices libres de l'azote, telles que **Klebsiella pneumoniae** et **Azotobacter vinelandii**, il n'a pas été possible d'isoler chez **Rhizobium** des mutants  $Nif^-$ , sélectionnés par l'incapacité de se développer sur milieu gélosé dépourvu de source d'azote, même pour les quelques souches de **Rhizobium** fixatrices libres (KEISTER 1975, KANESHIRO et coll. 1978, LORKIEWICZ et coll. 1978). Aussi, l'isolement de mutants  $Nif^-$  nécessite-t-il des tests sur plantes.

Le test de nodulation ainsi que celui de la réduction de l'acétylène en éthylène nous ont d'abord permis de vérifier les propriétés symbiotiques de la souche M5S de **Rhizobium meliloti** utilisée au cours de cette étude pour l'isolement de mutants inefficients. Cette souche est nodulante et fixe l'azote atmosphérique en symbiose avec sa plante-hôte : la luzerne (**Medicago sativa**). Les essais réalisés sur la luzerne avec une série de mutants sont toujours accompagnés de témoins non inoculés.

## I. - ISOLEMENT DE MUTANT FIX<sup>-</sup>

Les souches de *Rhizobium meliloti* isolées dans la nature sont toutes muqueuses. L'obtention de mutants auxotrophes inefficients nécessite le repiquage par réplique de nombreuses colonies. Or, avec les souches muqueuses dont les colonies atteignent 1 à 3 cm de diamètre en fin de croissance et dont le mucus adhère au velours, les répliques sont très difficiles à réaliser. Nous avons donc entrepris la sélection de clones non muqueux dans le but de faciliter la recherche des mutants inefficients. Ainsi, nous avons sélectionné, par cultures successives en milieu liquide, un mutant spontané non muqueux : M5N1, qui a gardé les propriétés symbiotiques de la souche sauvage.

Ce mutant non muqueux M5N1 a ensuite été soumis à l'action d'un agent mutagène : la nitrosoguanidine, en vue d'obtenir des mutants incapables de fixer l'azote atmosphérique et donc de réduire l'acétylène en éthylène.

La figure 3 montre la filiation des souches inefficientes obtenues. A partir de la souche M5N1 prototrophe et capable de fixer l'azote atmosphérique, on a isolé le clone M5N1m1 obtenu par une première mutation qui porte sur le caractère isoleucine-valine ; ce clone manifeste toujours son aptitude à fixer l'azote atmosphérique (Fix<sup>+</sup>). Le mutant M5N1m2 est obtenu à partir de M5N1m1 par une seconde mutation sur le caractère tryptophane ; cette mutation n'affecte pas l'efficacité chez ce mutant (Fix<sup>+</sup>). Deux nouveaux mutants, ayant la même exigence, sont obtenus à la suite d'une troisième mutation portant sur le caractère arginine : les mutants M5N1m3 et M5N1m4. Le mutant M5N1m3 qui induit des nodules dont la morphologie est altérée est incapable de fixer l'azote atmosphérique (Fix<sup>-</sup>) (photographie 5 en page 71) alors que le mutant M5N1m4 demeure efficace (Fix<sup>+</sup>).

Il est difficile de comparer valablement l'efficacité d'une souche prototrophe avec son mutant auxotrophe, à qui un facteur peut manquer pour exprimer ses potentialités à fixer l'azote. C'est pourquoi nous avons testé l'efficacité de notre mutant auxotrophe inefficace M5N1m3, en présence de facteurs indispensables aux biosynthèses protéiques (tableau 7).

## ISOLEMENT D'UN MUTANT FIX<sup>-</sup>

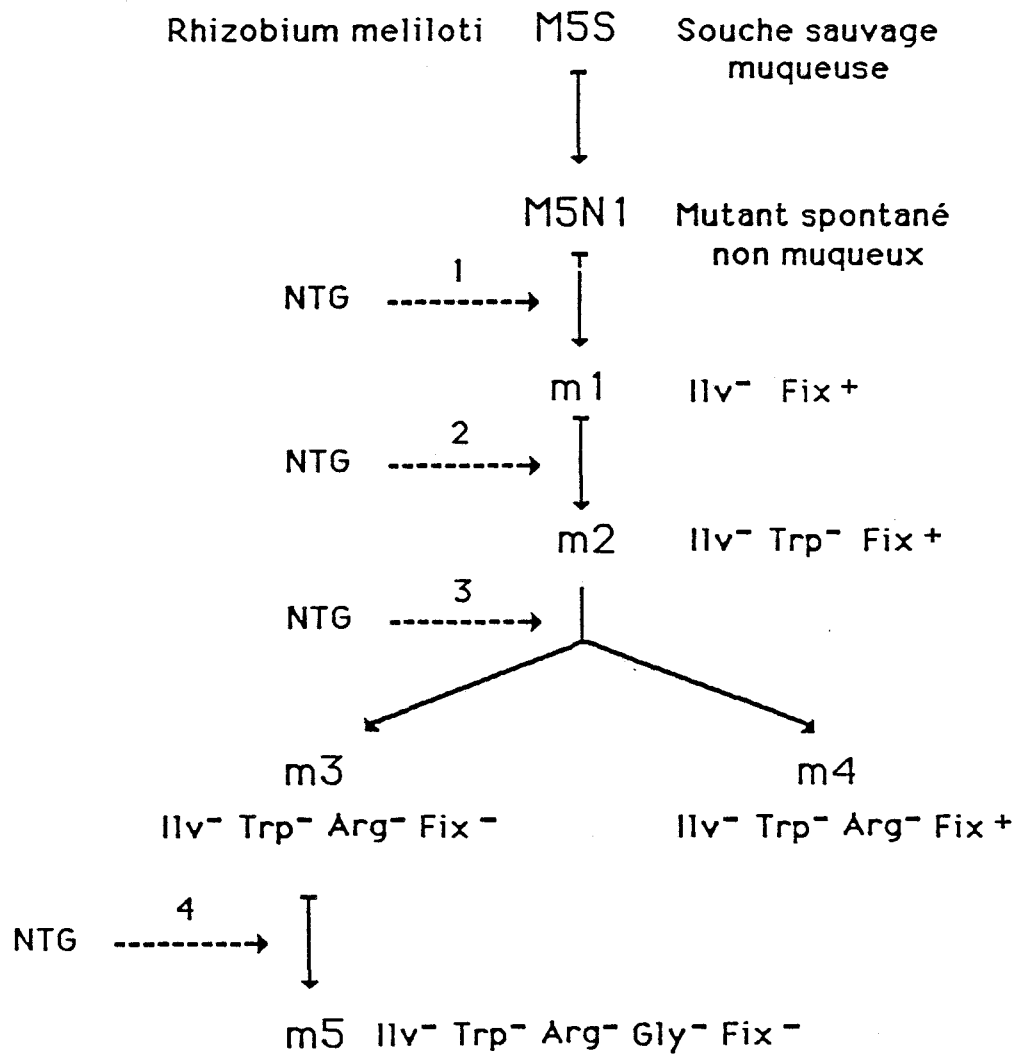


Figure 3 - Isolement d'un mutant Fix<sup>-</sup>.

Traitement des plantules de luzerne inoculées avec :	Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrogénase en 7 h (nmoles/mg de poids sec)
M5N1	3.92
M5N1m1	2.80
M5N1m2	2.53
M5N1m3	0.004
M5N1m4	2.29
M5N1m3 (+ Exigences)	0.09
Rev M5N1m3 C <sub>I</sub>	0.001
Rev M5N1m3 C <sub>II</sub>	n.m.
Rev M5N1m3 C <sub>III</sub>	n.m.
Non inoculées	0.01

**Tableau 7 - Evaluation de l'efficacité de la souche M5N1, des mutants auxotrophes, du mutant M5N1m3 en présence de ses exigences, et des révertants M5N1m3  $Ilv^- Trp^- Arg^+$  (Rev M5N1m3).**

Les mesures d'éthylène ont été effectuées sur dix plantules entières, deux mois après l'infection (n.m. : quantité non mesurable). Ces valeurs correspondent à des moyennes issues de trois expériences différentes. Les exigences sont ajoutées à raison de 10 µg/ml dans le milieu de NICOL et THORNTON.

La souche M5N1m3 reste inefficace même lorsqu'on ajoute au milieu de NICOL et THORNTON ses facteurs de croissance : isoleucine-valine, tryptophane, arginine, ce qui est un argument en faveur de la stabilité et l'indépendance de ce caractère symbiotique vis-à-vis des exigences de ce mutant auxotrophe. Il faut remarquer que les deux mutants exigeants en arginine : M5N1m3 et M5N1m4 sont capables de croître sur milieu minimum additionné d'isoleucine-valine, de tryptophane et d'arginine, mais sont incapables de se développer sur ce même milieu quand l'arginine est remplacé par l'un de ses précurseurs : l'ornithine, la citrulline ou l'arginino-succinate. Par conséquent, si les voies de cette biosynthèse chez *Rhizobium* sont identiques à celles établies chez *Escherichia coli*, nous constatons que ces deux mutants ont subi une altération au niveau de la même étape de la synthèse de l'arginine, et donc vraisemblablement au niveau du même gène : le gène arg H qui est responsable de la synthèse de l'arginino-succinate-lyase (E.C. 4.3.2.1.). Cette dernière transforme la L-arginino-succinate en L-arginine.

## II. - ETUDE DE REVERTANTS

Chez la souche M5N1m3 il faut remarquer que le caractère d'inefficience est apparu simultanément avec celui de l'auxotrophie pour l'arginine, on pourrait alors penser qu'une réversion sur le caractère arginine est indispensable pour que cette souche manifeste son efficience. Nous avons donc isolé des révertants portant sur le caractère arginine. L'analyse de tels révertants fait toujours apparaître une incapacité de produire de l'éthylène à partir de l'acétylène (tableau 7). La perte, par réversion, de cette exigence ne modifie donc en rien l'inefficience du mutant M5N1m3.

## III. - TRANSFERT PAR CONJUGAISON DES DETERMINANTS GENETIQUES LIES A L'EFFICIENCE

Dans ce qui suit, nous avons étudié si le caractère de l'efficience est transférable ou non. Les essais de transfert de l'efficience par transformation chez **Rhizobium trifolii** ou par transduction chez **Rhizobium meliloti** (KOWALSKI 1971) ont été infructueux. Les systèmes de transfert utilisés, la transformation et la transduction, sont des transferts à basse fréquence ; par contre, la conjugaison qui implique la formation de cellules partiellement diploïdes et le transfert de fragments assez importants d'ADN est la méthode la plus convenable. Les résultats obtenus par conjugaison en faisant intervenir des éléments génétiques du groupe P, sont prometteurs et ont permis l'établissement de plusieurs ébauches de cartes génétiques chez **Rhizobium** qui, dans l'ensemble, présentent de grandes similitudes (voir Généralités).

Ainsi, nous avons utilisé le facteur (RP4) isolé de **Pseudomonas aeruginosa** qui est très proche de **Rhizobium** du point de vue phylogénique, pour transférer le ou les marqueur(s) génétique(s) ayant trait à l'efficience. Ce plasmide porte les gènes de résistance à la tétracycline (Tc), à la kanamycine (Km) et à l'ampicilline (Ap). Nous avons effectué des croisements entre une souche efficiente portant le facteur (RP4) : 2011(RP4) (souche donatrice) et une souche auxotrophe inefficente : M5N1m3 (souche réceptrice), en vue d'obtenir des recombinants éventuellement efficients.



### 3.1 - Analyse des souches parentales

Auparavant, le contenu plasmidique des deux souches parentales a été étudié par électrophorèse en utilisant un gel d'agarose de faible concentration (0.5 %) (photographie 3). Chez la souche 2011(RP4), nous avons constaté la présence de deux bandes très rapprochées correspondant chacune à un plasmide de poids moléculaire très élevé (mégaplasmides : pRme2011a ou pSym et pRme2011b) confirmant les récentes observations de PÜHLER et coll. (1984), et une autre bande de mobilité correspondant à celle du plasmide RP4. Le poids moléculaire exact de ces mégaplasmides n'a pu être déterminé avec précision à l'aide de ces électrophorèses. La souche réceptrice M5N1m3 abrite un mégaplasmide qui migre identiquement au mégaplasmide cryptique de la souche 2011(RP4) (pRme2011b) et un second plasmide dont le poids moléculaire est de l'ordre de 92 Md (pRmeM5N1m3a). Cette valeur est estimée par comparaison avec des plasmides de *Rhizobium meliloti* de poids moléculaire connu (CASSE et coll. 1979).

Nous avons également comparé le contenu plasmidique de la souche mère M5N1 et de son dérivé M5N1m3 dans le but de déterminer si la nitrosoguanidine, qui a induit une altération des propriétés symbiotiques chez ce mutant, a provoqué une modification du contenu plasmidique. Cette modification pourrait être visualisée par délétion d'un fragment des plasmides indigènes. L'analyse électrophorétique montre que les mégaplasmides ainsi que les plasmides de taille moyenne migrent à égale distance pour le mutant inefficace (M5N1m3) et la souche mère (M5N1) par rapport à la zone de dépôt. Ceci signifie que la NTG n'a pas provoqué de délétions apparentes chez la souche M5N1m3.

### 3.2 - Fréquence de transfert des marqueurs génétiques

L'isolement d'un mutant spontané M5N1m3 résistant à la streptomycine (400 µg/ml) et à la rifamycine (100 µg/ml) : M5N1m3SR, nous a permis de contre-sélectionner la souche donatrice 2011(RP4). Les recombinants sont sélectionnés sur les caractères acquis au cours de la conjugaison par la souche inefficace réceptrice (M5N1m3SR). Le milieu de sélection est donc le milieu minimum additionné de streptomycine et de rifamycine, ou le même milieu avec des combinaisons appropriées des acides aminés suivants : isoleucine-valine, tryptophane et arginine.

B A B A B A

pRmeM5N1m3SRb →

← pRme2011b  
← pRme2011a

pRmeM5N1m3SRa →

← RP4

**Photographie 3 - Analyse du contenu plasmidique des souches parentales.**

A : 2011(RP4)  
B : M5N1m3SR

Les fréquences obtenues à la suite de ce croisement sont significatives :

- la fréquence de transfert des caractères Ilv, Trp et Arg est de l'ordre de  $10^{-5}$ ,
- la fréquence de réversion des caractères d'auxotrophie est inférieure à  $4.0 \times 10^{-7}$ ,
- la fréquence des mutants spontanés de la souche 2011(RP4) sensible à la streptomycine ou à la rifamycine est inférieure à  $10^{-9}$ .

Il faut noter, d'une part, que la fréquence de transfert du plasmide RP4 est faible (de l'ordre de  $10^{-8}$ ) et, d'autre part, que la baisse de la population de la souche réceptrice M5N1m3SR est de l'ordre de 2/3 après le contact avec la souche donatrice lors du croisement. La diminution de la population bactérienne du mutant M5N1m3SR, au cours du croisement, résulterait probablement d'une bactériocine toxique secrétée par la souche 2011(RP4).

### **3.3 - Analyse des recombinants**

Nous avons déterminé les caractères acquis par les recombinants ; cette analyse nous a permis de les classer en deux catégories (tableau 8) :

- des clones ayant reçu les caractères arginine et tryptophane, donc incapables de synthétiser l'isoleucine-valine ;
- des clones ayant reçu les trois caractères à la fois (arginine, tryptophane et isoleucine-valine), donc capables de se développer sur milieu minimum.

On remarque que les recombinants ne se développent pas en présence de tétracycline, de kanamycine et d'ampicilline, ce qui implique qu'ils n'ont pas reçu les gènes de résistance portés par le plasmide RP4.

#### **3.3.1 - Typage phagique**

La sensibilité à certains rhizobiophages étant spécifique pour chaque souche bactérienne, un typage phagique a pu être utilisé comme test pour prouver l'origine des recombinants.

Nous avons sélectionné parmi les phages de la collection trois phages spécifiques du mutant M5N1m3SR :  $\Phi 7$ ,  $\Phi 11$  et  $\Phi 12$ . Tous les clones recombinants sont lysés par les phages  $\Phi 7$  et  $\Phi 12$ , par contre ils sont résistants au phage  $\Phi 11$ .

Souche	Phénotype	Résistance à			Sensibilité aux phages			Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrogénase en 7 h (nmoles/mg de poids sec)	Contenu plasmidique
		Ap	Km	Tc	Φ7	Φ11	Φ12		
2011(RP4)	Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	+	+	+	-	-	-	4.9	pRme2011b pRme2011a RP4
M5N1m3SR	Ilv <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup> Arg <sup>-</sup> Sm <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup>	-	-	-	+	+	+	0.008	pRmeM5N1m3SRb pRmeM5N1m3SRa
Recombinants									
Clones 1 à 4	Prototrophes Sm <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup>	-	-	-	+	-	+	5.8 à 12.1	pRmeM5N1m3SRb
Clones 5 à 8	Ilv <sup>-</sup> Sm <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup>	-	-	-	+	-	+	5.0 à 7.0	pRme2011a

Tableau 8 - Etude comparative des souches parentales et des recombinants.

### 3.3.2 - Profil des protéines solubles

Pour vérifier également l'origine des recombinants, nous avons examiné et comparé les profils des protéines solubles des deux souches parentales et d'un recombinant de chaque type par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Les profils des protéines solubles des deux recombinants sont similaires à celui du mutant M5N1m3SR (photographie 4).

Ces résultats nous indiquent que les recombinants analysés dérivent de la souche M5N1m3SR.

### 3.3.3 - Propriétés symbiotiques

Parmi les recombinants, huit clones ont été inoculés sur luzerne et analysés pour leur activité nitrogénasique. Les valeurs obtenues (tableau 8) nous révèlent que ces huit recombinants sont efficaces contrairement à la souche d'origine M5N1m3SR (Fix<sup>-</sup>). De plus, les nodules induits par la souche 2011(RP4) et les recombinants (Fix<sup>+</sup>) sont identiques : roses, réguliers et allongés, alors que ceux formés par le mutant M5N1m3SR sont blancs, déformés et ronds (photographie 5). Ces résultats signifient que les déterminants génétiques liés à l'efficacité ont été transmis par conjugaison de la souche 2011(RP4) au mutant inefficace M5N1m3SR.

Le transfert des caractères d'auxotrophie est accompagné de celui de l'efficacité. Pour expliquer le transfert simultané de l'efficacité et des caractères d'auxotrophie, on peut émettre deux hypothèses : le transfert de l'efficacité peut être dû à un transfert chromosomique (gènes d'auxotrophie et gènes de l'efficacité) ou au passage d'un plasmide porteur du caractère de l'efficacité de la souche 2011(RP4) à la souche M5N1m3SR. Ceci nous a conduit à analyser le contenu plasmidique des recombinants par électrophorèse en gel d'agarose (méthode d'Eckhardt modifiée).

### 3.3.4 - Contenu plasmidique

Les recombinants isolés précédemment ont été lysés directement au sommet d'un gel vertical d'agarose, puis les lysats ont été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 0.5 % dans le but de comparer le contenu plasmidique des recombinants à celui des souches parentales.

M A B C D

94 →

68 →

43 →

30 →

Photographie 4 - Comparaison par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, du profil des protéines solubles de deux recombinants par rapport aux souches parentales.

- A : 2011(RP4)
- B : M5N1m3SR
- C : Recombinant prototrophe
- D : Recombinant Ilv<sup>-</sup>.
- M : Marqueur, Pharmacia Low Molecular Weight

		<b>Recombinant</b>
<b>2011(RP4)</b>	<b>M5N1m3SR</b>	<b>Fix<sup>+</sup></b>

Photographie 5 - Comparaison de la morphologie des nodules induits par les souches parentales et un recombinant Fix<sup>+</sup>.

Nous constatons chez tous les recombinants (photographie 6) la présence de deux bandes plasmidiques de haut poids moléculaire correspondant à deux mégaplasmides légèrement séparés. En revanche, nous remarquons l'absence du facteur RP4 ainsi que le prévoyait l'étude des résistances aux antibiotiques et celle du plasmide moyen (pRmeM5N1m3SRa : 92 Md) chez ces recombinants. L'apparition d'un second mégaplasmide corrélée avec la capacité des recombinants à fixer l'azote atmosphérique suggère la mobilisation et le transfert du pRme2011a (pSym) par le plasmide RP4, de la souche 2011(RP4) au mutant inefficace (M5N1m3SR). Ainsi la seconde hypothèse émise ci-dessus semble la plus probable.

Il est important de signaler qu'une seule bande plasmidique de haut poids moléculaire a été observée en gel d'agarose (0.5 %) chez le mutant M5N1m3SR. Ceci n'exclut pas la présence de deux mégaplasmides qui co-migrent et dans ces conditions ne peuvent être détectés au cours de nos expériences (gel d'agarose à 0.5 %).

#### IV. - MISE EN EVIDENCE DE DEUX MEGAPLASMIDES CHEZ LA SOUCHE M5N1

Les résultats obtenus précédemment [deux mégaplasmides chez la souche 2011(RP4) (photographie 3)] ainsi que ceux obtenus par BANFALVI et coll. (1981) suggérant la présence d'un deuxième mégaplasmide qui pourrait masquer la perte totale du pSym des mutants non-nodulants de la souche 41 nous ont amené à étudier si la présence de deux mégaplasmides pouvait être observée chez d'autres souches de **R. meliloti**.

L'électrophorèse en gel d'agarose (0.5 %) ne nous a pas permis de généraliser la présence constante de deux mégaplasmides chez les souches suivantes de **R. meliloti** : AK631, L5-30, M19S, 2004, U45, LS2a, M5N1, 444, Tu20. En effet, l'analyse de ces souches d'origine différente, dans les conditions mentionnées précédemment, ne nous a pas fourni des résultats clairs et reproductibles pour l'ensemble des souches testées. Cependant, on ne peut pas en conclure qu'il n'existe pas deux macromolécules qui co-migrent dans les souches analysées.

Les plasmides constituent des cibles pour les produits chimiques employés au cours des mutagenèses. La nitrosoguanidine notamment est un agent mutagène puissant qui induit des fréquences de mutation élevées avec un taux de survivants relativement élevé et peut produire également de petites délétions dans le génome bactérien (CERDA-OLMEDO et RUIZ-VASQUEZ 1979).



**RECOMBINANTS**

prototrophes				Ilv <sup>-</sup>			
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8

↙ pRmeM5N1m3SR b  
↙ pRme2011a

Photographie 6 - Analyse du contenu plasmidique de huit recombinants Fix<sup>+</sup>.

**M5N1 M5N1m5**

**pRmeM5N1 b,c →**  
**pRmeM5N1 a →**

**← pRmeM5N1m5 c**  
**← pRmeM5N1m5 b**  
**← pRmeM5N1m5 a**

**Photographie 7 - Etude du contenu plasmidique du mutant M5N1m5 par comparaison à la souche sauvage M5N1.**

La souche M5N1m3 traitée à la nitrosoguanidine a fourni un nouveau mutant exigeant en glycoColle : la M5N1m5, et dont le phénotype est le suivant :  $Ilv^-$   $Trp^-$   $Arg^-$   $Gly^-$   $Fix^-$  (voir figure 3). Nous avons analysé le contenu plasmidique de ce mutant par électrophorèse en gel vertical d'agarose (0.65 %), ceci dans le but de rechercher une éventuelle modification des plasmides de ce mutant par rapport à ceux de la souche d'origine M5N1.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont visualisés dans la photographie 7. Nous pouvons distinguer en plus du plasmide moyen (pRmeM5N1m5a) et du mégaplasmide (pRmeM5N1m5c) la présence d'une deuxième bande plasmidique de haut poids moléculaire chez la souche M5N1m5 (pRmeM5N1m5b) qui correspond chez la souche M5N1 à une délétion de l'une des deux macromolécules (pRmeM5N1b,c) qui co-migrent dans un gel d'agarose à 0.5 %. Nos résultats sont reproductibles et confirment ceux de BANFALVI et coll. (1985). La nitrosoguanidine a produit une délétion de l'une des deux macromolécules qui co-migrent chez la souche M5N1, ce qui explique que chez le mutant M5N1m5 nous observons les deux mégaplasmides.

## DISCUSSION

Les travaux effectués dans la première partie de notre étude nous ont permis d'isoler, par action d'un agent mutagène, la nitrosoguanidine, un mutant incapable de fixer l'azote atmosphérique : M5N1m3 dont le phénotype est le suivant :  $Ilv^-$ ,  $Trp^-$ ,  $Arg^-$ ,  $Fix^-$ .

Certaines mutations, naturelles ou induites, portent directement ou indirectement sur une propriété symbiotique (infectivité ou efficacité) et peuvent également porter sur d'autres caractères [exemple : des mutants non muqueux de **Rhizobium leguminosarum** perdent leur pouvoir infectieux ( $Nod^-$ ) (SANDERS et coll. 1978)]. L'auxotrophie peut parfois être associée à des modifications du comportement symbiotique, notamment la perte de l'efficacité. Selon DIXON et CANNON (1976), les mutants auxotrophes seraient classés en trois groupes :

- mutations apparemment non associées directement avec la capacité symbiotique puisque la restauration de la prototrophie (aptitude à croître dans un milieu minéral contenant une source de carbone et une source d'azote) ne rétablit pas l'efficacité. Il y a donc au minimum deux gènes indépendants touchés par l'agent mutagène ;

- mutations étroitement associées avec l'efficacité car leur réversion permet de recouvrer le phénotype  $\text{Fix}^+$ , mais pas l'addition de l'exigence. On est en présence d'au moins deux gènes adjacents sinon très proches, possédant des gènes régulateurs communs ; une seule mutation au niveau de ces derniers peut affecter le fonctionnement de ces deux gènes ;
- mutations paraissant associées avec la capacité symbiotique au niveau phénotype : réapparition de l'efficacité si réversion ou addition de l'exigence ; le produit des gènes ayant subi une modification nécessaire pour la fixation de l'azote, en tant qu'activateur, coenzyme ou substrat.

La troisième mutagenèse à la NTG (réalisée sur la souche M5N1m2) a induit l'auxotrophie pour l'arginine, l'incapacité à fixer l'azote atmosphérique et l'altération morphologique des nodules, cas du mutant M5N1m3. Ceci pourrait faire intervenir un effet pléiotrope. Un tel effet a été invoqué par JENSEN et KENNEDY (1982) pour une souche fixatrice libre d'azote de *Klebsiella pneumoniae* exigeante en histidine. De même, certains auteurs (DENARIE 1969, SCHWINGHAMER 1970) ont remarqué chez différentes espèces de *Rhizobium* (*R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*) que les exigences en bases nucléiques, leucine, histidine, thiamine et riboflavine sont étroitement associées à l'efficacité ; le retour à l'état prototrophe de ces mutants auxotrophes provoque le retour de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, ce qui n'est pas le cas après addition de l'exigence. Contrairement aux résultats obtenus par ces auteurs, l'obtention de plusieurs mutants réverses à partir de la souche auxotrophe et inefficace M5N1m3 montre que le retour vers la prototrophie pour le caractère arginine n'entraîne pas un retour à l'efficacité : ce qui implique l'absence d'un effet pléiotrope.

Ces mêmes auteurs ont constaté que les mutants exigeants en arginine, glycolle, cystéine, méthionine, tryptophane et phénylalanine ne montrent aucune relation avec les propriétés symbiotiques. Les résultats obtenus avec le mutant M5N1m3 sont en accord avec ces observations. En effet, ce mutant conserve son phénotype  $\text{Fix}^-$  en présence des acides aminés indispensables à sa croissance : l'isoleucine-valine, le tryptophane et l'arginine (MAOUI 1980). Ainsi aucune relation n'a pu être établie entre les caractères d'auxotrophie et les gènes d'efficacité, en étudiant la filiation conduisant au mutant inefficace M5N1m3. En outre, la souche M5N1m4 est efficace, or elle possède les mêmes exigences que la souche M5N1m3.

Ces résultats démontrent que les déterminants génétiques de l'efficacité sont portés par des gènes indépendants de ceux codant pour la synthèse de l'arginine, et nous permettent de classer le mutant M5N1m3 dans le premier groupe selon la classification de DIXON et CANNON (1976). Au cours de la troisième mutagenèse conduisant à la fois à un mutant exigeant en arginine et induisant des nodules altérés et non fixateurs d'azote, la NTG a induit simultanément de multiples mutations. Le pouvoir de la NTG d'induire plusieurs mutations au cours d'un traitement a été reporté chez *Saccharomyce cerevisiae* par CALDERON et CERDA-OLMEDO (1982).

Il est intéressant de noter que la souche M5N1 héberge en plus du pSym un second mégaplasmide qui co-migre avec le pSym dans un gel d'agarose à 0.5 %. La présence du pRmeM5N1b n'a pu être révélée que par délétion de l'un des deux mégaplasmides (MAOUI et coll. 1985b), contrairement à la souche 2011 où les deux mégaplasmides peuvent être visualisés dans un gel d'agarose à 0.5 % (leur différence de taille étant suffisante pour permettre une différence de migration) (MAOUI et coll. 1985a). Ainsi, la NTG est capable d'induire des délétions dans le génome de **Rhizobium**.

Ces résultats confirment ceux obtenus par BANFALVI et coll. (1985) qui détectent par délétion la présence d'un mégaplasmide dans la souche 41. Des résultats analogues ont été obtenus récemment par ROSENBERG chez la souche L5-30 (TRUCHET et coll. 1985) et par TORO et OLIVARES (1986) chez la souche GR4 de **R. meliloti**.

Donc la présence de deux mégaplasmides semble être une règle générale chez les souches de **R. meliloti** bien qu'il ne soit pas toujours possible de les visualiser.

Dans un deuxième temps nous avons étudié le transfert de l'efficacité. L'analyse des recombinants obtenus après croisement des souches 2011(RP4) et M5N1m3SR montre que ceux-ci sont issus de la souche réceptrice utilisée dans ce croisement (M5N1m3SR). Ceci a été établi par typage au moyen de phages ( $\Phi$ 7 et  $\Phi$ 12) et par étude du profil des protéines solubles. Cependant, contrairement à la souche réceptrice, les recombinants sont devenus résistants au phage  $\Phi$ 11, ceci pourrait être lié à la perte du plasmide moyen (pRmeM5N1m3SRa) de la souche réceptrice. Une telle corrélation a été démontrée chez une autre souche de **R. meliloti** (GR4) par CORRAL et coll. (1978). Nous avons essayé au moyen du phage  $\Phi$ 11 d'isoler des mutants M5N1m3 résistants à ce phage, dans le but de vérifier cette hypothèse en étudiant le contenu plasmidique de tels clones. Les colonies qui

apparaissent après dépôt d'une forte concentration de phages sont des microcolonies, lorsqu'on les purifie par repiquage sur le même milieu, on n'observe aucune croissance.

Parmi les recombinants résistants à la streptomycine et à la rifamycine, qui ont tous acquis le caractère de l'efficacité, certains ont acquis les caractères arginine et tryptophane, les autres sont devenus capables de se développer sur milieu minimum et ont donc acquis les caractères de prototrophie de la souche donatrice. Ceci implique que les gènes *arg* et *trp* sélectionnés dans ce croisement sont intimement liés. La sélection de recombinants prototrophes dans un seul croisement à partir d'une souche réceptrice portant trois marqueurs d'auxotrophie n'est pas surprenant puisque les plasmides R du groupe d'incompatibilité P1 (tel que le RP4) peuvent promouvoir le transfert de larges fragments d'ADN chromosomique de **Rhizobium** avec de multiples crossing-over (BERINGER et coll. 1980). En outre, la comparaison des chromosomes de deux souches de **Rhizobium meliloti** (dont la souche 2011) a permis de montrer qu'ils sont suffisamment homologues pour permettre des fréquences de recombinaison élevées entre-eux (KONDOROSI et coll. 1980). Si l'on observe l'ébauche de la carte génétique établie par MEADE et SIGNER (1977), qui ont utilisé la même souche donatrice 2011, on remarque que certains de nos marqueurs (isoleucine-valine, tryptophane et arginine) se situent à proximité les uns des autres : ceci serait en faveur du transfert en bloc de ces mêmes marqueurs au cours du croisement 2011(RP4) avec M5N1m3SR.

On peut supposer que le caractère de l'efficacité qui est transféré en même temps que ces caractères d'auxotrophie est situé :

- au niveau d'une même région chromosomique : il faudrait alors admettre un transfert d'un secteur du chromosome, comme l'ont prouvé HEUMANN et coll. (1973) pour une souche qui appartiendrait au groupe **Rhizobium lupini**, dans des conditions de conjugaison telles qu'il y ait passage orienté d'un segment relativement long ;
- ou au niveau d'un élément extrachromosomique : il faudrait alors admettre la mobilisation du pSym de la souche 2011(RP4) par le facteur RP4, comme l'ont démontrée TRUCHET et coll. (1984) en mobilisant le pSym de la même souche (2011) par le même plasmide RP4, chez **Agrobacterium tumefaciens**. KONDOROSI et coll. (1982) par des expériences de complémentation ont réussi également

à mobiliser tout ou partie du pSym par ces facteurs sexuels (Inc P1) vers des **Rhizobium** affectés dans leurs propriétés symbiotiques (phénotypes  $\text{Nod}^-$  ou  $\text{Fix}^-$ ) ou vers des souches d'**Agrobacterium**.

L'étude du contenu plasmidique des recombinants efficaces nous a permis de noter les modifications de celui-ci : la perte du pRmeM5N1m3SRa et la présence d'un deuxième mégaplasme correspondant au pSym de la souche 2011(RP4). La disparition du pRmeM5N1m3SRa résulterait probablement d'une incompatibilité entre ce plasmide et le pSym de la souche 2011(RP4). La présence de deux mégaplasmes serait en faveur d'une mobilisation séparée des gènes chromosomiques (*ilv*, *trp*, *arg*) et du pSym de la souche 2011(RP4) (portant les caractères d'efficacité). Un autre argument est en faveur de cette hypothèse : chez **R. meliloti**, la majorité des gènes symbiotiques (*nod*, *fix* et *nif*) ont été localisés sur un mégaplasme (pSym) (BANFALVI et coll. 1981, ROSENBERG et coll. 1981). Une carte détaillée de la région symbiotique de ce mégaplasme a été établie, démontrant le voisinage des gènes *nod*, *fix* et *nif* (BANFALVI et coll. 1981, KONDOROSI et coll. 1984). Le fait que les nodules induits par le mutant M5N1m3 montrent une morphologie altérée (nodules poilus) suggère que le mégaplasme portant les déterminants *nod* a été altéré par la nitrosoguanidine qui, usuellement, donne des mutations ponctuelles (MEGIAS et coll. 1982b). Les nodules induits par les recombinants  $\text{Fix}^+$  sont morphologiquement similaires à ceux de la souche donatrice, la mutation affectant la morphologie des nodules est probablement complétée par le transfert du pSym de la souche 2011(RP4) au mutant M5N1m3SR. Il est important de signaler que le transfert concomitant par conjugaison de l'ADN chromosomique et non chromosomique à la même souche réceptrice au cours d'un croisement a été décrit chez **E. coli** (CLOWES 1961). Nous ne pouvons pas exactement déterminer la fréquence de transfert des déterminants *fix* à cause de l'absence de marqueurs apparents sur le pSym.

Néanmoins, la production de bactériocine, qui est une propriété transmissible à haute fréquence parmi les **Rhizobium**, pourrait être un marqueur sélectif. En effet, les gènes responsables de la production de bactériocine ont été localisés sur un plasmide de haut poids moléculaire chez **R. leguminosarum** (HIRSCH 1979). Nous pouvons supposer que la souche 2011(RP4) produit une bactériocine active contre la souche réceptrice M5N1m3SR. Ceci expliquerait la baisse du taux de survivants de la souche réceptrice M5N1m3 au cours du croisement. Si comme chez **R. leguminosarum** cette bactériocine est localisée sur le pSym, cela nous permettrait de sélectionner des transconjugants, donc des recombinants, ayant acquis le pSym de la 2011(RP4). Actuellement, un marquage artificiel du pSym peut être obtenu par transposition : par

exemple, le transposon Tn7 qui possède la propriété de s'insérer spécifiquement dans le mégaplasme de différentes souches de **R. meliloti** (BOLTON et coll. 1984) procure un outil génétique très intéressant pour étudier le transfert du pSym et par conséquent déterminer la fréquence de transfert des gènes associés au mégaplasme.



## CHAPITRE II

### ETUDE DES REVERTANTS PROTOTROPHES

Au cours du croisement décrit précédemment [2011(RP4) x M5N1m3SR], nous avons déterminé la fréquence de réversion du mutant inefficace M5N1m3SR pour chaque caractère d'auxotrophie (isoleucine-valine, tryptophane et arginine) afin de vérifier la stabilité de ce mutant. En effet, un mutant est dit stable quand il montre une vraie déficience même après plusieurs cultures successives. En général, la réversion d'un marqueur d'auxotrophie stable porté par un mutant se produit à une fréquence inférieure ou égale à  $10^{-7}$ . La fréquence de réversion diminue pour deux ou plusieurs marqueurs. Dans le cas du mutant M5N1m3SR, la fréquence de réversion est inférieure ou égale à  $4.0 \times 10^{-7}$  pour un caractère, donc pour les trois caractères à la fois, elle devrait être de l'ordre de  $10^{-22}$ . La réversion simultanée de trois caractères est donc un événement quasi impossible. Cependant au cours de la recherche de révertants Arg<sup>+</sup> et du contrôle de la fréquence de réversion du mutant M5N1m3SR pendant les croisements, nous avons isolé sur milieu minimum, en une seule étape, des révertants prototrophes. Le comportement du mutant inefficace M5N1m3SR conduisant à la triple réversion donc à la prototrophie est surprenant.

Une récente preuve indiquant que le génome de *Rhizobium japonicum* est instable et capable de subir une réorganisation spontanée entre les plasmides indigènes et le chromosome hôte (BERRY et ATHERLY 1984), nous ont incité à étudier le génome des révertants prototrophes obtenus en une seule étape. Tous les clones révertants testés par électrophorèse en gel d'agarose montrent une altération du contenu plasmidique par rapport à celui du mutant M5N1m3SR. Cette altération est caractérisée par l'absence du plasmide moyen (pRmeM5N1m3SRa). Ainsi, après l'isolement et l'identification de ces révertants, nous avons étudié la relation existant entre l'absence du plasmide moyen (pRmeM5N1m3SRa) et la réversion globale vers la prototrophie.

## I. - ETUDE DU CONTENU PLASMIDIQUE DU MUTANT M5N1m3SR

Le mutant M5N1m3SR dérive de la souche prototrophe non muqueuse M5N1. Ce mutant est obtenu à la suite de trois traitements successifs à la NTG pour les caractères d'auxotrophie (isoleucine-valine, tryptophane, arginine) et par mutation spontanée pour les caractères de résistance aux antibiotiques (streptomycine et rifamycine). En outre, la troisième mutation qui a provoqué l'auxotrophie pour l'arginine, a induit simultanément la perte du pouvoir fixateur d'azote sur la luzerne et l'altération morphologique des nodules. Appliquée au mutant M5N1m3SR, la

technique analytique d'isolement de l'ADN plasmidique décrite par ECKHARDT (1978) qui est une méthode rapide et douce, nous permet de distinguer dans le gel d'agarose à 0.5 % après coloration au bromure d'éthidium, quatre ou cinq bandes d'ADN comme le montre la photographie 8.

a) **La bande 1** correspond à la fraction de l'ADN qui ne pénètre pas dans le gel. Il s'agit de l'ADN circulaire ouvert (OC) et probablement de l'ADN intact (molécules de chromosomes intactes) retenu par colmatage des débris cellulaires dû à la concentration assez élevée du gel et à un voltage important. En effet, HYNES et coll. (1985) ont pu obtenir par la même méthode (dans des conditions particulières : faible concentration d'agarose et faible voltage) des molécules chromosomiques sous forme CCC qui migrent dans le gel. Par des expériences d'hybridation moléculaire sur un gel desséché où les molécules sont fixées sur place, et en utilisant les mutants auxotrophes obtenus par mutagenèse à l'aide du transposon Tn5 sur le chromosome d'*Agrobacterium*, ils ont pu montré grâce à une sonde du transposon Tn5 que les molécules de très haut poids moléculaire étaient des molécules de chromosome sous forme CCC.

b) **La bande 2** correspond à la structure CCC du pSym qui est préservée par cette méthode analytique. Le calcul du poids moléculaire de molécules d'ADN de telle taille est virtuellement impossible. Celui-ci n'a pu être évalué pour deux raisons : d'une part, on ne dispose pas de témoins de même ordre de grandeur ; d'autre part, la relation linéaire entre le logarithme de la migration relative de la forme superhélicoïdale des plasmides et celui de leur poids moléculaire n'est valable que pour des plasmides de poids moléculaire inférieur ou égal à 140 Md.

Cependant, BURKARDT et BURKARDT (1984) ont récemment déterminé, par microscopie électronique, la longueur d'un mégaplasme de la souche MVII/1 de *Rhizobium meliloti*. Ils ont estimé la taille à  $0.48 \pm 0.019$   $\mu$ m ce qui équivaut à environ 1 000 Md. Dans les résultats précédents (chap. I, paragraphe IV), nous avons montré que la bande 2 est formée de deux molécules de poids moléculaire très élevé correspondant à deux mégaplasmes ayant la même masse moléculaire. En effet, la délétion de l'une de ces deux molécules fait apparaître une deuxième bande dont la vitesse de migration est toujours faible dans un gel d'agarose de 0.65 % (MAOUI et coll. 1985b).

ADN circulaire  
ouvert  
(forme OC ou II)

ADN circulaire  
superenroulé  
(forme CCC ou I)

ADN linéaire  
(forme L ou III)

← bande 1 : zone de dépôt

← bande 2 : mégaplasmides  
pRmeM5N1m3SRc  
pRmeM5N1m3SRb

↙ bande 3 : plasmide moyen  
pRmeM5N1m3SRa

↙ bande 4 : prophage

← bande 5 : zone des résidus  
chromosomiques

Canal 1 : M5N1m3SR

Canal 2 : variant M5N1m3SR

Photographie 8 - Electrophorèse en gel d'agarose des lysats du mutant M5N1m3SR et d'un variant M5N1m3SR par la méthode d'ECKHARDT (1978).

c) **La bande 3** correspond à la structure CCC du pRmeM5N1m3SRa qui est également préservée par cette technique. Le poids moléculaire du plasmide est estimé à  $92 \pm 3$  Md en utilisant des témoins déterminés par CASSE et coll. (1979).

d) **La bande 4** est observée occasionnellement au cours de l'analyse de plusieurs centaines de clones du mutant M5N1m3SR. Cette molécule n'est pas stable : en effet, l'étude du contenu plasmidique de ces variants, après conservation dans le glycérol, montre l'absence de celle-ci. Cette molécule pourrait correspondre à un prophage qui peut se maintenir à l'état plasmidique. Son poids moléculaire estimé à  $37 \pm 1$  Md est approximativement égal au prophage 16-3 de la souche de *Rhizobium meliloti* 41 qui fait 37 Md (DALLMANN et coll. 1979).

e) **La bande 5** plus ou moins apparente, diffuse, correspond à l'ADN le moins freiné dans les mailles du gel : il s'agit de l'ADN linéaire, constitué d'un mélange d'ADN chromosomique et d'ADN plasmidique (plasmide moyen et mégaplasmides) déroulés et fragmentés.

La présence occasionnelle de la bande 4 nous a conduit à vérifier s'il pouvait s'agir d'un prophage. Nous avons donc entrepris une recherche de prophage chez le mutant M5N1m3SR. Les souches lysogènes peuvent libérer les phages tempérés qu'elles portent, non seulement après traitement par un agent inducteur, mais aussi spontanément. C'est le cas du mutant M5N1m3SR qui s'est révélé porteur d'un prophage ; en effet, des bactériophages ont été détectés par la technique du "spot" avec la souche M3S comme souche indicatrice. Ce mutant est donc lysogène et capable de libérer un prophage spontanément.

Nous avons essayé d'augmenter le nombre de phages produits par induction aux rayons U.V. En effet, l'utilisation de cet agent inducteur constitue une méthode rapide par comparaison avec les agents chimiques. Le nombre de phages libérés (ufp/ml) spontanément et après traitement aux U.V. est respectivement égal à  $4.98 \times 10^4$  et  $5.0 \times 10^5$ . Nous remarquons que le titre après induction par les rayons U.V. est multiplié par un facteur de 10. Nous avons utilisé cette propriété lysogène comme caractère marqueur de la souche M5N1m3SR au cours de cette étude.

La bande 4 pourrait correspondre effectivement à un prophage puisque nos expériences montrent que l'on peut induire la libération de particules phagiques chez la souche M5N1m3SR. En outre la taille de ce prophage est similaire à celle de

prophages appartenant à d'autres souches de *Rhizobium meliloti* (DALLMANN et coll. 1979, ANDRIANTSIMIYAVONA-OTONIA 1984), dont l'ADN linéaire porte des extrémités cohésives permettant à la molécule de se circulariser. Dans le cas du mutant M5N1m3SR, le prophage pourrait exister dans deux états différents : intégré au chromosome ou sous forme plasmidique. Un tel phénomène a également été observé chez *Azospirillum lipoferum* (ELMERICH et coll. 1982).

Ces observations montrent que le génome de la souche M5N1m3SR peut subir des remaniements.

## II. - ISOLEMENT DE REVERTANTS PROTOTROPHES SPONTANES A PARTIR DU MUTANT M5N1m3SR ET DU TRANSCONJUGANT M5N1m3SR(RP4)

Le schéma récapitulatif précise les caractères et le contenu plasmidique des différents clones obtenus (figure 4).

### 2.1 - Isolement de révertants prototrophes

La sélection des cellules ayant retrouvé la prototrophie en une seule étape est réalisée sur milieu minimum (RFruHB1 où les acides aminés sont absents) additionné de streptomycine (400 µg/ml) et de rifamycine (100 µg/ml). Dans le cas du transconjugant M5N1m3SR(RP4), la tétracycline (10 µg/ml) est ajoutée dans le milieu de sélection.

Des révertants prototrophes apparaissent sur milieu minimum après trois jours d'incubation à 30°C, nous les avons purifiés par passage sur le même milieu et ensuite testés pour leur contenu plasmidique par la technique d'ECKHARDT (1978).

### 2.2 - Contenu plasmidique des révertants prototrophes

Tous les révertants analysés, issus du mutant M5N1m3SR, sont caractérisés par la présence d'une bande de haut poids moléculaire correspondant aux deux mégaplasmides et par l'absence du plasmide moyen pRmeM5N1m3SRa (un exemple de ce type de révertant est représenté dans la photographie 9). Cette absence est confirmée par la méthode de lyse alcaline suivie d'un gradient de CsCl-Ber qui permet d'obtenir et de purifier les plasmides de taille moyenne sous forme CCC (le

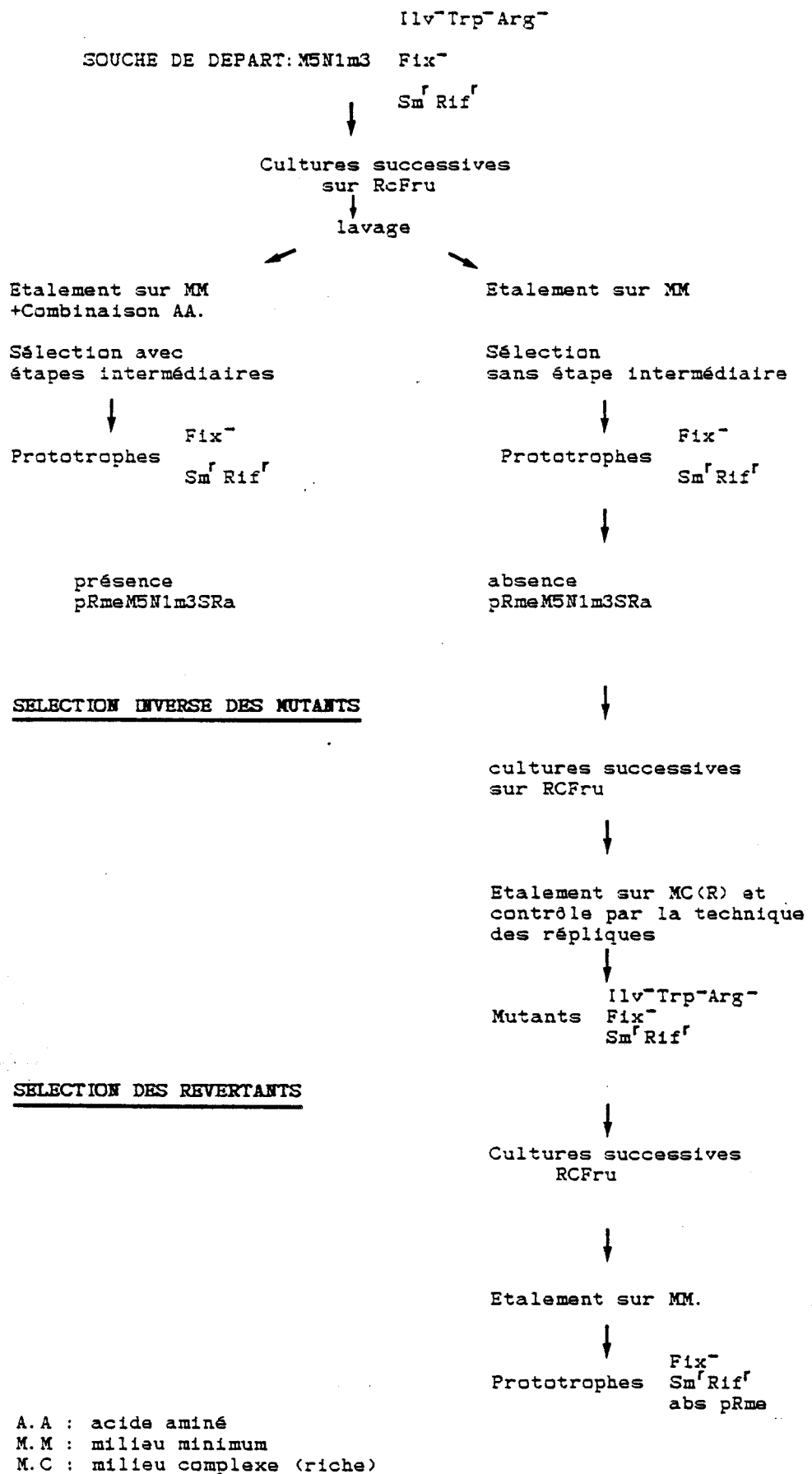


Figure 4 - Isolement des révertants.

**A B C D**

**pRmeM5N1m3SRb,c** →  
**pRmeM5N1m3SRa** →

← **RP4**

Photographie 9 - Analyse du contenu plasmidique par électrophorèse en gel d'agarose à 0.7 % du :

- A : Mutant M5N1m3SR
- B : Révertant correspondant C1
- C : Transconjugant M5N1m3SR(RP4)
- D : Révertant correspondant



chromosome et les mégaplasmites sont linéarisés). En effet, les essais d'extraction de l'ADN de deux clones révertants appelés C1 et C2, issus du mutant M5N1m3SR, ne nous ont pas permis de déceler par cette méthode la présence du pRmeM5N1m3SRa.

De même, chez tous les révertants issus du transconjugant M5N1m3SR(RP4) on distingue une bande de haut poids moléculaire qui correspond aux mégaplasmites et une bande de 36 Md correspondant au plasmide RP4 ; on note également l'absence du pRmeM5N1m3SRa (un exemple de ce type de révertant est représenté dans la photographie 9).

Le retour vers le type sauvage (prototrophe) s'accompagne dans les deux cas de la disparition du plasmide moyen pRmeM5N1m3SRa. Des essais d'isolement de révertants portant sur un ou deux caractères à la fois n'ont pu être reliés en aucun cas à l'absence de ce plasmide. Par contre, les variants prototrophes (Ilv<sup>+</sup>, Trp<sup>+</sup>, Arg<sup>+</sup>) obtenus en une seule étape montrent toujours un changement de leur contenu plasmidique par rapport à la souche M5N1m3SR.

Nous remarquons que le plasmide RP4 est toujours maintenu sous forme plasmidique dans le révertant issu du transconjugant M5N1m3SR(RP4), alors que certains auteurs ont cependant montré que les facteurs R peuvent s'intégrer à faible fréquence dans le génome de la bactérie hôte (HOLSTERS et coll. 1978, SCOTT et RONSON 1982, BRETON et coll. 1985).

L'étude du contenu plasmidique des révertants issus de mutants auxotrophes qui dérivent de différentes autres souches de *Rhizobium meliloti* contenant des plasmides de taille moyenne (cas des mutants des souches : L5-30, 41, M9S) ne montre pas, contrairement à la souche M5N1m3SR, de modification de leur profil plasmidique.

### III. - OBTENTION DE MUTANTS ILV<sup>-</sup> TRP<sup>-</sup> ARG<sup>-</sup> A PARTIR DU REVERTANT PROTOTROPHE C1

Dans les résultats précédemment décrits, nous avons remarqué un phénomène important chez les révertants prototrophes sélectionnés en une étape : la disparition du plasmide pRmeM5N1m3SRa.

Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette disparition :

- l'élimination de ce plasmide hors de la cellule bactérienne d'une part,
- son intégration dans le chromosome bactérien ou les mégaplasmides d'autre part.

L'élimination d'ADN plasmidique non essentiel pour les bactéries hôtes, par des agents chimiques ou physiques, a été décrite pour plusieurs espèces bactériennes (VASQUEZ et coll. 1983). Nous avons utilisé certains de ces agents pour tenter d'isoler des clones M5N1m3SR dépourvus du plasmide moyen. L'isolement de tels mutants permettrait éventuellement de vérifier s'il est encore possible d'obtenir des révertants prototrophes en une seule étape.

Le mutant M5N1m3SR est inoculé (environ  $10^4$  cellules/ml) dans le milieu TY contenant des agents chimiques connus pour leur pouvoir d'élimination des plasmides : acridine orange, acriflavine, bromure d'éthidium et SDS à concentrations variables. Les cultures se développant en présence de doses sub-bactériostatiques de ces produits ont été diluées et étalées sur le même milieu. L'absence de caractères marqueurs ne nous permet pas de détecter directement si le pRmeM5N1m3SRa est éliminé ou non après traitement par les produits de curage. Ainsi une centaine de clones isolés après chaque type de traitement ont été étudiés pour leur contenu plasmidique par électrophorèse en gel d'agarose. Aucun clone dépourvu du plasmide moyen n'a pu être obtenu. Des résultats identiques ont été obtenus après traitement à la chaleur. Des essais combinés (par exemple chaleur SDS) ont été utilisés mais sans succès.

Vu l'impossibilité d'obtenir des clones dépourvus du pRmeM5N1m3SRa par les agents curatifs, la première hypothèse pour expliquer la disparition du pRmeM5N1m3SRa chez les révertants prototrophes nous semble peu probable. Nous avons cherché à vérifier la seconde hypothèse.

Cette dernière hypothèse nous incite à poser la question suivante : peut-on retrouver les mêmes modifications génétiques par sélection inverse ? C'est-à-dire, est-ce que le retour global à l'auxotrophie des révertants prototrophes ( $Ilv^+$ ,  $Trp^+$ ,  $Arg^+$ ) peut provoquer la réapparition d'un plasmide similaire à celui observé dans le cas du mutant M5N1m3SR.

### **3.1 - Isolement de mutants auxotrophes à partir des révertants**

Pour répondre à cette question, nous nous sommes proposés de rechercher des clones auxotrophes ayant le phénotype  $Ilv^-$ ,  $Trp^-$ ,  $Arg^-$ . Cette recherche est réalisée à partir d'une subculture de révertants par étalement direct sur milieu riche additionné de streptomycine (400  $\mu\text{g/ml}$ ) et de rifamycine (100  $\mu\text{g/ml}$ ), et sélection des mutants auxotrophes ( $Ilv^-$ ,  $Trp^-$ ,  $Arg^-$ ) selon la technique de LEDERBERG (1952).

A partir des deux clones révertants C1 et C2, utilisés au cours de cette étude et grâce aux grandes possibilités qu'offre la technique des répliques, nous avons testé plusieurs milliers de clones. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 9 et nous indiquent que le révertant C2 est stable, puisqu'aucun clone auxotrophe n'a pu être obtenu au cours de la sélection. A partir du révertant C1, deux types de clones sont obtenus : des clones prototrophes et des clones auxotrophes ayant les mêmes exigences que le mutant d'origine (M5N1m3SR).

### **3.2 - Contenu plasmidique de ces mutants auxotrophes**

Quelques mutants auxotrophes ( $Ilv^-$ ,  $Trp^-$ ,  $Arg^-$ ) isolés à partir du révertant C1 ont alors été testés pour leur contenu plasmidique par la technique d'ECKHARDT (1978). Nous constatons (photographie 10) chez tous les clones auxotrophes la réapparition d'un plasmide moyen dont la mobilité est identique à celle du plasmide moyen du mutant M5N1m3SR ( $pRmeM5N1m3SRa$ ). Ceci est confirmé quand un mélange de cellules du mutant M5N1m3SR et d'un mutant isolé à partir du clone C1 (appelé C1.8) est soumis à une électrophorèse dans un gel d'agarose : une différence de mobilité entre le  $pRmeM5N1m3SRa$  et le  $pRmeC1.8a$  est indiscernable. Le fait que l'apparition simultanée des trois caractères d'auxotrophie ( $Ilv^-$ ,  $Trp^-$ ,  $Arg^-$ ) s'accompagne de la réapparition d'un ADN extrachromosomique de taille similaire au  $pRmeM5N1m3SRa$  indique que les deux événements sont concomittants.

Ces résultats suggèrent que des deux hypothèses émises précédemment, la seconde hypothèse est la plus vraisemblable : le  $pRmeM5N1m3SRa$  serait intégré dans le chromosome ou l'un des deux mégaplasmides de la souche M5N1m3SR dans le cas du révertant C1.

Révertants	Clones prototrophes (Ilv <sup>+</sup> , Trp <sup>+</sup> , Arg <sup>+</sup> )	Clones auxotrophes (Ilv <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup> )
C1	58 %	42 %
C2	100 %	0 %

Tableau 9 - Pourcentage de clones prototrophes et auxotrophes obtenus à partir des révertants C1 et C2 par sélection directe.

A B C D E

pRmeb,c →

pRmea →

Photographie 10 - Analyse du contenu plasmidique de 4 mutants auxotrophes issus du révertant C1.

A : Mutant M5N1m3SR  
B : Mutant C1.8  
C : Mutant C1.9  
D : Mutant C1.10  
E : Mutant C1.11

Il est important de remarquer qu'à partir du mutant auxotrophe C1.8 nous avons pu également isoler le même type de révertants prototrophes et ainsi reproduire le phénomène de réversion caractérisé par l'absence du plasmide moyen.

#### IV. - IDENTIFICATION DES REVERTANTS ET DES MUTANTS NOUVELLEMENT ISOLES

Avant d'approfondir les données obtenues dans le paragraphe précédent, nous avons vérifié les autres propriétés des révertants et mutants isolés au cours de ce travail.

##### 4.1 - Propriétés symbiotiques

Il nous a semblé indispensable de tester les propriétés symbiotiques de ces clones. Ainsi, 20 révertants (C1 à C20) et 20 mutants issus du clone C1 (C1.1 à C1.20) ont été testés pour leur efficacité. Aucune activité fixatrice d'azote n'a pu être détectée pour l'ensemble des clones analysés (tableau 10) qui conservent ainsi le caractère d'inefficacité de la souche d'origine (M5N1m3SR). La comparaison des nodules induits par les révertants, les mutants dérivés du révertant C1 et le mutant M5N1m3SR montre qu'ils ne sont pas significativement différents dans la taille, la forme et leur surface. La réversion sur les caractères d'auxotrophie n'est pas accompagnée d'un retour à l'efficacité, ce qui confirme une fois encore l'indépendance des caractères d'auxotrophie et ceux de la symbiose.

Lorsqu'on analyse le contenu des nodules, obtenus après infection de la plante par les révertants C1 et C2, nous constatons que tous les clones obtenus à partir du révertant C2 sont des clones prototrophes présentant une absence du plasmide moyen, alors que le révertant C1, après passage sur plante est susceptible d'engendrer outre des clones prototrophes (absence du plasmide moyen), des clones auxotrophes  $I_{lv}^-$ ,  $Trp^-$ ,  $Arg^-$  ayant retrouvé le plasmide moyen (tableau 11).

Il est intéressant de constater que les mêmes pourcentages de clones auxotrophes et de clones prototrophes ont été obtenus avec le révertant C1 par sélection directe en milieu solide ou par sélection indirecte après passage sur plante.

Souche	Phénotype	Résistance à		Sensibilité aux phages			Quantité d'acétylène transformée en éthylène par la nitrogénase en 7 h (nmoles/mg de poids sec)	Fréquence de lysogénie	Contenu plasmidique
		Sm	Rif	Φ7	Φ11	Φ12			
M5N1m3SR	Ilv <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup> Arg <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	0.021	5 10 <sup>5</sup>	pRmeM5N1m3SRb,c pRmeM5N1m3SRa
Révertants (C1 à C20)	prototrophe	+	+	+	+	+	0.013 à 0.038	3.9 10 <sup>5</sup> à 10 <sup>6</sup>	pRmeM5N1m3SRb,c
Mutants (C1.1 à C1.20)	Ilv <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup> Arg <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	0.011 à 0.023	5 10 <sup>4</sup> à 10 <sup>5</sup>	pRmeM5N1m3SRb,c pRmeM5N1m3SRa

**Tableau 10 - Caractéristiques des révertants prototrophes, des mutants auxotrophes issus du révertant C1, par comparaison au mutant M5N1m3SR.**

Révertants	Clones prototrophes (Ilv <sup>+</sup> , Trp <sup>+</sup> , Arg <sup>+</sup> ) absence plasmide moyen	Clones auxotrophes (Ilv <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup> ) présence plasmide moyen
C1	53.44 %	46.56 %
C2	100 %	0 %

Tableau 11 - Pourcentage de clones prototrophes et auxotrophes obtenus à partir des révertants C1 et C2 par sélection indirecte, après passage sur plante.



Il est important de signaler que la subculture avant inoculation et le milieu de NICOL et THORNTON après nodulation ont été contrôlés pour les bactéries présentes aussi bien pour leurs exigences que pour leur contenu plasmidique. Aucun plasmide de taille moyenne n'a été détecté dans ces bactéries qui étaient capables de se développer sur milieu minimum.

Si l'on suppose qu'une bactérie induit un nodule, le fait que ce phénomène se déroule dans le nodule et qu'aucun mutant exigeant n'a été trouvé avant et après la nodulation dans les milieux (milieu de culture et milieu de NICOL et THORNTON), suggère que les révertants ne pouvaient pas être des contaminants. En outre, aucun nodule n'a été observé dans le contrôle des plantules témoins non inoculées.

#### 4.2 - Typage phagique

Nous avons vérifié que les clones révertants et mutants étudiés précédemment possédaient la même sensibilité aux phages que la souche M5N1m3SR en les typant par trois phages spécifiques de celle-ci ( $\Phi 7$ ,  $\Phi 11$ ,  $\Phi 12$ ). On constate que les trois phages provoquent la lyse de l'ensemble des clones testés (tableau 10).

#### 4.3 - Fréquence de la lysogénie

Dans les expériences précédentes, nous avons remarqué que le mutant M5N1m3SR peut libérer spontanément des phages actifs contre la souche M3S de **Rhizobium meliloti**. Une étude similaire menée sur les 40 clones révertants et mutants montre qu'ils possèdent cette même propriété. Nous avons alors comparé le nombre de phages libérés par le mutant M5N1m3SR et les 40 révertants et mutants après induction par les rayons U.V., en utilisant la souche M3S comme souche indicatrice. Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau 10.

Tous les clones testés après irradiation aux U.V. montrent la présence d'un phage. Les fréquences de lysogénie des révertants et des mutants sont pratiquement similaires à celle de la souche d'origine M5N1m3SR.

Ces tests montrent clairement que les révertants et les mutants dérivent de la souche M5N1m3SR.

#### 4.4 - Temps de génération

Au cours de la recherche des mutants spontanés issus du révertant C1, nous avons noté une hétérogénéité de la croissance des colonies, décelable après étalement des bactéries sur milieu riche. Les colonies de faible diamètre correspondaient aux mutants auxotrophes, alors que celles de diamètre plus élevé correspondaient aux révertants prototrophes. En outre, en cultivant les révertants prototrophes en milieu liquide, nous avons remarqué que ceux-ci se développent plus rapidement que le mutant auxotrophe M5N1m3SR.

Nous nous sommes proposé d'établir les courbes de croissance du révertant C1 et du mutant C1.8 par comparaison à la souche sauvage M5N1 et au mutant M5N1m3SR afin de déterminer leurs temps de génération de façon précise (figure 5). Les densités optiques des cultures en milieu riche (RC glucosé 1 %) ont été suivies au moyen d'un biophotomètre.

On constate (tableau 12) que le temps de génération du révertant C1 est plus court que celui du mutant M5N1m3SR, et presque égal à celui de la souche sauvage prototrophe M5N1, alors que le temps de génération du mutant C1.8 est identique à celui du mutant d'origine M5N1m3SR.

La réduction du temps de génération du révertant C1 par rapport au mutant M5N1m3SR est due à la rectification de son métabolisme. Le réarrangement génomique semble ainsi favoriser la croissance du révertant ; en effet, son taux de croissance est similaire à celui de la souche M5N1.

Il nous a paru intéressant de poursuivre l'étude comparative du mutant M5N1m3SR et du mutant C1.8 en analysant le degré de parenté de leur plasmide moyen.

Pour caractériser deux plasmides qui existent dans deux souches différentes, plusieurs méthodes peuvent être appliquées. La méthode la plus directe est la comparaison des séquences de leur ADN. En l'absence de cette méthode, les principales méthodes utilisées sont :

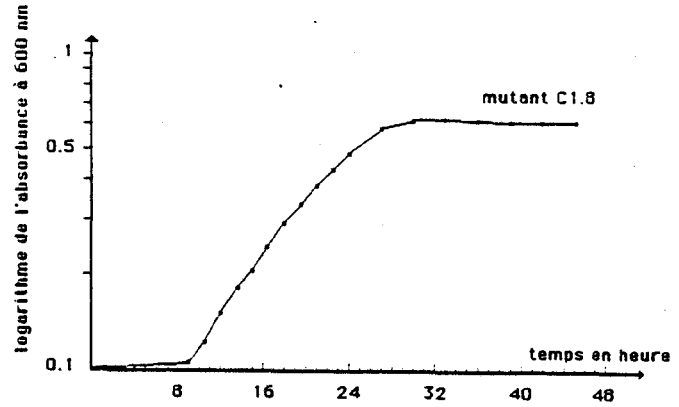
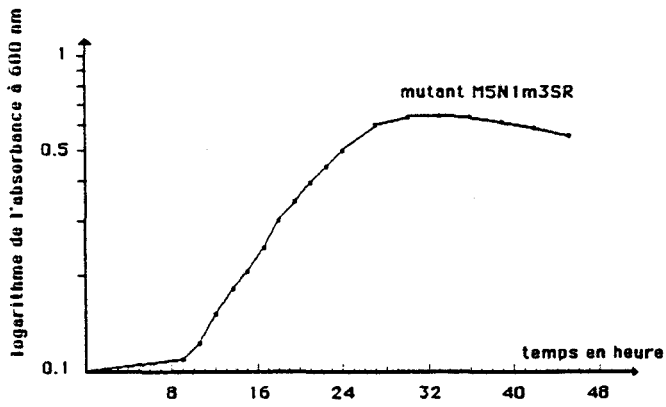
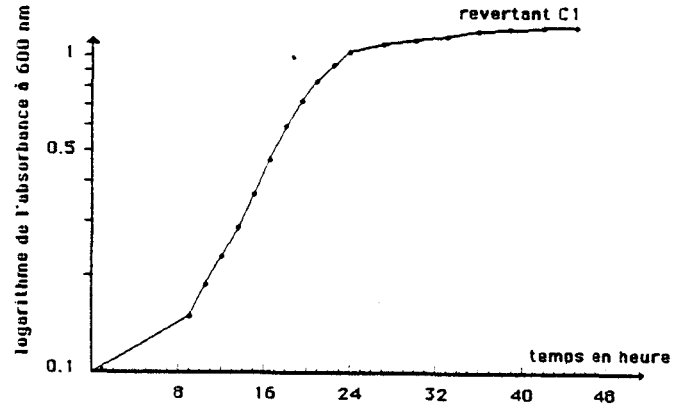
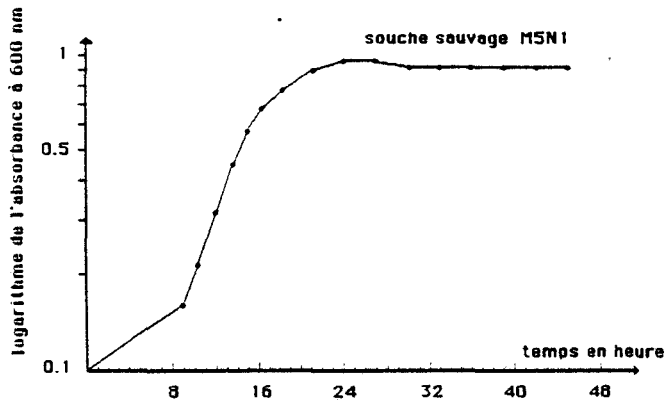


Figure 5 - Evolution de la croissance de la souche sauvage MSN1, du révertant C1 et des mutants MSN1m3 et C1.8.

Souches	Taux de croissance numérique	Temps de génération
M5N1	0.36	3h16
M5N1m3SR	0.23	4h23
C1	0.33	3h36
C1.8	0.21	4h25

Tableau 12 - Etude comparée du révertant prototrophe C1, du mutant auxotrophe C1.8 et des souches d'origine en fonction du temps de génération.

- L'hybridation globale

Cette hybridation ADN-ADN est insuffisante puisqu'elle ne révèle pas précisément les régions d'homologie des deux molécules plasmidiques.

- Analyse d'hétéroduplexes par microscopie électronique

Des liens très détaillés de parenté peuvent être établis à l'aide des points de référence (comme par exemple la forme des transposons). Cependant, cette méthode est complexe spécialement pour des molécules de poids moléculaire élevé et pour l'étude d'une large collection de plasmides.

- Profil de restriction

Dans des régions de plasmides apparentés, les sites spécifiques des endonucléases de restriction sont conservés. Ainsi l'hydrolyse complète, par ces endonucléases de restriction, de deux plasmides apparentés engendre des fragments de taille identique reconnaissables par électrophorèse.

- L'hybridation spécifique

Ce test plus précis, confirmant l'extension d'homologie et la parenté des fragments, est obtenu après clivage à l'aide d'endonucléases de restriction, par hybridation ADN-ADN. Ainsi, après transfert des fragments d'ADN sur feuille de nitrocellulose (technique de SOUTHERN), il est possible de détecter une parenté portant sur des petits fragments à l'aide d'ADN marqué. Cette approche est moins laborieuse que l'analyse d'hétéroduplexes et plus précise que l'hybridation globale.

Dans le but de déterminer avec précision si une parenté étroite existe entre le pRmeM5N1m3SRa et le pRmeC1.8a, nous avons retenu, parmi les 4 méthodes énumérées ci-dessus, la dernière méthode qui rallie deux techniques possibles : l'hydrolyse par les enzymes de restriction et l'hybridation moléculaire ADN-ADN. Plusieurs enzymes de restriction peuvent être utilisées pour comparer deux molécules dans un même gel et ainsi préciser une homologie spécifique entre les différents fragments.

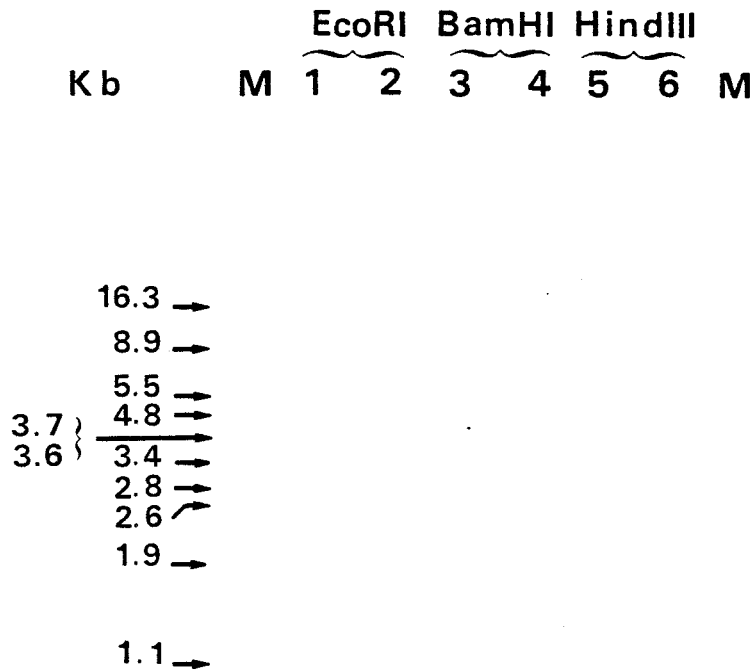
La structure moléculaire des plasmides de taille moyenne de *R. meliloti* n'est pas complètement connue jusqu'à présent, seuls leur longueur (CASSE et coll. 1979) et quelques profils de restriction (JOUANIN et coll. 1981, ADACHI et coll. 1983) ont été publiés. Cependant, peu de fonctions rattachées à ces molécules ont été découvertes.

Nous avons extrait les ADN plasmidiques du mutant M5N1m3SR et du mutant C1.8 par la méthode de CURRIER et NESTER (1976) modifiée et nous avons appliqué les deux méthodes citées ci-dessus pour réaliser notre étude comparative.

## V. - ETUDE COMPARATIVE DES PROFILS DE RESTRICTION DES DEUX PLASMIDES ISSUS DES MUTANTS M5N1m3SR ET C1.8

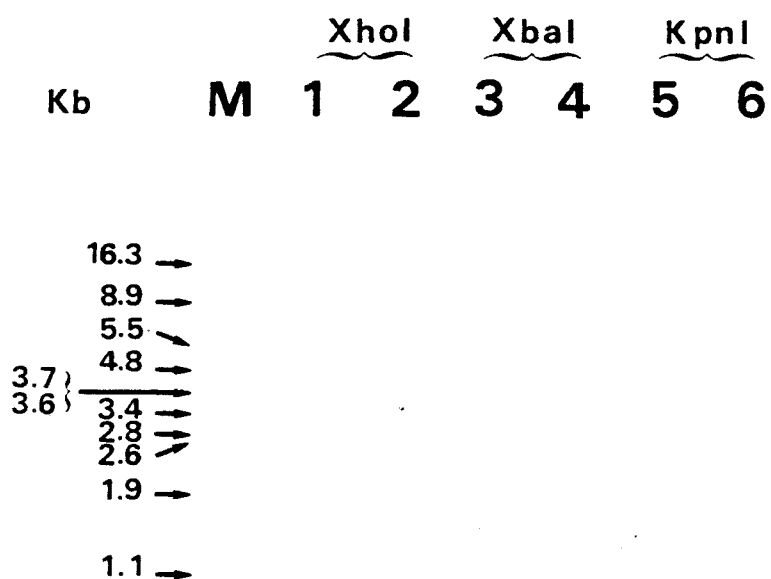
L'utilisation des endonucléases de restriction exige une purification très poussée de l'ADN à étudier. Après extraction et purification, 2 à 3 µg de chaque ADN plasmidique ont été soumis à l'action d'endonucléases de restriction, puis déposés sur un gel d'agarose à 0.7 % en vue de comparer les fragments obtenus. Nous avons utilisé les enzymes de restriction suivantes : EcoRI, BamHI, HindIII, KpnI, XbaI et XhoI.

Les résultats obtenus (photographies 11, 12) nous montrent une similitude entre les profils des plasmides pRmeM5N1m3SRa et pRmeC1.8a et ce pour tous les enzymes testés. Nous constatons notamment que les enzymes EcoRI, BamHI, HindIII et XhoI coupent ces ADN plasmidiques en de nombreux sites, ce qui engendre un nombre considérable de fragments séparés selon leur masse moléculaire. Par contre, les enzymes KpnI et XbaI engendrent un nombre réduit de fragments. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par JOUANIN et coll. (1981) qui en digérant les plasmides moyens de différentes souches de *R. meliloti* ont obtenu un nombre de fragments respectivement élevé pour les enzymes EcoRI, BamHI, HindIII et XhoI et un nombre de fragments limité pour les enzymes KpnI et XbaI. En ce qui concerne l'enzyme XbaI, la digestion engendre des fragments dont les masses moléculaires sont supérieures à 30 Kb, nous ne pouvons pas déterminer le nombre de fragments obtenus ainsi que la taille exacte de ces fragments. Cependant, le même profil de restriction est obtenu pour les deux plasmides étudiés.



Photographie 11 - Comparaison des profils de restriction du pRmeM5N1m3SRa et du pRmeC1.8a par électrophorèse en gel d'agarose à 0.7 %.

M : Marqueur, ADN du phage  $\lambda$  digéré par EcoRI et BamHI  
 1,3,5 : pRmeM5N1m3SRa  
 2,4,6 : pRmeC1.8a



Photographie 12 - Comparaison des profils de restriction du pRmeM5N1m3SRa et du pRmeC1.8a par électrophorèse en gel d'agarose à 0.7 %.

M : Marqueur, ADN du phage  $\lambda$  digéré par EcoRI et BamHI  
 1,3,5 : pRmeM5N1m3SRa  
 2,4,6 : pRmeC1.8a



L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN : elle devrait donc décroître régulièrement depuis les fragments de masse moléculaire élevée jusqu'aux fragments de faible masse moléculaire. Or, certaines bandes échappent à cette règle et émettent une fluorescence plus intense que prévu (exemple profil XhoI). L'explication en est la présence de plusieurs fragments de restriction différents, de masse moléculaire identique, contenus dans la même bande.

Nous constatons pour tous les enzymes testés, excepté XbaI, une légère différence dans le profil de restriction des deux plasmides : pRmeM5N1m3SRa et pRmeC1.8a. Cette différence ne porte que sur un ou deux fragments de masse moléculaire élevée (voir photographies 11,12). Il est possible qu'il existe d'autres différences portant sur des fragments de masse moléculaire très faible et qui ne sont pas détectés sur le gel.

Nous avons donc réalisé une électrophorèse dans un gel d'agarose à 1.5 % pour analyser et comparer les produits de digestion de petite taille obtenus à la suite de l'hydrolyse avec l'enzyme de restriction EcoRI. En effet, cet enzyme sera utilisé pour la suite de nos travaux, il est donc préférable de connaître exactement les différences de profil obtenues par cet enzyme sur les deux plasmides étudiés. Aucune différence concernant les fragments de masse moléculaire faible n'est détectée entre les profils de restriction des deux plasmides (photographie 13).

Les profils des deux plasmides moyens obtenus après l'hydrolyse par six endonucléases de restriction présentent une forte similitude. Ces résultats suggèrent que le pRmeC1.8a dérive vraisemblablement du pRmeM5N1m3SRa, toutefois une légère différence portant sur un ou deux fragments est observée. En utilisant la technique d'hybridation moléculaire, nous avons recherché une éventuelle homologie entre les fragments qui diffèrent, afin de déterminer si la différence de profil obtenue entre le pRmeM5N1m3SRa et le pRmeC1.8a est vraiment significative ou résulte d'un remaniement du pRmeM5N1m3SRa lors de son retour à l'état autonome.

Kb            M     1     2

1.9 →

1.1 →

Photographie 13 - Comparaison du pRmeM5N1m3SRa et du pRmeCl.8a digérés par EcoRI et soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 1.5 %.

M : Marqueur, ADN du phage digéré par EcoRI et BamHI  
1 : pRmeM5N1m3SRa  
2 : pRmeCl.8a

## VI. - RECHERCHE ET DETECTION DE SEQUENCES HOMOLOGUES PAR LA METHODE DE SOUTHERN

Afin d'examiner plus finement la différence de profil obtenue entre les deux plasmides pRmeM5N1m3SRa et pRmeC1.8a, nous les avons digérés par l'enzyme de restriction EcoRI. Les fragments obtenus ont ensuite été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 0.7 % puis analysés (photographie 14) par transfert et hybridation sur nitrocellulose (SOUTHERN 1975).

Nous remarquons (photographie 14) que la différence de profil entre les deux plasmides est caractérisée par la disparition d'un fragment de 7 Kb (bande EcoRI-3) du pRmeM5N1m3SRa, flèche en pointillés, et l'apparition de deux nouveaux fragments de 5.8 Kb et 3 Kb pour le pRmeC1.8a.

Nous constatons que la somme des masses moléculaires des deux nouveaux fragments du pRmeC1.8a (soit 8.8 Kb) est supérieure à la masse moléculaire du fragment EcoRI-3 du pRmeM5N1m3SRa (7 Kb).

Pour déterminer la relation qui pourrait exister entre la disparition du fragment EcoRI-3 du pRmeM5N1m3SRa et l'apparition des fragments de 5.8 Kb et 3 Kb du pRmeC1.8a, nous avons réalisé une hybridation moléculaire entre les différents fragments. Le fragment EcoRI-3 extrait du gel d'agarose selon la technique précédemment décrite a été marqué au  $^{35}\text{S}$  par "nick translation", puis hybridé avec les fragments EcoRI du pRmeM5N1m3SRa et du pRmeC1.8a selon la méthode de SOUTHERN (1975).

Les résultats de ces expériences sont visualisés sur la photographie 14 et nous montrent sans ambiguïté que l'ADN marqué correspondant au fragment EcoRI-3 du pRmeM5N1m3SRa hybride avec les deux nouveaux fragments de masse moléculaire 5.8 Kb et 3 Kb du pRmeC1.8a.

L'homologie de séquence entre le fragment EcoRI-3 de 7 Kb du pRmeM5N1m3SRa et les fragments de 5.8 Kb et 3 Kb du pRmeC1.8a semble donc évidente au travers des examens réalisés au cours de cette étude. Ces résultats démontrent que les deux plasmides sont très apparentés et que le pRmeC1.8a résulterait de l'excision du pRmeM5N1m3SRa, intégré dans le chromosome ou les mégaplasmides chez le révertant prototrophe C1.

Photographie 14 - Hybridation du pRmeM5N1m3SRa (1) et du pRmeC1.8a (2) digérés par EcoRI avec le fragment EcoRI-3 (7 kb) du pRmeM5N1m3SRa marqué au  $^{32}\text{S}$ .

- A : Electrophorèse en gel d'agarose à 0.7 %
- B : Autoradiographie
- M : Marqueur, ADN du phage digéré par EcoRI et BamHI.

En considérant l'intensité relative des taches d'hybridation au niveau de ces fragments, l'homologie de séquence est beaucoup plus grande entre la sonde et le fragment de 5.8 Kb qu'entre la sonde et le fragment de 3 Kb. L'hybridation plus faible avec le fragment de 3 Kb peut s'expliquer par le fait que ce fragment peut contenir des séquences d'origine chromosomique ou plasmidique (mégaplasmides) obtenues au cours de l'excision du plasmide moyen. Ceci est en accord avec le fait que la somme des masses moléculaires des deux fragments du pRmeC1.8a est supérieure à celle du fragment EcoRI-3.

Toutes ces observations nous ont conduit à rechercher la présence de séquences homologues au pRmeM5N1m3SRa dans le génome du révertant C1

#### VII. - DETECTION DES SEQUENCES HOMOLOGUES AU pRmeM5N1m3SRa CHEZ LE REVERTANT PROTOTROPHE C1

La découverte chez le mutant C1.8, obtenu à partir du révertant prototrophe C1, d'un élément extrachromosomique ayant la même taille et montrant un profil de restriction presque identique au pRmeM5N1m3SRa est un argument favorable à l'intégration et l'excision précise du pRmeM5N1m3SRa.

CURIALE et MILLS (1982) ont mis en évidence chez la souche LR719 de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (bactérie phytopathogène) un plasmide indigène de 98 Md capable de se répliquer d'une façon autonome ou de s'intégrer dans le chromosome bactérien. La forme intégrée du plasmide est stable mais occasionnellement certaines colonies montrent une excision de plasmides de différentes tailles. SZABO et MILLS (1984a) ont caractérisé huit de ces plasmides et les ont classés selon leur site d'excision : toutefois parmi ces huit plasmides, ils ont isolé un plasmide ayant la même masse moléculaire et le même profil de restriction que le plasmide indigène. Cependant l'excision, qu'elle soit précise ou imprécise, se produit sans expression phénotypique.

Dans notre cas, le plasmide serait intégré dans le chromosome ou les mégaplasmides et son excision semble être précise et liée à l'apparition des caractères d'auxotrophie  $I_{lv}^-$ ,  $Trp^-$ ,  $Arg^-$ , puisque les différents mutants auxotrophes issus du révertant C1 exhibent un plasmide moyen de taille identique au pRmeM5N1m3SRa, c'est-à-dire 92 Md (photographie 10).

Afin de déterminer plus précisément la localisation du pRmeM5N1m3SRa dans le révertant prototrophe C1, nous avons recherché la présence de séquences homologues au pRmeM5N1m3SRa dans les mégaplasmides du révertant C1.

Après lyse directe sur le gel et migration électrophorétique, les plasmides des mutants M5N1m3SR, C1.8 et du révertant C1 sont transférés sur nitrocellulose et hybridés avec le pRmeM5N1m3SRa purifié et marqué au  $^{35}\text{S}$ .

Les résultats obtenus (photographie 15) montrent sans ambiguïté qu'aucun signal d'hybridation n'est détecté au niveau des mégaplasmides du révertant C1 (canal 3). Cependant, au niveau de la zone de dépôt, constituée par l'ADN qui ne pénètre pas dans le gel, c'est-à-dire principalement par l'ADN chromosomique intact, une faible hybridation peut être observée.

Nous constatons que la sonde du pRmeM5N1m3SRa hybride avec le pRmeC1.8a, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment.

De cette expérience, nous pouvons en déduire que le plasmide moyen n'est pas intégré dans les mégaplasmides du révertant C1.

Nous avons alors recherché la présence de ces séquences dans le génome total du révertant C1. Après une hydrolyse des ADN totaux (chromosome et plasmides) de ces mêmes clones, par l'enzyme de restriction EcoRI, les fragments obtenus ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose puis transférés sur feuille de nitrocellulose (technique de SOUTHERN 1975).

L'hybridation de ces fragments avec le pRmeM5N1m3SRa marqué au  $^{35}\text{S}$  nous indique que l'on peut détecter des séquences homologues au pRmeM5N1m3SRa dans le génome du révertant C1 (photographie 16). On observe également que le profil d'hybridation des mutants M5N1m3SR et C1.8 est identique, ce qui montre une fois de plus l'homologie totale entre leurs deux plasmides moyens.

Nous pouvons également remarquer que l'hybridation est plus forte entre la sonde et les séquences des deux mutants qu'entre la sonde et les séquences du révertant. Cette différence d'intensité pourrait s'expliquer par le fait que le plasmide pourrait exister en plusieurs copies dans son état autonome.

Photographie 15 - Hybridation de l'ADN du pRmeM5N1m3SRa marqué au  $^{35}\text{S}$  avec les plasmides des souches :

- 1 : Mutant M5N1m3SR
- 2 : Mutant C1.8
- 3 : Révertant C1

- A : Electrophorèse en gel d'agarose (0.7 %) des lysats selon la technique d'ECKHARDT (1978).
- B : Autoradiographie

Photographie 16 - Hybridation de l'ADN du pRmeM5N1m3SRa marqué au  $^{35}\text{S}$  avec l'ADN total des souches :

- 1 : Mutant M5N1m3SR
- 2 : Mutant C1.8
- 3 : Révertant C1



De ces expériences, nous pouvons en conclure que le pRmeM5N1m3SRa est présent dans le révertant C1, sous forme intégré au chromosome.

Ainsi la souche M5N1m3SR de **R. meliloti** peut subir des réarrangements de son génome se traduisant par l'intégration de son plasmide moyen dans le chromosome.

Cette intégration que l'on observe dans le cas des révertants prototrophes est réversible : le plasmide moyen intégré peut s'exciser hors de son site d'intégration, et redonner un plasmide autonome légèrement différent au plasmide d'origine.

## DISCUSSION

Les caractères d'une bactérie peuvent être gouvernés par des gènes localisés sur deux types de molécules d'acide désoxyribonucléique : le chromosome et un ou plusieurs éléments extrachromosomiques ou plasmides. Des arguments physiques et génétiques ont permis la mise en évidence d'ADN extrachromosomique chez **Rhizobium** (PRAKASH et coll. 1980, DENARIE et coll. 1981). Des examens plus systématiques des contenus plasmidiques de plusieurs souches appartenant à des espèces différentes ont permis une caractérisation physique des plasmides en fonction de leur masse moléculaire (CASSE et coll. 1979, 1980). Cet ADN extrachromosomique est estimé à environ 10 à 30 % de l'ADN total de la bactérie (BANFALVI et coll. 1985). En effet, le mégaplasmide [présent chez toutes les souches de **Rhizobium meliloti** et dont le poids moléculaire est de l'ordre de 1 000 Md (BURKARDT et BURKARDT 1984)] représente à lui seul 20 % de l'ADN total, la taille limite du chromosome étant estimée à 5 000 Md chez les procaryotes (SCHLEGEL 1984).

Pour la souche prototrophe M5N1 ainsi que son mutant M5N1m3SR, outre leur chromosome, nous pouvons distinguer la présence de deux mégaplasmides et d'un plasmide de 92 Md.

Les révertants prototrophes obtenus en une seule étape à partir du mutant auxotrophe inefficace M5N1m3SR ont été découverts au cours d'expériences réalisées d'une part afin d'étudier la corrélation pouvant exister entre l'efficacité et les caractères d'auxotrophie, et d'autre part, afin de contrôler la fréquence de réversion du mutant M5N1m3SR utilisé comme souche réceptrice dans les expériences de conjugaison. Ces révertants sont caractérisés par l'absence du pRmeM5N1m3SRa (92 Md).

Nous avons reproduit le phénomène de réversion en utilisant un transconjugant M5N1m3SR(RP4). Les plasmides R se répliquent d'une manière autonome chez les bactéries hôtes, cependant, ils sont capables d'intégrer occasionnellement le génôme de la bactérie hôte (SCOTT et RONSON 1982, BRETON et coll. 1985). Dans les révertants prototrophes issus du transconjugant M5N1m3(RP4), le facteur RP4 est resté à l'état libre, et la totalité des résistances aux antibiotiques conférées par ce plasmide sont exprimées.

Il ne nous a pas été possible de déterminer la fréquence d'apparition des révertants qui reste un événement aléatoire.

Nous avons tenté d'isoler des révertants prototrophes à partir d'autres mutants de *Rhizobium meliloti* possédant un plasmide de taille moyenne. Contrairement à la souche M5N1m3SR de *R. meliloti*, aucun révertant n'a pu être isolé impliquant ce plasmide dans le phénomène de réversion des caractères d'auxotrophie.

Des mutants auxotrophes de *R. lupini* obtenus par traitement aux rayons  $\gamma$  (gamma) ont été isolés et caractérisés par ROY et MISHRA (1976) ; certains de ces mutants auxotrophes sont instables et sont capables de réverser vers le type sauvage après quelques générations. Cependant, aucune étude n'a été réalisée en vue de corréler la réversion des caractères d'auxotrophie à un quelconque remaniement génomique.

L'étude des propriétés symbiotiques (l'aptitude à former des nodules altérés et l'incapacité de fixer l'azote atmosphérique), le caractère de lysogénie, la sensibilité aux phages et la résistance aux antibiotiques, permettent de confirmer que les révertants dérivent du mutant inefficace M5N1m3SR.

A partir d'un révertant prototrophe, nous avons pu isoler des mutants auxotrophes présentant les mêmes exigences que le mutant de départ M5N1m3SR (*Ilv*<sup>-</sup>, *Trp*<sup>-</sup>, *Arg*<sup>-</sup>), caractérisés par la réapparition d'un plasmide de taille similaire au pRmeM5N1m3SRa. Une grande similitude dans les profils de restriction des plasmides pRmeM5N1m3SRa et pRmeC1.8a est obtenue après action des endonucléases de restriction : EcoRI, BamHI, HindIII, KpnI, XhoI et XbaI. Nous avons par ailleurs démontré par hybridation moléculaire que le fragment EcoRI-3 (7.8 Kb) du pRmeM5N1m3SRa, absent dans le profil du pRmeC1.8a possède une homologie avec les deux fragments EcoRI de 5.8 Kb et 3 Kb apparus dans celui-ci, ceci confirme l'étroite

parenté entre les deux plasmides. JOUANIN et coll. (1981) et ADACHI et coll. (1983) ont isolé des plasmides moyens de différentes souches de *R. meliloti* et les ont comparés par des digestions avec des endonucléases de restriction et par hybridation moléculaire. Ils ont constaté que les plasmides de taille moyenne de différentes souches de *R. meliloti* hydrolysés par une même enzyme de restriction produisent des bandes qui ne sont pas communes après migration en gel d'agarose. D'autre part, SADOWSKY et BOHLOOL (1983) ont constaté par digestion de trois plasmides de masse moléculaire identique provenant de trois souches différentes de *R. japonicum*, que le profil de restriction obtenu par une même enzyme de restriction est différent d'un plasmide à un autre et révèle l'absence de bandes communes.

La détection par hybridation moléculaire des séquences homologues au pRmeM5N1m3SRa sur le chromosome du révertant C1 permet d'expliquer le passage du mutant M5N1m3SR au mutant C1.8 via le stade révertant dans lequel le plasmide moyen serait intégré dans les séquences chromosomiques. Ce plasmide serait alors capable de s'exciser hors de son site d'intégration chromosomique pour reformer un plasmide presque identique au pRmeM5N1m3SRa : le pRme C1.8a contenant en plus des séquences probablement d'origine chromosomique. L'étude du révertant prototrophe C1 et de ses mutants dérivés nous ont permis d'observer un phénomène intéressant se traduisant par un réarrangement génomique de la souche M5N1m3SR.

Le phénomène génétique de l'intégration de plasmides indigènes dans le chromosome suivie d'une excision qui résulte dans la formation de nouvelles catégories de plasmides a été antérieurement reporté pour certaines souches phytopathogènes de *Pseudomonas* : une souche de *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* possède un plasmide de 98 Md qui se réplique d'une manière autonome ou qui peut s'intégrer dans le chromosome bactérien (CURIALE et MILLS 1982). L'excision précise ou imprécise de ce plasmide conduit à la production d'une famille de plasmides ayant une taille comprise entre 23 et 176 Md dont quelques uns contiennent de grands segments d'ADN chromosomique (QUANT et MILLS 1984, SZABO et MILLS 1984b). Trois séquences répétitives distinctes ont été identifiées sur ce plasmide et impliquées dans l'intégration de celui-ci dans le chromosome (SZABO et MILLS 1984a). Contrairement à notre cas, l'intégration n'est pas accompagnée d'une expression phénotypique.

Des études récentes indiquent que le génome de **R. japonicum** est instable et capable de subir une réorganisation spontanée entre plasmides indigènes et chromosome (BERRY et ATHERLY 1984). D'ailleurs, ces réorganisations génomiques pourraient expliquer d'une part la grande variété de molécules d'ADN plasmidiques indigènes identifiées chez **R. japonicum** et d'autre part le fait que l'organisation des gènes de structure de fixation d'azote (*nif*) est différente dans certaines souches. D'autre part, HEUMANN et coll. (1984) ont observé que des conditions de stress tels que les produits chimiques (agents mutagènes) et la chaleur peuvent provoquer un réarrangement total de l'ordre des gènes chez les **Rhizobiacées**. Ces réarrangements tributaires du temps sont réversibles : ce qui explique la fluidité du génome des **Rhizobiacées**. Le mécanisme et le degré de cette élasticité génomique sont vraisemblablement fortement régulés.

Dans notre cas, nous ignorons si l'intégration de ce plasmide est un phénomène naturel ou se produit suite à une exposition des cellules dans un milieu défavorable, la réversion du mutant M5N1m3SR pourrait être expliquée comme un moyen de survie dans de telles conditions.

Le plasmide moyen (pRmeM5N1m3SRa), durant son évolution, a vraisemblablement acquis des gènes qui codent pour des fonctions essentielles, son élimination de la cellule serait létale. En effet, dans des essais d'élimination de ce plasmide chez le mutant M5N1m3SR, nous n'avons pas réussi à obtenir des clones dépourvus de ce plasmide indigène après traitement par des agents curatifs, bien que ces agents curatifs ont permis à ZURKOWSKI et coll. (1978) de supprimer l'infectivité chez **R. trifolii**. Cependant, certains plasmides de **Rhizobium** semblent être récalcitrants à ce type de curage (ZURKOWSKI 1982).

A notre connaissance, peu de fonctions ont été rattachées à l'ADN des plasmides de taille moyenne. Récemment, TORO et OLIVARES (1986b) ont mis en évidence un rôle d'activateur de nodulation pour un plasmide moyen de la souche GR4 de **R. meliloti** (pRmeGR4b : 140 Md).

Ces molécules contiendraient peut être des gènes responsables de voies métaboliques classiques ou particulières en rapport ou non avec la symbiose. Cette idée émane de la comparaison avec la bactérie la plus directement liée au **Rhizobium** du point de vue taxonomique : **Agrobacterium tumefaciens**. En effet, toutes les souches de cette espèce (pathogènes pour des plantes supérieures) possèdent un

plasmide Ti ("Tumor-inducing") : agent provoquant le cancer végétal ou "crown-gall" (VAN LAREBEKE et coll. 1975) et dont certains gènes sont concernés dans le métabolisme d'acides aminés inhabituels tels que la nopaline et l'octopine (WATSON et coll. 1975). Les opines constituent des substrats de croissance pour les souches d'**Agrobacterium** qui hébergent les plasmides Ti (MONTROYA et coll. 1977).

Des études similaires réalisées par TEMPE et coll. (1982) ont montré que les nodosités obtenues sur la luzerne par la souche L5-30 de **Rhizobium meliloti** contiennent des composés nouveaux qui sont des substrats de croissance spécifiques pour cette souche. Ces composés pourraient jouer, dans ces nodosités, un rôle analogue à celui attribué aux opines dans les tumeurs de crown gall. Signalons que d'autres auteurs ont rapporté la présence de substances spécifiques (composés aminés non identifiés) de la souche dans des nodosités de légumineuses (WERNER et coll. 1980).

De même, KONDOROSI et coll. (1983b) ont démontré dans des expériences de transfert du pSym de la souche 41 (pRme41b) de **R. meliloti** à d'autres espèces, que l'aptitude à utiliser l'octopine est codée par ce plasmide.

D'après nos résultats, nous pouvons établir une relation entre l'expression phénotypique et le contenu plasmidique des révertants prototrophes et des mutants qui en dérivent. Le plasmide moyen porterait des gènes de métabolisme intermédiaire et notamment les gènes de biosynthèse des acides aminés : isoleucine-valine, tryptophane et arginine qui ne s'exprimeraient pas dans la cellule bactérienne lorsque le plasmide est à l'état libre. PARES et coll. (1974) et JOFRE et coll. (1979) ont montré que chez la souche C3 de **K. pneumoniae**, des gènes impliqués dans le métabolisme intermédiaire tel que la biosynthèse de la proline et de l'acide glutamique sont portés par un plasmide de 57 Md. Le transfert de cet élément extrachromosomique à des mutants Pro<sup>-</sup> d'**E. coli** a permis d'établir que les loci proA et proB sont complémentés et non le locus proC (TOMAS et coll. 1982). Ce problème est compliqué par le fait que **Rhizobium** peut exister sous deux formes : une forme libre dans le sol où les gènes portés par les plasmides ne s'exprimeraient pas tels que les gènes de fixation d'azote du plasmide pSym, et une forme symbiotique à l'intérieur des nodules où les gènes seraient dérprimés. En effet, des expériences d'hybridation entre l'ADN plasmidique et l'ARN messager synthétisé d'une part par la bactérie libre et, d'autre part, par le bactéroïde endosymbiotique, ont confirmé que les gènes localisés sur un plasmide de **Rhizobium leguminosarum** ne s'expriment que dans le bactéroïde (KROL

et coll. 1982a). De même, la comparaison du profil des protéines d'une souche sauvage de **R. trifolii** et de son mutant Nod<sup>-</sup> dépourvu de son pSym ne révèle aucune différence, ce qui implique que les gènes portés par ce plasmide ne sont pas exprimés dans les cellules à l'état libre (VERMA et LONG 1983).

Les changements de métabolisme qui se produisent dans le bactéroïde sont probablement la conséquence d'une dérégulation de certains gènes. A côté de ces modifications du métabolisme, une augmentation du contenu en ADN, en corrélation avec la taille du bactéroïde, est généralement constatée (REIJNDERS et coll. 1975, BISSELING et coll. 1977, PAAU et coll. 1977).

Dans le cas des révertants, l'expression des gènes varie selon que le plasmide est à l'état intégré ou autonome. On pourrait envisager qu'à l'état autonome, la configuration circulaire fermée superhélicoïdale des plasmides empêcherait l'expression de leurs déterminants génétiques ; par contre, à l'état intégré la modification de structure du plasmide permettrait l'accessibilité aux molécules de régulation et l'expression des gènes deviendrait possible. Il existerait donc deux copies de ces gènes dans la cellule, l'une localisée sur le chromosome et l'autre sur les plasmides.

L'existence du même gène sur le chromosome et les plasmides est plausible ; en effet, une double localisation du même gène sur le matériel génétique a déjà été décrite. Des expériences d'hybridation moléculaire ont révélé que les gènes impliqués dans la synthèse de la phosphoribulokinase (PRK) sont localisés sur le chromosome et sur le mégaplasmide pHG1 d'**Alcaligenes eutrophus** (KLINTWORTH et coll. 1985). Les travaux de BARBOUR et coll. (1985) suggèrent la présence des gènes nif à la fois sur le chromosome et les plasmides ; il est donc possible que les gènes nif soient localisés sur un élément transposable permettant ainsi une duplication à différente localisation dans le génome de **Rhizobium fredii**. De plus, la mise en évidence au laboratoire de deux enzymes ayant une activité  $\beta$ -galactosidasique chez **R. meliloti** est en faveur de l'existence de la duplication de certains gènes (NIEL et coll. 1977).

Le mécanisme selon lequel le plasmide moyen s'intégrerait dans le chromosome n'a pas été élucidé. Diverses hypothèses peuvent être envisagées, l'insertion peut se produire : par recombinaison homologue ou par recombinaison illégitime telle que la transposition.

L'isolement de mutants M5N1m3SR RecA<sup>-</sup> devrait nous permettre de déterminer si l'intégration du pRmeM5N1m3SRa dans le chromosome s'est produite par recombinaison homologue. En effet, chez *E. coli*, le gène RecA est impliqué dans le processus de recombinaison homologue ainsi que dans la réparation de l'ADN endommagé (HANAWALT et coll. 1979).

BETTER et HELINSKI (1983) ont pu isoler et caractériser le gène RecA de la souche 102F34 de *R. meliloti* et ont montré qu'il présentait des homologies de séquence avec le gène RecA d'*E. coli*, ce qui pourrait nous permettre d'obtenir des mutants RecA<sup>-</sup> chez d'autres souches de *R. meliloti* par la technique de la mutagenèse dirigée (RUVKUN et AUSUBEL 1981).

Le réarrangement génétique aboutissant à la réversion des trois caractères à la fois pourrait être le résultat d'une insertion type transposition ; en effet, la mise en évidence des éléments d'ADN transposables qui remettent en question la stabilité du matériel génétique bactérien rend plausible cette hypothèse (COHEN 1976).

La recombinaison par insertion de site spécifique nécessite la présence d'éléments tels que les éléments d'insertion (IS). Les éléments IS sont largement distribués dans les espèces bactériennes et leur présence dans le génome des **Rhizobiacées** a été récemment démontrée (PRIEFER et coll. 1981, RUVKUN et coll. 1982, KALUZA et coll. 1985). Ces éléments peuvent servir comme des promoteurs mobiles tels que les IS2 et IS3 qui constituent des promoteurs forts permettant la lecture des gènes adjacents. Ainsi le gène silencieux ArgE d'*E. coli* est activé par l'intégration d'un IS3 dans l'orientation II (ZAFARULLAH et coll. 1981). Les séquences répétées inversées, quoique n'étant pas trouvées dans tous les éléments transposables, sont invoquées lors du processus de transposition. Les éléments spécifiques d'insertion IS du facteur F servent, comme des sites, pour la recombinaison et la formation de plasmides F-prime. La présence de telles séquences a été décrite par BAZETOUX (1983) pour deux plasmides de taille moyenne de *R. meliloti* (souches L5-30 et 41), leur taille de 0.90 à 1.5 Kb les apparente aux transposons bactériens:

Il serait intéressant de déterminer si des séquences d'insertion sont localisées sur le pRmeM5N1m3SRa et le chromosome de la souche M5N1m3.

Une conséquence de la recombinaison entre les plasmides et le chromosome-hôte est la production de nouvelles combinaisons de gènes tant sur le chromosome que sur les plasmides obtenus après excision.

Quoiqu'il en soit, les mécanismes d'intégration et d'excision du pRmeM5N1m3SRa dans le chromosome-hôte restent à déterminer. L'isolement d'un mutant M5N1m3SR dépourvu du pRmeM5N1m3SRa serait intéressant : l'obtention d'un tel clone nous permettrait d'éclaircir l'implication du pRmeM5N1m3SRa dans le phénomène de réversion des caractères d'auxotrophie. Pour des raisons inconnues, aucun clone ayant perdu le pRmeM5N1m3SRa n'a pu être isolé.



## Megaplasmid transfer and incompatibility between plasmids of two different strains of *Rhizobium meliloti*

K. R. Maoui, M. Béchet and J. B. Guillaume

Laboratoire de Microbiologie, Université des Sciences et des Techniques,  
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

### Abstract

The conjugal transfer of a megaplasmid between two different strains of *Rhizobium meliloti* is reported. This intraspecific transfer was mediated by RP4 which had been previously introduced into the wild-type strain RCR2011. Transfer of plasmid RP4 from this Nod<sup>+</sup> Fix<sup>+</sup> strain to an auxotrophic Nod<sup>+</sup> Fix<sup>-</sup> mutant (M5N1m3SR) occurred at frequencies of  $3.6 \times 10^{-5}$  to  $1.1 \times 10^{-6}$  per recipient bacterium. Plasmid RP4 was able to mobilize *fix* markers at a frequency of  $10^{-6}$  or higher. Recombinants reduced acetylene at rates similar to the donor strain. An alteration in the plasmid content was observed in Fix<sup>+</sup> recombinants, showing an incompatibility between the incoming megaplasmid and the indigenous middle-sized pRme plasmid of the recipient. These results indicate that simultaneous mobilization and transfer of both chromosomal genes and a megaplasmid can be induced by RP4 between two different strains of *R. meliloti*.

### Introduction

To date, all strains of *Rhizobium meliloti*, the lucerne endosymbiont, which have been studied harbour plasmids of very high molecular weight (> 450 Md; Rosenberg *et al.*, 1982). These megaplasmids (pSym) have been shown to support genetic determinants involved in nodulation (*nod* genes) and nitrogen fixation (*nif* and *fix* genes) (Bánfalvi *et al.*, 1981; Rosenberg *et al.*, 1981). These symbiotic genes are clustered within a relatively small region of the pSym (Long *et al.*, 1982).

PI incompatibility group R plasmids have proved useful in establishing circular linkage maps of several *R. meliloti* strains (Meade and Signer, 1977; Kondorosi *et al.*, 1977; Casadesús and Olivares, 1979). Using R68.45-mediated chromosome mobilization, some *fix* determinants have been recently shown to be located on the *R. meliloti* chromosome (Forrai *et al.*, 1983). Since *R. meliloti* megaplasmids do not exhibit self-transmissibility at satisfactory frequencies, mobilising systems have been devised to enhance their transfer into some strains of the Rhizobiaceae (Kondorosi *et al.*, 1982; Simon *et al.*, 1983).

We report here the conjugational transfer of *fix* genes from a wild-type *R. meliloti* to an auxotrophic fixation-negative (Fix<sup>-</sup>) mutant derived from another *R. meliloti* strain. Restoration of nitrogen-fixing ability in the recipient was accompanied by the transfer of a megaplasmid from the donor. This resulted in the exclusion of the middle-sized (pRme) plasmid of the recipient.

## Materials and methods

### Bacteria, plasmid and rhizobiophages

*Escherichia coli* strain K12 J53/RP4 (Pro<sup>-</sup> Met<sup>-</sup>/RP4) was obtained from M. Van Montagu (Belgium). *Rhizobium meliloti* wild-type strains RCR2011 (received from J. Dénarié, France) and M5N1 (isolated in our laboratory from lucerne root nodules) were fully effective in symbiosis (Nod<sup>+</sup>, Fix<sup>+</sup>). The P1 incompatibility group plasmid RP4 is self-transmissible and confers resistance to kanamycin (Km), ampicillin (Ap) and tetracycline (Tc). *R. meliloti* specific-phages  $\Phi$ 7,  $\Phi$ 11 and  $\Phi$ 12 were isolated in this laboratory.

### Media and growth conditions

*Rhizobium* complex (RC) and minimal (R) media have been described earlier (Ali *et al.*, 1981; Ali *et al.*, 1984). Difco Bacto-agar (1.5%) was added for solid media. Selective media were supplemented with: isoleucine + valine, tryptophan and arginine (30  $\mu$ g/ml); biotin (10 ng/ml) and thiamine (0.5  $\mu$ g/ml); streptomycin sulphate (Sm; 400  $\mu$ g/ml), rifampicin (Rif; 100  $\mu$ g/ml), and tetracycline-HCl (10  $\mu$ g/ml) as required.

TY medium (Beringer, 1974), with mannitol at 1% (w/v), was used for protein extraction.

### Mutagenesis procedure

Bacteria grown to exponential phase in RC medium were treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (300  $\mu$ g/ml) in 90 mM Tris-50 mM maleic acid buffer (pH 6.65) for 30 min. After subculture the cells were grown in R minimal medium, and enrichment in auxotrophic mutants was done by adding penicillin G (3,000 U/ml) and sucrose (25% w/v).

### Isolation and characterization of auxotrophic mutants

Separate colonies grown on RC agar were replicated onto R agar. Auxotrophic mutants were checked for their requirements by the method of Holliday (1956).

### Plant inoculation test

Lucerne seedlings (*Medicago sativa* L. cv Magali) were grown aseptically in 20 × 200 mm tubes containing 20 ml of nitrogen-free Nicol and Thornton (1941) medium at 22°C with a day duration of 16 h. To minimize reversion, 1-week-old plants were each inoculated with about 10<sup>6</sup> bacteria. The visual appearance of the plants was examined and nodulation scored after 8 weeks. Acetylene reduction activity of whole plants (Hardy *et al.*, 1968) was assayed.

### Conjugation

The cultures of the donor and recipient bacterial strains grown to late exponential phase in RC medium were mixed in 1:1 ratio. The mixture was filtered through a Sartorius membrane (0.2  $\mu$ m pore size), which was incubated on RC agar for 24 h at 30°C. Bacteria were washed twice in R medium, diluted and plated onto selective media. Counter-selection for donor (RCR2011/RP4) was obtained by streptomycin and rifampicin.

Recombinants were selected on R agar + Sm + Rif supplemented with appropriate combinations of the following amino-acids: arginine, isoleucine + valine and tryptophan.

RC agar supplemented with streptomycin, rifampicin and tetracycline was used to select Tc<sup>R</sup> transconjugants. The transfer frequency was calculated as the number of recombinants (or transconjugants) per total recipients.

#### Phage-typing

Sensitivity to rhizobiophages was checked by spotting drops of high titre phage suspensions ( $10^9$ – $10^{10}$  PFU/ml) onto bacterial lawns spread on RC agar.

#### Detection of plasmids on agarose gels

The method of Eckhardt (1978) was adapted as described by Pühler *et al.* (1982). Electrophoresis was performed in 0.5% (w/v) agarose (Sigma) gels to permit a better resolution of the DNA bands corresponding to megaplasmids.

#### SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Soluble proteins were prepared according to Kersters and De Ley (1975). Bacteria grown to early stationary phase were harvested, washed in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0), and then in 3 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). The cells were disrupted by sonication after suspension in the same buffer. Intact bacteria and debris were removed by centrifugation at  $15,000 \times g$  for 15 min at 4°C. The supernatant was centrifuged at  $80,000 \times g$  for 5 h at 4°C in a Beckman rotor SW50.1. These cell-free extracts contained the soluble proteins and were stored at –20°C.

Protein concentration of the supernatant was determined by the method of Lowry (1951). Electrophoresis, staining of protein bands and photography of the stained gels were performed according to Laemmli (1970).

## Results

#### Isolation and symbiotic properties of auxotrophic mutants

To obtain single and multiple marked strains, *R. meliloti* strain M5N1 was subjected to successive NTG mutageneses and enrichments. Phenotypic characteristics and symbiotic behaviour of the auxotrophic mutants obtained are listed in Table 1.

The third NTG treatment generated two auxotrophs (M5N1m3, M5N1m4) which had the same nutritional requirements. Lucerne nodules containing mutant M5N1m4 reduced as much acetylene as those of the wild-type strain M5N1, while nodules induced by mutant M5N1m3 were altered in their morphology (Figure 2) and produced about a 100-fold less ethylene than M5N1. Moreover, plants nodulated by M5N1m3 showed a complete starvation which could not be abolished by the addition of exogenous arginine (30 µg/ml) in the plant medium (data not shown).

It was also found that all the different classes of revertants of strain M5N1m3 (including prototrophs) failed to induce the formation of nitrogen-fixing nodules. Thus, it was concluded that Fix<sup>-</sup> phenotype of M5N1m3 was not linked to its nutritional requirements. The number and location of NTG-generated *fix* mutations were unknown.

**Restoration of M5N1m3 Fix<sup>-</sup> phenotype by conjugal transfer**

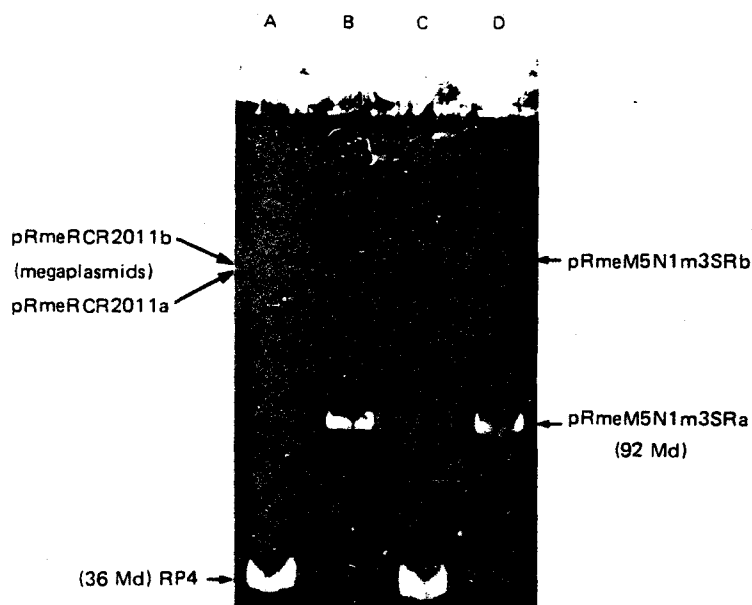
To determine whether the nitrogen-fixing ability (Fix<sup>+</sup> phenotype) could be transferred by conjugation into mutant M5N1m3 (Ilv<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>, Arg<sup>-</sup>, Nod<sup>+</sup>, Fix<sup>-</sup>), *R. meliloti* wild-type strain RCR2011/RP4 was chosen as donor. This derivative had been obtained by mating RCR2011 with *E. coli* J53/RP4, and furthermore by counterselecting on R agar supplemented with tetracycline. In order to eliminate the donor RCR2011/RP4, a spontaneous Sm<sup>R</sup> Rif<sup>R</sup> derivative of mutant M5N1m3 was isolated and used as a recipient (M5N1m3SR).

First, the two parental strains used in these crosses were analysed for their plasmid contents. Figure 1 shows the relative electrophoretic mobilities of indigenous plasmids in each strain. The donor strain exhibited two close bands, each corresponding to a very high molecular weight plasmid (confirming recent observations done by Pühler *et al.*, 1984), and another band of greater mobility corresponding to RP4. The recipient harboured one megaplasmid (pRmeM5N1m3SRb) which was found to migrate identically to the pRmeRCR2011b megaplasmid, and a second plasmid (pRmeM5N1m3SRa) of molecular weight approximately 92 Md. This value was estimated by comparison with *R. meliloti* large plasmids of known molecular weight (Casse *et al.*, 1979).

**Table 1** Characteristics of auxotrophic mutants derived from *R. meliloti* wild-type strain M5N1

Strain	Phenotype	Symbiotic properties*
M5N1		Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>
M5N1m1	Ilv <sup>-</sup>	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>
M5N1m2	Ilv <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup>	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>
M5N1m3	Ilv <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup> Arg <sup>-</sup>	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>
M5N1m4	Ilv <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup> Arg <sup>-</sup>	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>
Revertants of mutant M5N1m3	All combinations	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>

\* Nod<sup>+</sup>, ability to form nodules on lucerne roots; Fix<sup>+</sup>, ability to fix nitrogen in symbiosis (and to reduce acetylene).



**Figure 1** Plasmid contents of the parental strains (3 mm thick vertical agarose gel; run parameters, 20 V for 1 h and then 130 V for 4 h). A and C, donor RCR2011/RP4; B and D, recipient M5N1m3SR. The strains were alternated to show reproducibility of the two megaplasmid bands of the donor (upper bands).

Afterwards, crosses between RCR2011/RP4 and M5N1m3SR were effected. They yielded  $Tc^R$  transconjugants at frequencies ranging from  $3.6 \times 10^{-5}$  to  $1.1 \times 10^{-8}$ . These were found to be  $Fix^-$  (data not shown). We then looked for recombinants on R agar + Sm + Rif alone or supplemented with different combinations of the growth requirements of the recipient strain (arginine, isoleucine + valine, tryptophan). On these selective media, recombinants arose at frequencies ranging from  $2.0 \times 10^{-5}$  to  $3.8 \times 10^{-6}$  (average values from two experiments), while the reversion of the auxotrophic markers carried by the recipient occurred at a frequency of  $4.0 \times 10^{-7}$  or less. The spontaneous mutation frequency of RCR2011/RP4 to streptomycin and rifampicin resistances was less than  $10^{-9}$ .

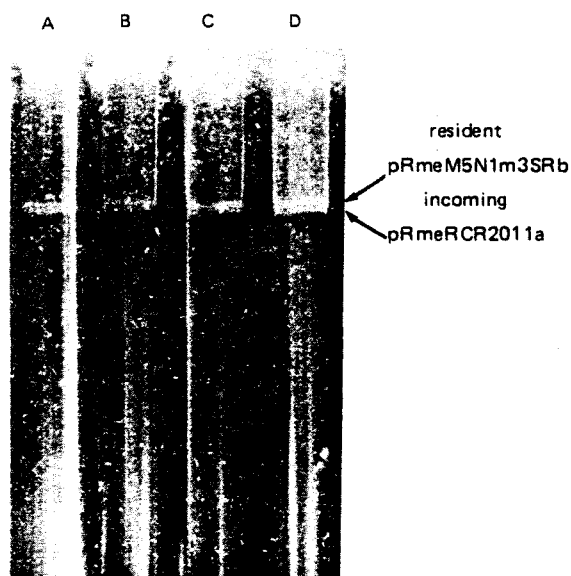
#### **Symbiotic properties and plasmid contents of some recombinants**

Eight recombinants were picked up at random from the different selective media and purified by streaking onto the same media. When inoculated to sterile lucerne seedlings, they were found to induce the formation of nodules which reduced as much acetylene as those nodulated by the donor (Table 2). Moreover, the nodules induced by the donor RCR2011/RP4 and  $Fix^+$  recombinants were similar: pink, regular and oblong, while the nodules obtained with the recipient were white, deformed and exhibited a hairy surface (Figure 2). Thus, transfer of *fix* determinants had occurred from the donor RCR2011/RP4 to the  $Fix^-$  recipient.



**Figure 2** Morphology of root nodules induced by: A and D, donor RCR2011/RP4 (x 2 and x 10, respectively); B and E, recipient M5N1m3 (x 4 and x 10); C and F, Fix<sup>+</sup> recombinants (x 2 and x 10, respectively).

These results led us to analyse the plasmid contents of Fix<sup>+</sup> recombinants on Eckhardt gels. Figure 3 shows the plasmid profiles of four Fix<sup>+</sup> recombinants. Compared with those of the parental strains (Figure 1), all these recombinants showed two plasmid bands corresponding to two slightly separated megaplasmids. Neither RP4 nor the middle-sized plasmid of the recipient was apparent in the Fix<sup>+</sup> recombinants. In contrast, the plasmid

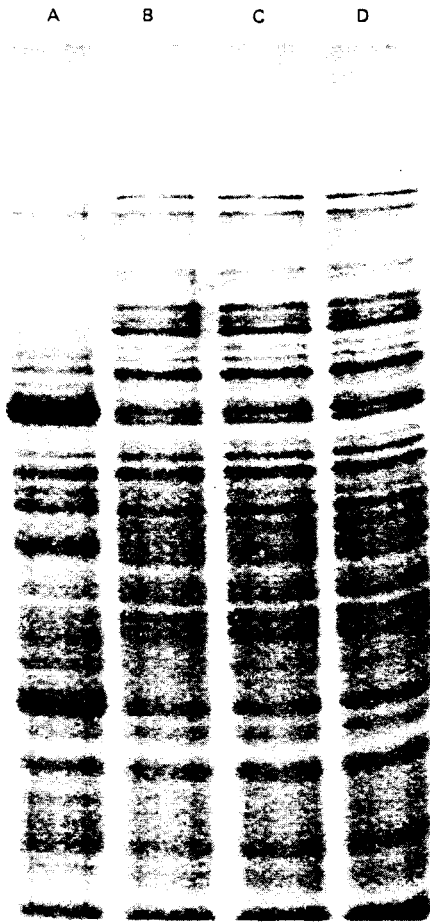


**Figure 3** Plasmid profiles of four  $\text{Fix}^+$  recombinants. A and B, prototrophic recombinants; C and D,  $\text{Ilv}^-$  recombinants (same conditions as in Figure 1).

profiles of some  $\text{Tc}^R$  transconjugants were found to be identical to those of the recipient M5N1m3SR, and to contain an additional fast-migrating band corresponding to RP4 (results not shown).

To determine if these  $\text{Fix}^+$  recombinants were derived from the recipient strain M5N1m3SR, they were checked for coheritance of unselected markers, resistance to antibiotics and sensitivity to three rhizobiophages. As shown in Table 2, four recombinants still carried the  $\text{Ilv}^-$  phenotype of the recipient, whereas the other four were prototrophic. As the recipient, all recombinants were  $\text{Sm}^R$   $\text{Rif}^R$  but  $\text{Tc}^S$ , indicating that they had not acquired RP4. They also exhibited the same phage sensitivity pattern as the recipient, except for phage  $\Phi 11$ .

To ascertain completely the origin of the recombinants, we examined the electrophoretic patterns of soluble proteins of donor, recipient and two recombinants, using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. This experiment (Figure 4) clearly showed that the protein fingerprints of the two recombinants and the recipient strain were closely related compared to the donor 2011/RP4. Thus, it was evident that the recombinants had retained a number of characteristic features of the recipient strain and were stable, *i.e.* they did not segregate strains with the parental phenotype upon purification.



**Figure 4** Electrophoretic patterns of soluble proteins (80  $\mu$ g per sample; 1.5 mm thick vertical 10% polyacrylamide gel; 60 V for 16 h) extracted from: A, donor RCR2011/RP4; B, recipient M5N1m3SR; C, prototrophic  $\text{Fix}^+$  recombinant; and D,  $\text{ilv}^- \text{Fix}^+$  recombinant.

### Discussion

Our results indicate that genetic information coding for a  $\text{Fix}^+$  phenotype (capacity to reduce acetylene in lucerne nodules) can be transferred by conjugation between two different *R. meliloti* strains. This was demonstrated because: (1) transfer of chromosomal alleles occurred at frequencies significantly higher than reversion rates for the markers of the recipient; and (2) all revertants of the recipient were still  $\text{Fix}^-$ . The transfer frequency of *fix* genes was similar to (or higher than) those of the chromosomal markers. However, we were unable to assess the transfer frequency of *fix* determinants because of the lack of a proper selective medium.



**Table 2** Comparison of the characteristics of eight recombinants with those of the parental strains

Strain	Phenotype	Resistance to			Sensitivity to phages			Acetylene reduction (nmol/mg of plant dry wt/7 h)	Plasmid content*
		Ap	Km	Tc	φ7	φ11	φ12		
RCR2011/RP4	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	+	+	+	-	-	-	4.9	pRmeRCR2011b, pRmeRCR2011a, RP4
M5N1m3SR	Ilv <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup> Arg <sup>-</sup> Sm <sup>R</sup> Rif <sup>R</sup>	-	-	-	+	+	+	0.008	pRmeM5N1m3SRb, pRmeM5N1m3SRa
<b>RECOMBINANTS</b>									
Clones 1 to 4	Sm <sup>R</sup> Rif <sup>R</sup>	-	-	-	+	-	+	5.8 to 12.1	pRmeM5N1m3SRb, pRmeRC2011a
Clones 5 to 8	Ilv <sup>-</sup> Sm <sup>R</sup> Rif <sup>R</sup>	-	-	-	+	-	+	5.0 to 7.0	
Lucerne plants alone								0.012	

\* *R. meliloti* plasmids nomenclature is according to Casse *et al.* (1979).

Among the eight Sm<sup>R</sup> Rif<sup>R</sup> recombinants which induced nitrogen-fixing nodules, four retained the isoleucine + valine auxotrophy of the recipient strain. It was inferred that two alleles (*arg*<sup>+</sup>, *trp*<sup>+</sup>) selected in these crosses were closely linked. Isolation of prototrophic recombinants in a single cross from a recipient strain carrying three auxotrophic markers was not surprising since P1 group R plasmids can promote the transfer of large regions of the *Rhizobium* chromosome with little multiple crossing-over (Beringer *et al.*, 1980). Moreover, the chromosomes of two *R. meliloti* strains (including RCR2011) have been shown to be sufficiently homologous to allow high frequency recombination between them (Kondorosi *et al.*, 1980).

In *R. meliloti*, the majority of symbiotic genes (*nod*, *fix* and *nif* genes) have been shown to reside on one megaplasmid (Bánfalvi *et al.*, 1981; Rosenberg *et al.*, 1981). A detailed map of the symbiotic region of such a pSym megaplasmid has been established, demonstrating the vicinity of *nod*, *fix* and *nif* genes (Bánfalvi *et al.*, 1981; Kondorosi *et al.*, 1984). The fact that the ineffective nodules induced by mutant M5N1m3SR exhibited an altered morphology (hairy nodules) suggests that at least one megaplasmid-carried *nod* determinant had been impaired by NTG mutagenesis which usually results in point mutations (Megias *et al.*, 1982). This *nod* mutation was complemented probably by the transfer of the donor RCR2011 pSym into the recipient, since the nodules induced by the Fix<sup>+</sup> recombinants were morphologically similar to those of the donor.

In other respects, the Fix<sup>+</sup> recombinants had become resistant to phage Φ11. This might be linked to the loss of the 92 Md indigenous plasmid of the recipient. Such a correlation has been demonstrated in another *R. meliloti* strain (Corral *et al.*, 1978). In the recipient strain M5N1m3SR, genetic determinants for sensitivity to phages Φ7 and Φ12 would be either chromosomal- or megaplasmid-borne.

Alteration of the plasmid content of the Fix<sup>+</sup> recombinants resulted probably from an incompatibility between the RCR2011 pSym and the pRme (92 Md) of the recipient. On the other hand, the RCR2011 pSym appeared to be compatible with the megaplasmid of the recipient. It is worth noting that a single megaplasmid band was observed on Eckhardt gels for the recipient M5N1m3SR or its parent strain M5N1 (data not shown), but it cannot be left out that these strains harbour two megaplasmids which migrate to the same position. No significant deletion was found for the megaplasmid of the Fix<sup>-</sup> mutant M5N1m3SR compared to the wild-type strain M5N1 (data not shown in the results).

RP4 is known to be capable of mobilizing separately chromosomal genes (Meade and Signer, 1977) and the pSym of *R. meliloti* RCR2011 (Truchet *et al.*, 1984). In addition, our results suggest that RP4-mediated conjugal transfer of both chromosomal alleles (*arg*<sup>+</sup>, *try*<sup>+</sup>, *ilv*<sup>+</sup>) and pSym to the same Fix<sup>-</sup> recipient cell can occur during the course of normal mating conditions.

The fact that the eight Fix<sup>+</sup> recombinants were Tc<sup>S</sup>, *i.e.* they had not received RP4, is not clear. Recently, it has been reported that the co-transfer of Pl group sex factors into recipient bacteria is not necessary for mobilizing the *R. meliloti* pSym (Kondorosi *et al.*, 1982; Truchet *et al.*, 1984). Moreover, transfer of the sex factor RP4 was found to occur at lower frequencies for *R. meliloti* strain M5N1 and its derivatives than for other *R. meliloti* strains (F. Delmaere, unpublished results).

Transfer of pSym megaplasmid might be a useful way to improve the symbiotic efficacy of *R. meliloti* strains exhibiting high competitiveness in nodulation but unsatisfactory nitrogen fixation rates (Miller and Sirois, 1982). Additionally, exclusion of the middle-sized plasmid of the recipient by the incoming pSym from the donor might explain the absence of such pRme plasmids in some strains of *R. meliloti* (Dénarié *et al.*, 1981). Further studies should help to understand the evolutionary relationships between giant and middle sized plasmids of *R. meliloti*.

### Acknowledgements

We especially wish to thank C. Detaisne and C. Dozier (Institute Pasteur) for providing detailed instructions for SDS-PAGE. We also thank J. Ghai for improvements to the English manuscript and M. Delecourt for typing it.

### References

- ALI H., Niel C. and Guillaume J. B. 1981. The pathways of ammonium assimilation in *Rhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.* **129** 391–4.
- ALI H., Béchet M., Niel C. and Guillaume J. B. 1984. *Rhizobium meliloti* Tn5-induced auxotrophic mutants responding to different biosynthetic intermediates. *Can. J. Microbiol.* **30** 507–11.
- BANFALVI Z., Sakanyan V., Koncz C., Kiss A., Dusha I. and Kondorosi A. 1981. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184** 318–25.
- BERINGER J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. gen. Microbiol.* **84** 188–98.
- BERINGER J. E., Brewin N. J. and Johnston. A. W. B. 1980. The genetic analysis of *Rhizobium* in relation to symbiotic fixation. *Heredity* **45** 161–86.
- CASADESUS J. and Olivares J. 1979. Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **174** 203–9.
- CASSE-DELBART F., Boucher C., Julliot J. S., Michel M. and Dénarié J. 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. gen. Microbiol.* **113** 229–42.
- CORRAL E., Montoya E. and Olivares J. 1978. Sensitivity to phages in *Rhizobium meliloti* as a plasmid consequence. *Microbios Letters* **5** 77–80.
- DENARIE J., Rosenberg C., Boistard P., Truchet G. and Casse-Delbart F. 1981. Plasmid control of symbiotic properties in *Rhizobium meliloti*. In *Current perspectives in nitrogen fixation*. Edited by A. H. Gibson and W. E. Newton. pp 137–41. Elsevier/North-Holland Publishing Co, Amsterdam.
- ECKHARDT T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1** 584–8.
- FORRAI T., Vincze E., Bánfalvi Z., Kiss G. B., Randhawa G. S. and Kondorosi A. 1983. Localization of symbiotic mutations in *Rhizobium meliloti*. *J. Bact.* **153** 635–43.

- HARDY R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K. and Burns R. C. 1968. The acetylene-ethylene assay for  $N_2$  fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* **43** 1185–207.
- HOLLIDAY R. 1956. A new method for the identification of biochemical mutants of micro-organisms. *Nature* **178** 987.
- KERSTERS K. and De Ley J. 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. gen. Microbiol.* **87** 333–42.
- KONDOROSI A., Kiss G. B., Forrai T., Vincze E. and Bánfalvi Z. 1977. Circular linkage map of *Rhizobium meliloti* chromosome. *Nature* **264** 525–7.
- KONDOROSI A., Vincze E., Johnston A. W. B. and Beringer J. E. 1980. A comparison of three *Rhizobium* linkage maps. *Mol. Gen. Genet.* **178** 403–8.
- KONDOROSI A., Kondorosi E., Pankhurst C. E., Broughton W. J. and Bánfalvi Z. 1982. Mobilization of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.* **188** 433–9.
- KONDOROSI E., Bánfalvi Z. and Kondorosi A. 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* **193** 445–52.
- LAEMMLI U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage  $T_4$ . *Nature* **227** 680–5.
- LONG S. R., Buikema W. J. and Ausubel F. M. 1982. Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod mutants. *Nature* **298** 485–8.
- LOWRY O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193** 265–75.
- MEADE H. M. and Signer E. R. 1977. Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **74** 2076–8.
- MEGIAS M., Caviedes M. A., Palomares A. J. and Ruiz-Berraquero F. 1982. Mutagenesis in *Rhizobium trifolii*. *Microbios* **35** 39–48.
- MILLER R. W. and Sirois J. C. 1982. Relative efficacy of different alfalfa cultivar-*Rhizobium meliloti* strain combinations for symbiotic nitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* **43** 764–8.
- NICOL H. and Thornton H. G. 1941. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. *Proc. Roy. Soc. Ser B* **130** 32–59.
- PÜHLER A., Arnold W., Horn D., Jäckel B., Priefer U., Simon R. and Weber G. 1982. Genetic analysis of *Rhizobium meliloti* plasmids and *Rhizobium meliloti* *nif* genes. In Proceedings of the 8th North America *Rhizobium* Conference, University of Manitoba Press, Winnipeg. pp 90–114.
- PÜHLER A., Aguilar M. O., Hynes M., Müller P., Klipp W., Priefer U., Simon R. and Weber G. 1984. Advances in the genetics of free-living and symbiotic nitrogen fixing bacteria. In Advances in Nitrogen Fixation Research. Proceedings of the 5th International Symposium on Nitrogen Fixation, Noordwijkerhout, The Netherlands. Edited by C. Veeger and N. E. Newton. pp 609–19. Martinus Nijhoff, Dr W. Junk Publishers, The Hague, Boston, Lancaster.
- ROSENBERG C., Boistard P., Dénarié J. and Casse-Delbart F. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184** 326–33.
- ROSENBERG C., Casse-Delbart F., Dusha I., David M. and Boucher C. 1982. Megaplasmids in the plant-associated bacteria *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bact.* **150** 402–6.
- SIMON R., Priefer U. and Pühler A. 1983. Vector plasmids for *in vivo* and *in vitro* manipulations of Gram-negative bacteria. In Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. Edited by A. Pühler. pp 98–106. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, Tokyo.
- TRUCHET G., Rosenberg C., Vasse J., Julliot J. S., Camut S. and Dénarié J. 1984. Transfer of *Rhizobium meliloti* pSym genes into *Agrobacterium tumefaciens*: host-specific nodulation by atypical infection. *J. Bact.* **157** 134–42.

Accepted 4 June 1984

## Evidence for the occurrence of two megaplasms in *Rhizobium meliloti* strain M5N1

K. R. Maoui, C. M. Dozier\* and J. B. Guillaume

Laboratoire de Microbiologie, Université des Sciences et des Techniques, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

\*Present address: Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, CNRS, INSERM U186, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Albert Calmette, 59019 Lille Cedex, France

### Abstract

*Rhizobium meliloti* strain M5N1 may contain two megaplasms which co-migrate in normal agarose gel electrophoresis. A mutant showing an extensive deletion in one of these very large plasmids was isolated after nitrosoguanidine mutagenesis. This resulted in the visualization of an additional plasmid band of high molecular weight in agarose gel electrophoresis, and confirmed the existence of two megaplasms in *Rhizobium meliloti* strain M5N1.

### Introduction

Agarose gel electrophoresis techniques have facilitated the detection of large plasmids in a number of rhizobia strains (Prakash *et al.*, 1978; Casse *et al.*, 1979; Nuti *et al.*, 1980; Dénarié *et al.*, 1980). Extensive research on the role of these plasmids has shown that they harbour genes for nodulation (nod) and nitrogen fixation (nif) (Johnston *et al.*, 1978; Nuti *et al.*, 1979; Prakash, 1980; Ruvkun and Ausubel, 1980).

Other types of gene function such as sensitivity to phages (Corral *et al.*, 1978), bacteriocin production, transfer functions (Hirsch, 1979) and incompatibility (Brewin *et al.*, 1980; Maoui *et al.*, 1984), were also described as plasmid borne. However, the available information concerning their regulation is still very limited.

In *R. meliloti*, the genes coding for symbiotic properties have been located on very large plasmids termed megaplasms (Banfalvi *et al.*, 1981; Rosenberg *et al.*, 1981; Kondorosi *et al.*, 1982), but the numbers and the other functions associated with these very large DNA molecules remain unknown. To determine the genetic functions specified by these plasmids different procedures have been commonly used, such as curing treatment (Casse *et al.*, 1979; Zurkowski and Lorkiewicz, 1978), crosses between strains (Higashi, 1967; Hirsch, 1979), or mutagenesis by insertion of transposons, by UV irradiation and by chemical agents (Walton and Moseley, 1981).

Indeed, plasmids are prone to mutagenesis by chemicals. NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) was widely used as a mutagen. It was found to induce high mutation frequencies at relatively high survival rates and also to produce deletion in the bacterial genome (Cerdeña-Olmedo and Ruiz-Vasquez, 1979). By treatment with NTG, a mutant M5N1m5 bearing a megaplasmid which had undergone a large deletion was obtained. The aim of this study has been to demonstrate the presence of two megaplasms showing the same mobility in agarose gel electrophoresis in *R. meliloti* strain M5N1.

## Materials and methods

### Micro-organisms

*Rhizobium meliloti* wild type strains M5N1, M10S and M19S were isolated from *Medicago sativa* root nodules in the North of France and proved to be infective and effective. M5N1m5 was an NTG-induced auxotroph of *R. meliloti* strain M5N1. Several phages not listed here were used for screening the sensitivity of strains M5N1 and M5N1m5.

### Media and growth conditions

RC (Maoui *et al.*, 1984) and TY (Beringer, 1974) media were used for mutagenic treatment and plasmid detection, respectively. *R. meliloti* strains were always grown at 30°C.

### Mutagenesis

Nitrosoguanidine mutagenesis was performed as described earlier (Maoui *et al.*, 1984).

### Assay for nitrogenase activity

The medium and methodology for nitrogenase assays have previously been described in detail (Maoui *et al.*, 1984).

### Assay for bacteriocinogenicity

Bacterial cultures were checked for sensitivity to bacteriocins using the standard spot-test (Schwinghamer *et al.*, 1973).

### Detection of plasmids on agarose gels

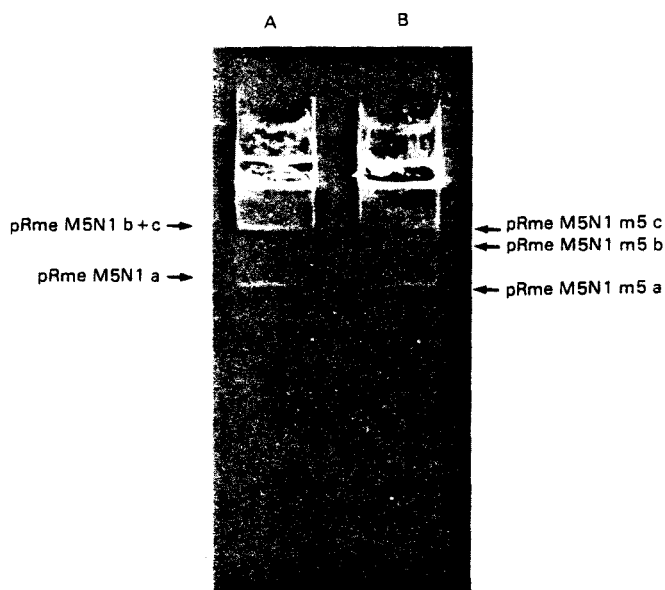
A modified procedure of Eckhardt (1978) as described by Pühler *et al.* (1982) was used to visualize plasmids. Electrophoresis was performed in 0.65% (w/v) agarose (Biorad) gels at 30 V for 1 h, and then 130 V for 3 h in a vertical slab apparatus.

## Results and discussion

*R. meliloti* strain M5N1 was previously reported to harbour, in addition to its middle-sized plasmid (pRme M5N1a) of molecular weight approximately 92 Md, a very large band which was suspected to contain two co-migrating megaplasmids (Maoui *et al.*, 1984). In order to examine this hypothesis, nitrosoguanidine was used to obtain deletion in one of them.

All cells of strain M5N1 were grown in RC medium and treated with 300 µg/ml of nitrosoguanidine. After each treatment mutants were isolated and scored systematically for their nutritional requirements according to the Holliday test (1956), for their symbiotic characters using the nodulation and acetylene reduction test (Hardy *et al.*, 1968), and for their plasmid content using a modified procedure of Eckhardt (1978).

After successive mutageneses and enrichments as described previously, one mutant showed four nutritional requirements (isoleucine plus valine, tryptophane, arginine and glycine), and was altered in the genes controlling late functions in symbiosis. Indeed this mutant was able to nodulate its host plant alfalfa (*Medicago sativa*) but failed to fix nitrogen (acetylene reduction).



**Figure 1** Plasmid gel profile of *R. meliloti* wild type strain M5N1 (lane A) and its derivative M5N1m5 (lane B). The smaller resident plasmid in M5N1 and M5N1m5 is the *pRme* plasmid, and it is approximately 92 Md. The plasmid band of high molecular weight corresponds to two megaplasmids which could not be detected after gel electrophoresis in strain M5N1. However, a third band was found after deletion in one of them in mutant M5N1m5.

The plasmid profile of the resulting mutant is shown in Figure 1. The plasmid content of this  $\text{Fix}^-$  mutant named M5N1m5 compared with that of the wild type strain M5N1 clearly showed a third plasmid band of high molecular weight. This profile is quite stable and reproducible. So it can be deduced that in the mutant M5N1m5 one of the two megaplasmids has suffered a substantial deletion. Therefore, this indicated that in the wild type strain M5N1 the very large band contained two megaplasmids which co-migrated in normal conditions.

The occurrence of two different megaplasmids in *R. meliloti* strain 2011 was suggested recently by Simon (1984). After labelling them with the new transposon (*Tn5-Mob*) and using mobilization experiments Simon (*op. cit.*) obtained, from a cross between *R. meliloti* strain 2011 as donor and *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 290 as recipient, two types of *A. tumefaciens* transconjugants with respect to their ability to nodulate *Medicago sativa* the host plant of *R. meliloti*. Analysis of the plasmid profile of these two groups of transconjugants, nodulating and non-nodulating alfalfa, in comparison with the parental strains (donor and recipient strains) showed a new plasmid migrating at the same position in the agarose gel as the *R. meliloti* megaplasmid.

This indirect genetic evidence supported the existence of two different megaplasmids in *R. meliloti* strain 2011. On the other hand Burkardt and Burkardt (1984), investigating the same strain 2011 using electron microscopy, suggested the presence of two different very large DNA molecules. These results corroborate with our data obtained with strain 2011 which exhibited two close bands each corresponding to a very high molecular weight plasmid in earlier gel analysis (Maoui *et al.*, 1984).

The number of megaplasmids present in *R. meliloti* strains remains typical of each strain and is variable. Indeed, strain MVII/1 described by Burkhardt and Berkhardt (1984) using the same technique seems to harbour only one megaplasmid, but it is worth noting that this strain contains four other small plasmids.

Our results confirm those obtained by Banfalvi *et al.* (1981) who indicated that in their non-nodulating (Nod<sup>-</sup>) mutants derived from strain 41 a band with the same mobility could mask the complete loss of pRme41 b (pSym) on the gels. As in *Escherichia coli* nitrosoguanidine was able to induce deletion in the *R. meliloti* genome, and therefore generated mutants deleted in their DNA molecules.

This type of mutant which manifests genome deletion might be interesting and related to phenotypic characteristics. Unfortunately, no other phenotypic characteristics have been correlated with this deletion. Indeed, strains M10S and M19S used as indicators showed similar patterns in their sensitivity to bacteriocins produced by M5N1 and its derivative M5N1m5.

Finally, all phages which were infectious to M5N1 exhibited the same infectivity to its mutant M5N1m5. Nevertheless, by using nod and nif gene probes we can study the location of genes controlling symbiotic properties on these separated DNA molecules and know if they are located on only one DNA molecule (pSym) or repeated on two DNA molecules. In our case, this deletion is probably not linked to pSym since the failure to fix nitrogen was acquired by mutant M5N1m3 which exhibited the same plasmid pattern as the wild type strain M5N1 (data not shown), and from which mutant M5N1m5 was derived. Investigations are under way to locate nod and nif genes in these separate megaplasmids.

### Acknowledgements

We express our gratitude to Mrs M. Bonnier for typing the manuscript.

### References

- BANFALVI Z., Sakanyan V., Koncz C., Kiss A., Dusha I. and Kondorosi A. 1981. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184** 318–25.
- BERINGER J. E. 1974. R. factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. gen. Microbiol.* **84** 188–98.
- BREWEN N. J., Beringer J. E., Buchanan-Wollaston A. V., Johnston A. W. B. and Hirsch P. R. 1980. Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. *J. gen. Microbiol.* **116** 261–70.



- BURKARDT B. and Burkardt H. J. 1984. Visualization and exact molecular weight determination of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid. *J. molec. Biol.* **175** 213-8.
- CASSE F., Boucher C., Julliot J. S., Michel M. and Dénarié J. 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. gen. Microbiol.* **113** 229-42.
- CERDA-OLMEDO E. and Ruiz-Vasquez R. 1979. Nitrosoguanidine mutagenesis. In Genetics of Industrial Micro-organisms. Edited by O. K. Sebek and A. J. Laskin. pp 15-20. Am. Soc. Microbiol., Washington D.C.
- CORRAL E., Montoya E. and Olivares J. 1978. Sensitivity to phages in *Rhizobium meliloti* as a plasmid consequence. *Microbios Letters* **26** 63-7.
- DENARIE J., Boistard P., Casse-Delbart F., Atherly A. G., Berry J. O. and Russel P. 1981. Indigenous plasmids of *Rhizobium*. pp 225-45. International Review of Cytology. Suppl. 13. Academic Press Inc., New York.
- ECKHARDT T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1** 584-8.
- HARDY R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K. and Burns R. C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* **43** 1185-207.
- HIGASHI S. 1967. Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13** 391-403.
- HIRSCH P. R. 1979. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *J. gen. Microbiol.* **113** 219-28.
- HOLLIDAY R. 1956. A new method for the identification of biochemical mutants of micro-organism. *Nature* **178**-87.
- JOHNSTON A. W. B., Beynon J. L., Buchanan-Wollaston A. V., Setchell S. M., Hirsh P. R. and Beringer J. E. 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature* **627**-35.
- KONDOROSI A., Kondorosi E., Pankhurst C. E., Broughton W. J. and Banfalvi Z. 1982. Mobilization of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.* **188** 433-9.
- MAOUI K. R., Béchet M. and Guillaume J. B. 1985. Megaplasmid transfer and incompatibility between plasmids of two different strains of *Rhizobium meliloti*. *Microbios* **42** 251-62.
- NUTI M. P., Lepidi A. A., Prakash R. K., Schilperoort R. A. and Cannon F. C. 1979. Evidence of nitrogen fixation genes on indigenous *Rhizobium* plasmids. *Nature* **282** 533-5.
- NUTI M. P., Lepidi A. A., Prakash R.K., Hooykaas P. J. J. and Schilperoort R. A. 1980. In Molecular Biology of Plant Tumors. Edited by G. Kahl and J. Schell. Academic Press Inc., New York.
- PRAKASH R. K., Hooykaas P. J. J., Ledebouer A. M., Kijne J., Schilperoort R. A., Nuti M. P., Lepidi A. A., Casse F., Boucher C., Julliot J. S. and Dénarié J. 1978. Proceedings of the Third International Symposium on Nitrogen Fixation. Edited by W. H. Orme-Johnson and W. E. Newton. University Park Press, Madison.
- PÜHLER A., Arnold W., Horn D., Jäckel B., Priefer U., Simon R. and Weber G. 1982. Genetic analysis of *Rhizobium meliloti* plasmids and *Rhizobium meliloti* nif genes. In Proceedings of the 8th North American *Rhizobium* Conference. University of Manitoba Press, Winnipeg. pp 90-114.
- ROSENBERG C., Boistard P., Dénarié J. and Casse-Delbart F. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184** 326-33.
- RUVKUN G. B. and Ausubel F. M. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **77** 191-5.
- SCHWINGHAMER E. A., Pankhurst C. E. and Whitefield P. R. 1973. A phage-like bacteriocin on *Rhizobium trifolii*. *Can. J. Microbiol.* **19** 359-68.
- SIMON R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* **196** 413-20.
- WALTON D. A. and Moseley B. E. B. 1981. Induced mutagenesis in *Rhizobium trifolii*. *J. gen. Microbiol.* **124** 191-5.
- ZURKOWSKI W. and Lorkiewicz Z. 1978. Effective method for the isolation of non-nodulating mutants of *Rhizobium trifolii*. *Genet. Res.* **32** 311-4.

Accepted 27 June 1985

- ABDEL-WAHAB S.M., RIFAAT K.M., AHMED K.A. and HAMDI Y.A. 1976.  
Resistance to antibiotics in Rhizobium trifolii and its  
relation to nitrogen fixation.  
Zbl. Bakt. Abt. II. 131 : 170-178.
- ADACHI T. and IYER V.N. 1980.  
A procedure for the isolation and purification of plasmid  
DNA from Rhizobium meliloti.  
Anal. Biochem. 101 : 271-274.
- ADACHI T., HOOPER I. and IYER V.N. 1983.  
Moderately large plasmids of Rhizobium meliloti.  
Can. J. Microbiol. 29 : 1601-1606.
- ADAMS M.H. 1959.  
Bacteriophages.  
Interscience Publishers, Inc., New-York.
- ADAMS T.H., McCLUNG C.R. and CHELM B.K. 1984.  
Physical organization of the Bradyrhizobium japonicum  
nitrogenase gene region.  
J. Bacteriol. 159:857-862.
- ADAMS T.H. and CHELM B.K. 1984.  
The nif H and nif DK promoter regions from Rhizobium  
japonicum share structural homologies with each other  
and with nitrogen regulated promoters from other organisms.  
J. Mol. Appl. Genet. 2:392-405.
- AGARWAL A.K. and METHA S.L. 1974.  
Characterization of DNA from Rhizobium cells and their  
bacteroids from root nodules.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 60:257-265.
- AGUILAR O.M., KAPP D. and PÜHLER A. 1985.  
Characterization of a Rhizobium meliloti fixation gene  
(fix F) located near the common nodulation region.  
J. Bacteriol. 164:245-254.
- ALBRECHT S.L., MAIER R.J., HANUS F.J., RUSSEL S.A., EMERICH D.W.  
and EVANS H.J. 1979.  
Hydrogenase in Rhizobium japonicum increases nitrogen  
fixation by nodulated soybeans.  
Science 203:1255-1257.
- ANDRIANTSIMIAVONA-OTONA M. 1984.  
Etude comparative de bactériophages de Rhizobium meliloti.  
Thèse de 3ème cycle. Université des Sciences et Techniques  
de Lille.
- APPELBAUM E., JOHANSEN E. and CHARTRAIN N. 1984.  
Identification of plasmids carrying symbiotic genes in  
fast-growing Rhizobium japonicum using DNA hybridization  
and Tn5 mutagenesis.  
In : Veeger C, Newton WE (eds) Advances in nitrogen fixation  
research. Martinus Nijhoff, The Hague p.670.



- APPELBAUM E.R., JOHANSEN E. and CHARTRAIN 1985.  
Symbiotic mutants of USDA 191, a fast-growing Rhizobium  
that nodulates soybeans.  
Mol. Gen. Genet. 201:454-461.
- ATHERLY A.G., MATERSON R., BERRY J.O., HAGENSON M.J.,  
DUTEAU N. and RUSSEL P. 1983.  
Genetic and physical characterization of plasmids  
in Rhizobium japonicum.  
Current topics in Plant Biochemistry and Physiology 195-202.
- AUSUBEL F.M. and CANNON F.C. 1980.  
Molecular genetic analysis of Klebsiella pneumoniae  
nitrogen fixation genes.  
Cold Spring Harbor Symp. 45:487-492.
- BANFALVI Z., SAKANYAN V., KONCZ C., KISS A., DUSHA I. and  
KONDOROSI A. 1981.  
Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a  
high molecular weight plasmid of Rhizobium meliloti.  
Mol. Gen. Genet. 184:318-325.
- BANFALVI Z., RANDHAWA G.S., KONDOROSI E., KISS A. and  
KONDOROSI A. 1983.  
Construction and characterization of R-prime plasmids carrying  
symbiotic genes of Rhizobium meliloti.  
Mol. Gen. Genet. 189:129-135.
- BANFALVI Z., KONDOROSI E. and KONDOROSI A. 1985.  
Rhizobium meliloti carries two megaplasms.  
Plasmid 13:129-138.
- BARBOUR W.M., MATHIS J.N. and ELKAN G.H. 1985.  
Evidence for plasmid-and chromosome- borne multiple  
nif genes in Rhizobium fredii.  
Appl. Environ. Microbiol. 50:41-44 .
- BATUT J., DE LAJUDIE P et HUGUET T. 1982.  
Mise en évidence d'homologies de séquence nucléotidique entre  
plasmides de Rhizobium meliloti et d'Agrobacterium tumefaciens.  
Colloque de la Société Française de Microbiologie p.20.
- BATUT J. TERZAGHI B., GHERARDI M., HUGUET M., TERZAGHI E.,  
GARNERONE A.M., BOISTARD P. and HUGUET T. 1985.  
Localization of a symbiotic fix region on Rhizobium meliloti  
pSym megaplasms more than 200 kilobases from the nod-  
nif region.  
Mol. Gen. Genet. 199:232-239.



- BAZETOUX S. 1983.  
Etude, par microscopie électronique, de l'ADN nucléaire de blé (Triticum aestivum) et de l'ADN plasmidial de quelques Rhizobiacées : mise en évidence de séquences répétées inversées.  
Thèse ES Sciences Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay.
- BECHET M. et GUILLAUME J.B. 1978.  
Mise en évidence d'ADN extrachromosomique chez Rhizobium meliloti.  
Can. J. Microbiol. 24:960-966.
- BEDMAR E.J. and OLIVARES J. 1980.  
Autotransmissible resident plasmid of Rhizobium meliloti.  
Mol. Gen. Genet. 177 : 329-331.
- BERG D.E., EGNER C., HIRSCHHEL B.J., HOWARD J., JOHNSRUD L., JORGENSEN R.A. and TLSTY T.D. 1980.  
Insertion, excision, and inversion of Tn5.  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45:115-124.
- BERGERSEN F.J. 1974.  
Formation and function of bacteroids.  
In Biol. Nitrogen Fixat. QUISPEL A. Ed, North Holland Press, Amsterdam 473-498.
- BERINGER J.E. 1974.  
R factor transfer in Rhizobium leguminosarum.  
J. Gen. Microbiol. 84:188.198.
- BERINGER J.E., HOGGAN S.A. and JOHNSTON A.W.B. 1978.  
Linkage mapping in Rhizobium leguminosarum by means of R-plasmid-mediated conjugation.  
J. Gen. Microbiol. 104:201-208.
- BERINGER J.E., BREWIN N.J. and JOHNSTON A.W.B. 1980.  
The genetic analysis of Rhizobium in relation to symbiotic fixation.  
Heredity 45:161-186.
- BERNS K.I. and THOMAS Jr C.A. 1965.  
Isolation of high molecular weight DNA from Hemophilus influenzae.  
J. Mol. Biol. 11:476-490.
- BERRY J.O. and ATHERLY A.G. 1984.  
Induced plasmid-genome rearrangement in Rhizobium japonicum.  
J. Bacteriol. 157:218-224.



- BETTER M. and HELINSKI D.R. 1983.  
Isolation and characterization of the *recA* gene of  
Rhizobium meliloti.  
J. Bacteriol. 155:311-316.
- BEYNON J.L., BERINGER J.E. and JOHNSTON A.W.B. 1980.  
Plasmids and host-range in Rhizobium leguminosarum  
and Rhizobium phaseoli.  
J. Gen. Microbiol. 120:421-429.
- BISSELING T., VAN DEN BOS C., VAN KAMMEN A.,  
VAN DER PLOEG M., VAN DUIJN P. and HOUWERS A. 1977.  
Cytofluorometrical determination of the DNA contents of  
bacteroids and corresponding broth-cultured Rhizobium bacteria.  
J. Gen. Microbiol. 101:79-84.
- BOHLOOL B.B. and SCHMIDT E.L. 1974.  
Lectins : a possible basis for specificity in the  
Rhizobium-legume root nodule symbiosis.  
Science 185:269-271.
- BOLTON E., GLYNN P. and O'GARA F. 1984.  
Site specific transposition of Tn7 into a Rhizobium  
meliloti megaplasmid.  
Mol. Gen. Genet. 193:153-157.
- BORTHAKUR D., DOWNIE J.A., JOHNSTON A.W.B. and LAMB J.W.  
1985.  
Psi, a plasmid-linked Rhizobium phaseoli gene that inhibits  
exopolysaccharide production and which is required for symbiotic  
nitrogen fixation.  
Mol. Gen. Genet. 200:278-282.
- BRANDSCH R., HINKKANEN A.E. and DECKER K. 1982.  
Plasmid-mediated nicotine degradation in Arthrobacter  
oxidans.  
Arch. Microbiol. 132:26-30.
- BRETON A.M., JAOUA S. and GUESPIN-MICHEL J. 1985.  
Transfer of plasmid RP4 to Myxococcus xanthus  
and evidence for its integration into the chromosome.  
J. Bacteriol. 161:523-528.
- BREWIN N.J., DE JONG T.M., PHILLIPS D.A. and JOHNSTON A.W.B. 1980a.  
Co-transfer of determinants for hydrogenase activity and  
nodulation ability in Rhizobium leguminosarum.  
Nature 288:77-79.
- BREWIN N.J., BERINGER J.E., BUCHANAN-WOLLASTON A.V., JOHNSTON A.W.B.  
and HIRSCH P.R. 1980b.  
Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids  
in Rhizobium leguminosarum.  
J. Gen. Microbiol. 116:261-270.



- BREWIN N.J., BERINGER J.E. and JOHNSTON A.W.B. 1980c.  
Plasmid-mediated transfer of host-range specificity  
between two strains of Rhizobium leguminosarum.  
J. Gen. Microbiol. 120:413-420.
- BREWIN N.J., WOOD E.A., JOHNSTON A.W.B., DIBB N.J. and  
HOMBRECHER G. 1982.  
Recombinant nodulation plasmids in Rhizobium leguminosarum.  
J. Gen. Microbiol. 128:1817-1827.
- BRILL W.J. 1980.  
Biochemical genetics of nitrogen fixation.  
Microbiol. Rev. 44:449-467.
- BROUGHTON W.J., HEYCKE N. and PANKHURST C.E. 1984.  
Plasmid-linked nif and "nod" genes in fast-growing rhizobia  
that nodulate Glycine max, Psophocarpus tetra gonolobus,  
and Vigna unguiculata.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3093-3097.
- BUCHANAN-WOLLASTON A.V., BERINGER J.E., BREWIN N.J., HIRSCH P.R.  
and JOHNSTON A.W.B. 1980.  
Isolation of symbiotically defective mutants in Rhizobium  
leguminosarum by insertion of the transposon Tn5 into  
a transmissible plasmid.  
Mol. Gen. Genet. 178:186-190.
- BUCHANAN-WOLLASTON A.V., CANNON M.C. and CANNON F.C. 1981a.  
The use of cloned nif (nitrogen fixation) DNA to  
investigate transcriptional regulation of nif expression  
in Klebsiella pneumoniae.  
Mol. Gen. Genet. 184:102-106.
- BUCHANAN-WOLLASTON A.V., CANNON M.C., BEYNON J.C. and  
CANNON F.C. 1981b.  
Role of the nif A gene product in the regulation of nif  
expression in Klebsiella pneumoniae.  
Nature 294:776-778.
- BURKARDT B. and BURKARDT H.J. 1984.  
Visualization and exact molecular weight determination  
of a Rhizobium meliloti megaplasmid.  
J. Mol. Biol. 175:213-218.
- CALDERON I.L. and CERDA-OLMEDO 1982.  
Simultaneous induction of multiple mutations by N-methyl-N'-  
nitro-N-nitrosoguanidine in the yeast Saccharomyces  
cerevisiae.  
Curr. Genet. 6:237-243.
- CANNON F.C., RIEDEL G.E. and AUSUBEL F.M. 1979.  
Overlapping sequences of Klebsiella pneumoniae nif DNA  
cloned and characterized.  
Mol. Gen. Genet. 174:59-66.



- CANTRELL M.A., HICKOK R.E. and EVANS H.J. 1982.  
Identification and characterization of plasmids in hydrogen uptake positive and hydrogen uptake negative strains of Rhizobium japonicum.  
Arch. Microbiol. 131:102-106.
- CANTRELL M.A., HAUGLAND R.A. and EVANS H.J. 1983.  
Construction of a Rhizobium japonicum gene bank and use in isolation of a hydrogen uptake gene.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:181-185.
- CASADESUS J. and OLIVARES J. 1979.  
Rough and fine linkage mapping of the Rhizobium meliloti chromosome.  
Mol. Gen. Genet. 174:203-209.
- CASSE F., BOUCHER C., JULLIOT J.S., MICHEL M. and DENARIE J. 1979.  
Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis.  
J. Gen. Microbiol. 113:229-242.
- CASSE F., DAVID M., BOISTARD P., JULLIOT J.S., BOUCHER C., JOUANIN L., HUGUET T. and DENARIE J. 1980.  
Presence of large plasmids and use of IncP-1 factor in Rhizobium.  
In "Plasmids of Medical Environmental, and Commercial Importance". (K.N. TIMMIS and A. PÜHLER, eds)  
p.327-338; Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- CERDA-OLMEDO E. and RUIZ-VASQUEZ R. 1979.  
Nitrosoguanidine mutagenesis.  
In Genetics of Industrial Micro-organisms. Edited by O.K. SEBEK and A.J. LASKIN. p.15-20. Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.
- CHAKRABARTI S.K., MISHRA A.K. and CHAKRABARTI P.K. 1984.  
Genome size variation of rhizobia.  
Experientia 40: 1290-1291.
- CLEWELL D.B. and HELINSKI D.R. 1969.  
Supercoiled circular DNA-protein complex in Escherichia coli : purification and induced conversion to an open circular DNA form.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62:1159-1163.
- CLOWES R.C. 1961.  
Escherichia coli K-12.  
Nature 190:988-989.
- COHEN S.N. 1976.  
Transposable genetic elements and plasmid evolution.  
Nature 263:731-738.
- CORBIN D., BARRAN L. and DITTA G. 1983.  
Organization and expression of Rhizobium meliloti nitrogen fixation genes.  
Proc. Natl. Acad. Sci USA 80:3005-3009.



- CORRAL E., MONTOYA E. and OLIVARES J. 1978.  
Sensitivity to phages in Rhizobium meliloti as a plasmid consequence.  
Microbios Lett. 5:77-80.
- CURIALE M.S. and MILLS D. 1982.  
Integration and partial excision of a cryptic plasmid in Pseudomonas syringae pv phaseolicola.  
J. Bacteriol. 152:797-802.
- CURRIER T.C. and NESTER E.W. 1976.  
Isolation of covalently circular DNA of high molecular weight from bacteria.  
Anal. Biochem. 76:431-441.
- CUTTING J.A. and SCHULMAN H.M. 1972.  
The control of heme synthesis in soybean root nodules.  
Biochim. Biophys. Acta. 261:321-327.
- DALLMANN G., OROSZ L. and SAIN B. 1979.  
Restriction mapping of DNA of temperate Rhizobium meliloti phage 16-3 : Comparaison of genetic and physical maps indicates a long, genetically silent chromosomal arm.  
Mol. Gen. Genet. 176:439-448.
- DAZZO F.B. and HUBBEL D.H. 1975.  
Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the Rhizobium clover association.  
Appl. Microbiol. 30:1017-1033.
- DAZZO F.B. and BRILL W.J. 1977.  
Receptor site on clover and alfalfa roots for Rhizobium.  
Appl. Environ. Microbiol. 33:132-136.
- DE JONG T.M., BREWIN N.J., JOHNSTON A.W.B. and PHILLIPS D.A. 1982.  
Improvement of symbiotic properties in Rhizobium leguminosarum by plasmid transfer.  
J. Gen. Microbiol. 128:1829-1838.
- DE LAJUDIE P., BOGUSZ D. et DREYFUS B.1. 1982.  
Plasmides, bacteriophages et mutagenese par insertion de transposon chez le Rhizobium de Sesbania rostrata.  
Colloque de la Société Française de Microbiologie. p.21.
- DELATTRE J.M. 1971.  
Introduction à une étude génétique du genre Rhizobium.  
Thèse de Docteur Ingénieur. Université des Sciences et Techniques de Lille.
- DE LEY G. and RASSEL A. 1965.  
DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus Rhizobium.  
J. Gen. Microbiol. 41:85-91.



- DE LEY J., BERNAERTS M.J., RASSEL A. and GUILMOT J. 1966.  
Approach to an improved taxonomic analysis of Agrobacterium.  
J. Gen. Microbiol. 43:7-17.
- DENARIE J. 1969.  
Une mutation provoquant l'auxotrophie pour l'adénine et  
la perte du pouvoir fixateur d'azote chez Rhizobium meliloti.  
C. R. Acad. Sci. (Paris) 269:2464-2466.
- DENARIE J., TRUCHET G. and BERGERON B. 1976.  
Effects of some mutations on symbiotic properties of Rhizobium.  
In "Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants". P.S. NUTMANN Editor,  
Cambridge University Press. 47-61.
- DENARIE J. et TRUCHET G. 1979.  
La symbiose Rhizobium légumineuses : rôles respectifs  
des partenaires.  
Physiol. Veg. 17:643-667.
- DENARIE J., BOISTARD P., CASSE-DELBART F., ATHERLY A.G.,  
BERRY J.O. and RUSSELL P. 1981.  
Indigenous plasmids of Rhizobium.  
Int. Rev. Cytol. Suppl. 13:225-246.
- DILWORTH M.J. and WILLIAMS D.C. 1967.  
Nucleic acid changes in bacteroids of Rhizobium lupini during  
nodule development.  
J. Gen. Microbiol. 48:31-36.
- DIXON R.O.D. 1969.  
Rhizobia with particular reference to relationship with  
host plants.  
Ann. Rev. Microbiol. 23:137-158.
- DIXON R., CANNON F. and KONDOROSI A. 1976.  
Construction of a P-plasmid carrying nitrogen fixation  
genes from Klebsiella pneumoniae.  
Nature 260:268-271.
- DIXON R.A. and CANNON F.C. 1976.  
Recent advances in the genetic of nitrogen fixation.  
In "Symbiotic nitrogen fixation in plants".  
P.S. NUTMANN Editor, Cambridge University Press :3-24.
- DJORDJEVIC M.A., ZURKOWSKI W. and ROLFE B.G. 1982.  
Plasmids and stability of symbiotic properties of Rhizobium  
trifolii.  
J. Bacteriol. 151:560-568.
- DJORDJEVIC M.A., SCHOFIELD P.R. and ROLFE B.G. 1985a.  
Tn5 mutagenesis of Rhizobium trifolii host-specific  
nodulation genes result in mutants with altered host-range  
ability.  
Mol. Gen. Genet. 200:463-471.



- DJORDJEVIC M.A., SCHOFIELD P.R., RIDGE R.W., MORRISON N.A.,  
BASSAM B.J., PLASZINSKI J., WATSON J.M. and ROLFE B.G. 1985b.  
Rhizobium nodulation genes involved in root hair curling (Hac)  
are functionally conserved.  
Plant Mol. Biol. 4:147-160.
- DOWNIE J.A., MA Q.S., KNIGHT C.D., HOMBRECHER G., and  
JOHNSTON A.W.B. 1983a.  
Cloning of the symbiotic region of Rhizobium leguminosarum :  
the nodulation genes are between the nitrogenase genes and  
a nif A-like gene.  
EMBO J. 2:947-952.
- DOWNIE J.A., HOMBRECHER G. MA Q.S., KNIGHT C.D., WELLS B.  
and JOHNSTON A.W.B. 1983b.  
Cloned nodulation genes of Rhizobium leguminosarum determine  
host-range specificity.  
Mol. Gen. Genet. 190:359-365.
- DOWNIE J.A., KNIGHT C.D., JOHNSTON A.W.B. and ROSSEN L. 1985.  
Identification of genes and gene products involved in  
the nodulation of peas by Rhizobium leguminosarum.  
Mol. Gen. Genet. 198:255-262.
- DREYFUS B.L. and DOMMERGUES Y.R. 1981.  
Nitrogen fixing nodules induced by Rhizobium on the stem  
of the tropical legume Sesbania rostrata.  
FEMS Microbiol. Lett. 10:313-317.
- DUNICAN L.K. and CANNON F.C. 1971.  
Genetic control of symbiotic properties in Rhizobium :  
evidence for plasmid control.  
Plant and soil, special volume : 73-79.
- DUNICAN L.K., O'GARA F. and TIERNEY A.B. 1976.  
Plasmid control of effectiveness in Rhizobium : transfer of  
nitrogen fixing genes on a plasmid from Rhizobium trifolii to  
Klebsiella aerogenes.  
In : Symbiotic Nitrogen Fixation in plants (P.S. NUTMAN ed.).  
77-90. Cambridge Univ. Press. London and New York.
- EADY R.R. and POSTGATE J.R. 1974.  
Nitrogenase.  
Nature 249:805-810.
- ECKHARDT T. 1978.  
A rapid method for the identification of plasmid  
desoxyribonucleic acid in bacteria.  
Plasmid 1:584-588.
- EGELHOFF T.T., FISHER R.F., JACOBS T.W., MULLIGAN J.T.  
and LONG S.R. 1985.  
Nucleotide sequence of Rhizobium meliloti 1021 nodulation  
genes : nod D is read divergently from nod ABC.  
DNA 4:241-248.



- EGELHOFF T.T. and LONG S.R. 1985.  
Rhizobium meliloti nodulation genes : Identification of nod DABC gene products, purification of nod A protein, and expression of nod A in Rhizobium meliloti.  
J. Bacteriol 164:591-599.
- ELMERICH C. 1979.  
Génétique de la fixation de l'azote.  
Physiol. vég. 17:883-906.
- ELMERICH C., QUIVIGER B., ROSENBERG C., FRANCHE C., LAURENT P. and DOBEREINER J. 1982.  
Characterization of a temperate bacteriophage for Azospirillum.  
Virology 122:29-37.
- EMERICH D.W., RUIZ-ARGUESO T., CHING T.M. and EVANS H.J. 1979.  
Hydrogen-dependant nitrogenase activity and ATP formation in Rhizobium japonicum bacteroids.  
J. Bacteriol. 137:153-160.
- EVANS H.J., PUROHIT K., CANTRELL M.A., EISBRENNER G., RUSSEL S.A., HANUS F.J. and LEPO J.E. 1981.  
In : Current perspectives in nitrogen fixation.  
Ed. GIBSON A.H. and NEWTON W.E. Elsevier/North Holland Biomedical Press, p.84-96.
- FISCHER H.M. and HENNECKE H. 1984.  
Linkage map of the Rhizobium japonicum nif H and nif DK operons encoding the polypeptides of the nitrogenase enzyme complex.  
Mol. Gen. Genet. 196:537-540.
- FISCHER R.F., TU J.K. and LONG S.R. 1985.  
Conserved nodulation genes in Rhizobium meliloti and Rhizobium trifolii.  
Appl. Environ. Microbiol. 49:1432-1435.
- FORRAI T., VINCZE E., BANFALVI Z., KISS. G.B., RANDHAVA G.S. and KONDOROSI A. 1983.  
Localization of symbiotic mutations in Rhizobium meliloti.  
J. Bacteriol. 153:635-643.
- GIBBINS A.M. and GREGORY K.F. 1972.  
Relatedness among Rhizobium and Agrobacterium species determined by three methods of nucleic acid hybridization.  
J. Bacteriol. 3:129-141.
- GRAHAM P.H. 1964.  
The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria.  
J. Gen. Microbiol. 35:511-517.
- GROSS D.C., VIDAVER A.K and KLUCAS R.V. 1979.  
Plasmids, biological properties and efficacy of nitrogen fixation in Rhizobium japonicum strains indigenous to alkaline soils.  
J. Gen. Microbiol. 114:257-266.
- HADLEY R.G., EAGLESHAM A.R.J. and SZALAY A.A. 1983.  
Conservation of DNA regions adjacent to nif KDH homologous sequences in diverse slow-growing Rhizobium strains.  
J. Mol. Appl. Genet. 2:225-236.



- HIGASHI S. 1967.  
Transfer of clover infectivity of Rhizobium trifolii to Rhizobium phaseoli as mediated by an episomic factor.  
J. Gen. Appl. Microbiol. 13:391-403.
- HIGASHI S., UCHIUMI T. and ABE M. 1983.  
Elimination of Rhizobium infectivity by temperature treatment.  
J. Gen. Appl. Microbiol. 29:281-285.
- HILL S., KENNEDY C., KAVANAUGH E. GOLDBERG R.B.  
and HANAU R. 1981.  
Nitrogen fixation gene (nif L) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in Klebsiella pneumoniae.  
Nature 290:424-426.
- HIRSCH P.R. 1979.  
Plasmid determined bacteriocin production by Rhizobium leguminosarum.  
J. Gen. Microbiol. 113:219-228.
- HIRSCH P.R., VAN MONTAGU M., JOHNSTON A.W.B., BREWIN N.J.  
and SCHELL J. 1980.  
Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of Rhizobium leguminosarum.  
J. Gen. Microbiol. 120:403-412.
- HIRSCH A.M., WILSON K.J., JONES J.D.G., BANG M.,  
WALKER V.V. and AUSUBEL F.M. 1984.  
Rhizobium meliloti nodulation genes allow Agrobacterium tumefaciens and Escherichia coli to form pseudonodules on alfalfa.  
J. Bacteriol. 158:1133-1143.
- HIRSCH A.M., DRAKE D., JACOBS T.W. and LONG S.R. 1985.  
Nodules are induced on alfalfa roots by Agrobacterium tumefaciens and Rhizobium trifolii containing small segments of the Rhizobium meliloti nodulation region.  
J. Bacteriol. 161:223-230.
- HOLLIDAY R. 1956.  
A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms.  
Nature 178:987.
- HOLSTERS M., SILVA B., GENETELLO C., ENGLER G., VAN VLIET F.,  
DEBLOCK M., VILLARROEL R., VAN MONTAGU M. and SCHELL J. 1978.  
Spontaneous formation of cointegrates of the oncogenic Ti-plasmid and the wide-host-range P-plasmid RP4.  
Plasmid 1:456-467.
- HOM S.S.M., GRAHAM L.A. and MAIER R.J. 1985.  
Isolation of genes (nif/hup cosmids) involved in hydrogenase and nitrogenase activities in Rhizobium japonicum.  
J. Bacteriol. 161:882-887.



- HANAWALT P.C., COOPER P.K., GANESAN A.K. and SMITH C.A. 1979.  
DNA repair in bacteria and mammalian cells.  
Annu. Rev. Biochem. 48:783-836.
- HANSEN J.B. and OLSEN R.H. 1978.  
Isolation of large bacterial plasmids and characterization  
of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5.  
J. Bacteriol. 135:227-238.
- HARDY R.W.F., HOLSTEN R.D., JACKSON E.K. and BURNS P.C. 1968.  
The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> Fixation : laboratory and  
field evaluation.  
Plant Physiol. 43:1185-1207.
- HATTORI J. and JOHNSTON D.A. 1984.  
Fast-growing Rhizobium japonicum that effectively nodulates  
several commercial glycine max L. merril cultivars.  
Appl. Environ. Microbiol. 48:234-235.
- HAUGLAND R.A., CANTRELL M.A., BEATY J.S., HANUS F.J., RUSSEL S.A.  
and EVANS H.J. 1984.  
Characterization of Rhizobium japonicum hydrogen uptake genes.  
J. Bacteriol. 159:1006-1012.
- HENDRY G.S. and JORDAN D.C. 1969.  
Ineffectiveness of viomycin-resistant mutants of Rhizobium  
meliloti.  
Can. J. Microbiol. 15:671-675.
- HEPBURN A.G. and HINDLEY J. 1979.  
Regions of DNA sequence homology between an octopine  
and a nopaline Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens.  
Mol. Gen. Genet. 169:163-172.
- HEPPER C.M. 1978.  
Physiological studies on nodule formation. The characteristics  
and inheritance of abnormal nodulation of Trifolium  
pratense by Rhizobium leguminosarum.  
Ann. Bot. 42:109-115.
- HERON D.S. and PUEPPKE S.G. 1984.  
Mode of infection, nodulation specificity and indigenous  
plasmids of 11 fast-growing Rhizobium japonicum strains.  
J. Bacteriol. 160:1061-1066.
- HEUMANN W., PÜHLER A. and WAGNER E. 1973.  
The two transfer regions of the Rhizobium lupini conjugation.  
II. Genetic characterization of the transferred chromosomal  
segments.  
Mol. Gen. Genet. 126:267-274.
- 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.



- HOOYKAAS P.J.J., KLAPWIJK P.M., SCHILPEROORT R.A. and RORSCH A. 1977.  
Transfer of the Agrobacterium Ti plasmid to a virulent agrobacteria and to Rhizobium ex planta.  
J. Gen. Microbiol. 98:447-484.
- HOOYKAAS P.J.J., SCHILPEROORT R.A. and RORSCH A. 1979.  
Agrobacterium tumor inducing plasmids : Potential vectors for the genetic engineering of plants.  
Genet. Eng. 1:151-179.
- HOOYKAAS P.J.J., VAN BRUSSEL A.A.N., DEN DULK-RAAS H., VAN SLOGTEREN G.M.S. and SCHILPEROORT R.A. 1981.  
Plasmid controlling the symbiotic association between Rhizobium trifolii and clover plants expressed in different rhizobial species and in Agrobacterium tumefaciens.  
Nature. 291:351-353.
- HOOYKAAS P.J.J., SNIJDEWINT F.G.M. and SCHILPEROORT 1982.  
Identification of the Sym plasmid of Rhizobium leguminosarum strain 1001 and its transfer to and expression in other rhizobia an Agrobacterium tumefaciens.  
Plasmid 3:73-82.
- HYNES M.F., SIMON R. and PÜHLER A. 1985.  
The development of Plasmid-free strains of Agrobacterium tumefaciens by using incompatibility with a Rhizobium meliloti plasmid to eliminate pAtC58.  
Plasmid 13:99-105.
- HYNES M.F., SIMON R., MÜLLER P., NIEHAUS K., LABES M. and PÜHLER A. 1986.  
The two megaplasmids of Rhizobium meliloti are involved in the effective nodulation of alfalfa.  
Mol. Gen. Genet. 202:356-362.
- HUMPHREYS G.O., WILLSHAW G.A. and ANDERSON E.S. 1975.  
A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA.  
Biochim Biophys. Acta. 383:457-463.
- INNES R.W., KUEMPEL P.L., PLAZINSKI J., CANTER-CREMERS H., ROLFE B.G. and DJORDJEVIC M.A. 1985.  
Plant factors induce expression of nodulation and host-range genes in Rhizobium trifolii.  
Mol. Gen. Genet. 201:426-432.
- JACOBS T.W., EGELHOFF T.T. and LONG S.R. 1985.  
Physical and genetic map of a Rhizobium meliloti nodulation gene region and nucleotide sequence of nod C.  
J. Bacteriol 162:469-476.
- JENSEN J.S. and KENNEDY C. 1982.  
Pleiotropic effect of his gene mutations on nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae.  
EMBO J. 1:197-204.



- JOFFRE J., PRIETO M.J., TOMAS J. and PARES R. 1979.  
Excretion of glutamic acid in Citrobacter intermedius  
C3 associated with plasmid deoxyribonucleic acid.  
J. Bacteriol. 138:721-725.
- JOHNSTON A.W.B., BEYNON J.L., BUCHANAN-WOLLASTON A.V.,  
SETCHELL S.M., HIRSCH P.R. and BERINGER J.E. 1978a.  
High frequency transfer of nodulating ability between  
strains and species of Rhizobium.  
Nature 276:634-636.
- JOHNSTON A.W.B., SETCHELL S.M. and BERINGER J.E. 1978b.  
Interspecific crosses between Rhizobium leguminosarum  
and Rhizobium meliloti : formation of haploid recombinants  
and of R-primes.  
J. Gen. Microbiol. 104:209-218.
- JORDAN D.C. 1982.  
Transfer of Rhizobium japonicum Buchanan 1980 to  
Bradyrhizobium gen. nov., a genus of slow-growing root  
nodule bacteria from leguminous plants.  
Int. J. Syst. Bacteriol. 32:136-139.
- JOUANIN L., DE LAJUDIE P., BAZETOUX S. and HUGUET T. 1981.  
DNA sequence homology in Rhizobium meliloti plasmids.  
Mol. Gen. Genet. 182:189-195.
- JULLIOT J.S. and BOISTARD P. 1979.  
Use of RP4-prime plasmids constructed in vitro to  
promote a polarized transfer of the chromosome in  
Escherichia coli and Rhizobium meliloti.  
Mol. Gen. Genet. 173:289-298.
- KALUZA K., FUHRMANN M., HAHN M., REGENSBURGER B. and  
HENNECKE H. 1983.  
In Rhizobium japonicum the nitrogenase genes nif H  
and nif DK are separated.  
J. Bacteriol. 155:915-918.
- KALUZA K., HAHN M. and HENNECKE H. 1985.  
Repeated sequences similar to insertion elements  
clustered around the nif region of Rhizobium japonicum  
genome.  
J. Bacteriol. 162:535-542.
- KANESHIRO T., CROWELL C.D. and HANKARAN R.F. Jr. 1978.  
Acetylene reduction activity in free-living cultures  
of Rhizobia.  
Int. J. Syst. Bacteriol. 28:27-31.
- KEISTER D.L. 1975.  
Acetylene reduction by pure cultures of Rhizobia.  
J. Bacteriol. 123:1265-1268.



- KERSTERS K. and DE LEY J. 1975.  
Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.* 87:333-342.
- KEYSER H.H., BOHLOOL B.B., HU T.S. and WEBER D.F. 1982.  
Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science* 215:1631-1632.
- KISS G.B., DOBO K., DUSHA I., BREZNOVITS A., OROSZ L., VINCZE E. and KONDOROSI A. 1980.  
Isolation and characterization of an R-prime plasmid in Rhizobium meliloti. *J. Bacteriol.* 141:121-128.
- KLEIN G.E., JEMISON P., HAAK R.A. and MATYSSE A.G. 1975.  
Physical evidence of a plasmid in Rhizobium japonicum. *Experientia* 31:532-533.
- KLINTWORTH R., HUSEMANN M., SALNIKOW J. and BOWIEN B. 1985.  
Chromosomal and plasmid locations for phosphoribulokinase genes in Alcaligenes eutrophus. *J. Bacteriol.* 164:954-956.
- KONDOROSI A., KISS G.B., FORRAI T., VINCZE E. and BANFALVI Z. 1977.  
Circular linkage map of Rhizobium meliloti chromosome. *Nature* 268:525-527.
- KONDOROSI A., VINCZE E., JOHNSTON A.W.B. and BERINGER J.E. 1980.  
A comparison of three Rhizobium linkage maps. *Mol. Gen. Genet.* 178:403-408.
- KONDOROSI A., KONDOROSI E., PANKHURST C.E., BROUGHTON W.J. and BANFALVI Z. 1982.  
Mobilization of a Rhizobium meliloti megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and Agrobacterium. *Mol. Gen. Genet.* 188:433-439.
- KONDOROSI A., KISS G.B. and DUSHA I. 1983a.  
Plasmids governing symbiotic nitrogen fixation. In current developments in biological nitrogen fixation. Ed. SUBBA RAO N.S. Oxford. Ibh publishing Co. New Delhi. Bombay, Calcutta.
- KONDOROSI A., KONDOROSI E., BANFALVI Z., BROUGHTON W.J., PANKHURST C.E., RANDHAWA G.S., WONG C.H. and SCHELL J. 1983b.  
Analysis of symbiotic nitrogen fixation genes carried by the Rhizobium meliloti megaplasmid. In molecular genetics of the Bacteria-Plant Interaction edited by A. PÜHLER. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo.



- KONDOROSI E., BANFALVI Z. and KONDOROSI A. 1984.  
Physical and genetic analysis of a symbiotic region of  
Rhizobium meliloti : identification of nodulation genes.  
Mol. Gen. Genet. 193:445-452.
- KOWALCZUK E.A., SKORUPSKA A. and LORKIEWICZ Z. 1981.  
Transfer of nodulation ability in Rhizobium using R68-45  
derived plasmids.  
Mol. Gen. Genet. 183:388-391.
- KOWALSKI M. 1971.  
Transduction in Rhizobium meliloti.  
Plant and Soil, Special volume :63-66.
- KROL A.J., HONTELEZ J.G., VAN DEN BOS R.C. and VAN KAMMEN A. 1980.  
Expression of large plasmids in the endosymbiotic form  
of Rhizobium leguminosarum.  
Nucl. Acid. Res. 8:4337-4347.
- KROL A.J., HONTELEZ J.G. and VAN KAMMEN A. 1982a.  
Only one of the large plasmids in Rhizobium leguminosarum  
strain PRE is strongly expressed in the endosymbiotic state.  
J. Gen. Microbiol. 128:1839-1847.
- KROL A.J., HONTELEZ J.G., ROOZENDAAL B. and VAN KAMMEN A. 1982b.  
On the operon structure of the nitrogenase genes of  
Rhizobium leguminosarum and Azotobacter vinelandii.  
Nucl. Acid. Res. 10:4147-4157.
- LAEMMLI U.K. 1970.  
Cleavage of structural proteins during the assembly  
of the head of bacteriophage T4.  
Nature 227:680-685.
- LAIRD D.J. 1932.  
Bacteriophage and the root nodule bacteria.  
Arch. Microbiol. 3:159-193.
- LAMB J.W., HOMBRECHER G. and JOHNSTON A.W.B. 1982.  
Plasmid determined nodulation and nitrogen-fixation abilities  
in Rhizobium phaseoli.  
Mol. Gen. Genet. 186:449-452.
- LAMB J.W., DOWNIE J.A., JOHNSTON A.W.B. 1985.  
Cloning of the nodulation (nod) genes of Rhizobium phaseoli  
and their homology to Rhizobium leguminosarum nod DNA.  
Gene 34:235-241.
- LEDEBOER A.M., KROL A.J.M., DONS J.J.M., SPIER F.,  
SCHILPEROORT R.A., ZAENEN I., VAN LAREBEKE N. and SCHELL J.  
1976.  
On the isolation of the Ti plasmid from Agrobacterium  
tumefaciens.  
Nucl. Acid. Res. 3:449-463.



- LEDERBERG J. and LEDERBERG E.M. 1952.  
Replica plating and indirect selection of bacteria mutants.  
J. Bacteriol. 63:399-406.
- LIM S.T., ANDERSEN K., TAIT R. and VALENTINE R.C. 1980.  
Genetic engineering in agriculture : hydrogen uptake (hup) genes.  
TIBS 5:167-170.
- LONG S.R., BUIKEMA W.J. and AUSUBEL F.M. 1982.  
Cloning of Rhizobium meliloti nodulation genes by  
direct complementation of Nod mutants.  
Nature 298:485-488.
- LORKIEWICZ Z., RUSSA R. and URBANIK T. 1978.  
Nitrogen fixation by Rhizobium in pure cultures.  
Acta Microbiol. Polon. 27:5-9.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. 1951.  
Protein measurement with the Folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193:265-275.
- MAOUI K.R. 1980.  
Etude du transfert génétique de l'efficience chez Rhizobium meliloti.  
Thèse de 3ème cycle. Université des Sciences et Techniques  
de Lille.
- MAOUI K.R., BECHET M. and GUILLAUME J.B. 1985a.  
Megaplasmid transfer and incompatibility between  
plasmids of two different strains of Rhizobium meliloti.  
Microbios 42:251-262.
- MAOUI K.R., DOZIER C.M. and GUILLAUME J.B. 1985b.  
Evidence for the occurrence of two megaplasmids in Rhizobium meliloti strain M5N1.  
Microbios Lett. 30:7-11.
- MARVEL D.J., KULDAU G., HIRSCH A., RICHARDS E., TORREY J.G.  
and AUSUBEL F.M. 1985.  
Conservation of nodulation genes between Rhizobium meliloti  
and a slow-growing Rhizobium strain that nodulates a nonlegume  
host.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5841-5845.
- McCOMBIE W.R., HANSEN J.B., ZYLSTRA G.J., MAURER B. and  
OLSEN R.H. 1983.  
Pseudomonas streptomycin resistance transposon associated with  
R-plasmid mobilization.  
J. Bacteriol. 155:40-48.
- McFARLAND N., McCARTER L., ARTZ S. and KUSTU S. 1981.  
Nitrogen regulatory locus "glnR" of enteric bacteria is composed  
of cistrons ntrB and ntrC : identification of their  
protein products.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2135-2139.



- MEADE H.M. and SIGNER E.R. 1977.  
Genetic mapping of Rhizobium meliloti.  
Proc. natl. Acad. Sci. USA 74:2076-2078.
- MEGIAS M., CAVIEDES M.A., PALOMARES A.J. and SILVA J.P. 1982a.  
Use of plasmid R68-45 for constructing a circular  
linkage map of the Rhizobium trifolii chromosome.  
J. Bacteriol. 149:59-64.
- MEGIAS M., CAVIEDES M.A., PALOMARES A.J. and RUIZ-BERRAQUERO F. 1982b.  
Mutagenesis in Rhizobium trifolii.  
Microbios 35:39-48.
- MEYERS J.A., SANCHEZ D., ELWELL L.P. and FALKOW S. 1976.  
Simple agarose gel electrophoretic method for the  
identification and characterization of plasmid DNA.  
J. Bacteriol. 127:1529-1537.
- MIELENZ J.R., JACKSON L.E., O'GARA F. and SHANMUGAM K.T. 1979.  
Fingerprinting bacterial chromosomal DNA with restriction  
endonuclease EcoRI : comparaison of Rhizobium Spp. and  
identification of mutants.  
Can. J. Microbiol. 25:803-807.
- MONTOYA A., CHILTON M.D., GORDON M.P., SCIAKY D. and  
NESTER E. W. 1977.  
Octopine and nopaline metabolism in Agrobacterium tumefaciens  
and crown-gall tumor cells : role of plasmid genes.  
J. Bacteriol. 129:101-107.
- MOORE L.W., WARREN G. and STROBEL G.A. 1979.  
Involvement of a plasmid in the hairy root disease of  
plants caused by Agrobacterium rhizogenes.  
Plasmid 2:617-626.
- MULLIGAN J.T. and LONG S.R. 1985.  
Induction of Rhizobium meliloti nod C expression by plant  
exudate requires nod D.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6609-6613.
- NADLER K.D. and AVISSAR Y.J. 1977.  
Heme synthesis in soybean root nodules. I. Role of  
bacteroid delta-aminolevulinic acid synthase and delta-amino-  
levulinic acid dehydrase in synthesis of heme of  
leghaemoglobin.  
Plant. Physiol. 60:433-436.
- NICOL L.H. and THORNTON H.G. 1941.  
Competition between related strains of nodule bacteria and  
its influence on infection of the legume host.  
Proc. Roy. Soc. B130:32-59.
- NIEL C., GUILLAUME J.B. et BECHET M. 1977.  
Mise en évidence de deux enzymes présentant une activité  
 $\beta$ -galactosidasique chez Rhizobium meliloti.  
Can. J. Microbiol. 23:1178-1181.



- NUTI M.P., LEDEBOER A.M., LEPIDI A.A. and SCHILPEROORT R.A. 1977.  
Large plasmid in different Rhizobium species.  
J. Gen. Microbiol. 100:241-248.
- NUTI M.P., LEPIDI A.A., PRAKASH R.K., SCHILPEROORT R.A. and  
CANNON F.C. 1979.  
Evidence for nitrogen fixation genes on indigenous  
Rhizobium plasmids.  
Nature 282:533-535.
- PAAU A.S. and COWLES J.R. 1975.  
Comparison of DNA polymerase of Rhizobium meliloti  
and alfalfa bacteroids.  
Plant Physiol. 56:526-528.
- PAAU A.S., LEE D. and COWLES J.R. 1977.  
Comparison of nucleic acid content in populations of free-  
living and symbiotic Rhizobium meliloti by flow  
microfluorometry.  
J. Bacteriol. 129:1156-1158.
- PAAU A.S., COWLES J.R. and RAVEED D. 1978.  
Development of bacteroids in alfalfa (Medicago sativa) nodules.  
Plant Physiol. 62:526-530.
- PAAU A.S., ORO J. and COWLES J.R. 1979.  
DNA content of free-living Rhizobia and bacteroids  
of various Rhizobium-legume associations.  
Plant Physiol. 63:402-405.
- PALOMARES A., MONTOYA E. and OLIVARES J. 1977.  
Induction of polygalacturonase production in legume roots  
as a consequence of extrachromosomal DNA carried by  
Rhizobium meliloti.  
Microbios 21:33-39.
- PANKHURST C.E., BROUGHTON W.J. and WIENEKE U. 1983.  
Transfer of an indigenous plasmid of Rhizobium loti to other  
Rhizobia and Agrobacterium tumefaciens.  
J. Gen. Microbiol. 129:2535-2543.
- PARES R., GUINEA J., HERNANDEZ S., VALOIX J. and JOFRE J. 1974.  
A new episomic element controlling fermentative metabolism  
and excretion of amino acids by Citrobacter intermedium C3.  
J. Bacteriol. 119:9-18.
- PRAKASH R.K., HOOYKAAS P.J.J., LEDEBOER A.M., KIJNE J.W.,  
SCHILPEROORT R.A., NUTI M.P., LEPIDI A.A., CASSE F.,  
BOUCHER C., JULLIOT J.S. and DENARIE J. 1980.  
Detection, isolation and characterization of large  
plasmids in Rhizobium.  
In NEWTON W.E. and ORME. JOHNSON W.E. (ed.), Nitrogen fixation  
vol 2 139-163. University Park Press Baltimore



- PRAKASH R.K., SCHILPERCORT R.A., NUTI M.P. 1981.  
Large plasmids of fast-growing rhizobia : homology studies  
and location of structural nitrogen fixation genes.  
J. Bacteriol. 145:1129-1136.
- PRAKASH R.K. and SCHILPERCORT R.A. 1982.  
Relationship between nif plasmids of fast-growing Rhizobium  
species and Ti-plasmids of Agrobacterium tumefaciens.  
J. Bacteriol. 149:1129-1134.
- PRAKASH R.K. and ATHERLY A.G. 1984.  
Reiteration of genes involved in symbiotic nitrogen fixation  
by fast-growing Rhizobium japonicum.  
J. Bacteriol. 160:785-787.
- PRIEFER U.B., BURKARDT H.J., KLIPP W. and PÜHLER A. 1981.  
ISR1 : An insertion element isolated from the soil  
bacterium Rhizobium lupini.  
Cold. Spring Harbor Sym. Quant. Biol. :87-91.
- PÜHLER A., AGUILAR M.O., HYNES M., MULLER P., KLIPP W.,  
PRIEFER U., SIMON R. and WEBER G. 1984.  
Advances in the genetics of free-living and symbiotic  
nitrogen fixing bacteria.  
In advances in Nitrogen fixation Research. Proceedings of  
the 5th International Symposium on Nitrogen fixation,  
Noordwijkerhout, The Netherlands. Edited by C. VEEGER and  
N.E. NEWTON. p. 609-619. Martinus Nijhoff, Dr. W. Junk  
Publishers. The Hague, Boston, Lancaster.
- PUTNOKY P., KISS G.B., OTT I. and KONDOROSI A. 1983.  
Tn5 carries a streptomycin-resistance determinant  
downstream from the kanamycin-resistance gene.  
Mol. Gen. Genet. 191:288-294.
- QUANT R.L. and MILLS D. 1984.  
An integrative plasmid and multiple-sized plasmids  
of Pseudomonas syringae pv. phaseolicola have  
extensive homology.  
Mol. Gen. Genet. 193:459-466.
- REIJNDERS L., VISSER L., AALBERS A.M.T., VAN KAMMEN A.  
and HOUWERS A. 1975.  
A comparison of DNA from free-living and endosymbiotic  
Rhizobium leguminosarum (strain PRE).  
Biochim. Biophys. Acta 414:206-216.
- ROSENBERG C., BOISTARD P., DENARIE J. and CASSE-DELBART F. 1981.  
Genes controlling early and late functions in symbiosis  
are located on a megaplasmid in Rhizobium meliloti.  
Mol. Gen. Genet. 184:326-333.



- ROSENBERG C., CASSE-DELBART F., DUSHA I., DAVID M. and BOUCHER C. 1982.  
Megaplasmiids in the plant-associated bacteria Rhizobium meliloti and Pseudomonas solanacearum.  
J. Bacteriol. 150:402-406.
- ROSSEN L., MA Q.S., MUDD E.A., JOHNSTON A.W.B. and DOWNIE J.A. 1984.  
Identification and DNA sequence of fix Z, a nif B-like gene from Rhizobium leguminosarum.  
Nucl. Acid. Res. 12:7123-7234.
- ROSSEN L., SHEARMAN C.A., JOHNSTON A.W.B. and DOWNIE J.A. 1985.  
The nod D gene of Rhizobium leguminosarum is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the nod A,B,C genes.  
EMBO J. 4:3369-3373.
- ROY P. and MISHRA A.K. 1976.  
Amino acid requiring auxotrophs in Rhizobium lupini and their growth response to required metabolites.  
The nucleus 19:25-29.
- RUIZ-SAINZ J.E., CHANDLER M.R., JIMENES-DIAZ R. and BERINGER J.E. 1984.  
Transfer of a host range plasmid from Rhizobium leguminosarum to fast-growing bacteria that nodulate soybeans.  
J. Appl. Bacteriol. 57:309-315.
- RUVKUN G.B. and AUSUBEL F.M. 1980.  
Interspecies homology of nitrogenase genes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:191-195.
- RUVKUN G.B. and AUSUBEL F.M. 1981.  
A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes.  
Nature 289:85-88.
- RUVKUN G.B., LONG S.P., MEADE H.M., VAN DE BOS R.C. and AUSUBEL F.M. 1982.  
ISRm1 : A Rhizobium meliloti insertion sequence that transposes preferentially into nitrogen fixation genes.  
J. Mol. Appl. Gen. 1:405-418.
- SADOWSKI M.J. and BOHLOOL B.B. 1983.  
Possible involvement of a megaplasmid in nodulation of soybeans by fast-growing Rhizobia from China.  
Appl. Environ. Microbiol. 46:906-911.
- SANCHEZ A., FERNANDEZ L. and NOEL K.D. 1983.  
Symbiosis-specific genetic loci of Rhizobium phaseoli.  
Proc. of the 5th Intern. Sym. on Nitrogen Fixation.
- SANDERS R.E., CARLSON R.W. and ALBERSHEIM P. 1978.  
A Rhizobium mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion.  
Nature 271:240-242.



- SHELL J. and VAN MONTAGU M. 1979.  
The Ti plasmids of Agrobacterium tumefaciens and their role  
in crown-gall formation.  
In genome Organization and Expression in Plants. C.J.  
LEAVER ed. p.453-470. Plenum, New York.
- SCHETGENS R.M.P., HONTELEZ J.G.J., VAN DEN BOS R.C. and  
VAN KAMMEN A. 1985.  
Identification and phenotypical characterization of a cluster  
of fix genes, including a nif regulatory gene, from  
Rhizobium leguminosarum PRE.  
Mol. Gen. Genet. 200:368-374.
- SCHLEGEL H.G. 1984.  
Global impacts of prokaryotes and eukaryotes.  
In KELLY D.P., CARR N. G. eds. The microbe prokaryotes and  
eukaryotes. Soc. Gen. Microbiol. Symp. 36 (11). Cambridge :  
Cambridge University Press:1-22.
- SCHMIDT J., JOHN M., KONDOROSI E., KONDOROSI A., WIENEKE U.,  
SCHROEDER G., SCHROEDER J. and SHELL J. 1984.  
Mapping of the protein-coding regions of Rhizobium meliloti  
common nodulation genes.  
EMBO J. 3:1705-1711.
- SCHOFIELD P.R., DJORDJEVIC M.A., ROLFE B.G., SHINE J. and  
WATSON J.M. 1983.  
A molecular linkage map of nitrogenase and nodulation  
genes in Rhizobium trifolii.  
Mol. Gen. Genet. 192:459-465.
- SCHOFIELD P.R., RIDG R.W., ROLFE B.G., SHINE J. and WATSON J.M. 1984  
Host-specific nodulation is encoded on a 14 kb fragment  
in Rhizobium trifolii.  
Plant Mol. Biol. 3:3-11.
- SCHUBERT K.R., JENNINGS N.T. and EVANS H.J. 1978.  
Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants.  
II. Effects on dry matter accumulation and nitrogen  
fixation.  
Plant Physiol. 61:398-401.
- SCHWINGHAMER E.A. 1967.  
Effectiveness of Rhizobium as modified by mutation for  
resistance to antibiotics.  
Antonie Van Leeuwenhoek. 33:121-136.
- SCHWINGHAMER E.A., EVANS H.T. and DAWSON M.D. 1970.  
Evaluation of effectiveness in mutant strains of  
Rhizobium by acetylene reduction relative to other  
criteria of N<sub>2</sub> fixation.  
Plant and Soil. 33:192-212.



- SCHWINGHAMER E.A. and DENNIS E.S. 1979.  
Electron microscopic evidence for a multimeric system of plasmids in fast-growing Rhizobium spp.  
Aus. J. Biol. Sci. 32:651-662.
- SCHWINGHAMER E.A. 1980.  
A method for improved lysis of some gram-negative bacteria.  
FEMS Lett. 7:157-162.
- SCIACKY H.G., MONTOYA A. and CHILTON M.D. 1978.  
Fingerprints of Agrobacterium Ti plasmids.  
Plasmid 1:238-253.
- SCOTT K.F., HUGHES J.E., GRESSHOFF P.M., BERINGER J.E.,  
ROLFE B.G. and SHINE J. 1982.  
Molecular cloning of Rhizobium trifolii genes involved  
in symbiotic nitrogen fixation.  
J. Mol. Appl. Genet. 1:315-326.
- SCOTT D.B. and RONSON C.W. 1982.  
Identification and mobilization by cointegrate formation  
of a nodulation plasmid in Rhizobium trifolii.  
J. Bacteriol. 151:36-43.
- SCOTT K.F., ROLFE B.G. and SHINE J. 1983a.  
Biological nitrogen fixation : primary structure of  
the Rhizobium trifolii iron protein gene.  
DNA 2:149-155.
- SCOTT K.F., ROLFE G.B. and SHINE J. 1983b.  
Nitrogenase structural genes are unlinked in the nonlegume  
symbiont Parasponia Rhizobium.  
DNA 2:141-148.
- SELVARAJ G. and IYER V.N. 1984.  
Transposon Tn5 specifies streptomycin resistance  
in Rhizobium spp.  
J. Bacteriol. 158:580-589.
- SHANTHARAM S. and WONG P.P. 1982.  
Recognition of leguminous hosts by a promiscuous Rhizobium  
strain.  
Appl. Environ. Microbiol. 43:677-685.
- SIDLOI-LUMBROSO R., KLEIMAN L. and SCHULMAN H.M. 1978.  
Biochemical evidence that leghaemoglobin genes are  
present in the soybean but not in Rhizobium genome.  
Nature 273:558-560.
- SIMON R., PRIEFER U. and PUHLER 1983.  
Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulations  
of Gram-negative bacteria.  
In : Molecular genetics of plant-bacteria interactions.  
Ed. A. PÜHLER, Springer Verlag Berlin Heidelberg. p.98-106.



- SIMON R. 1984.  
High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon.  
Mol. Gen. Genet. 196:413-420.
- SØRENSEN G.M. and WYNDAELE R. 1986.  
Effect of transfer of symbiotic plasmids and of hydrogenase genes (hup) on symbiotic efficiency of Rhizobium leguminosarum strains.  
J. Gen. Microbiol. 132:317-324.
- SOUTHERN E.M. 1975.  
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.  
J. Mol. Biol. 98:503-517.
- SPITZBARTH M., PÜHLER A. and HEUMANN W. 1979.  
Characterization of plasmids isolated from Rhizobium meliloti.  
Arch. Microbiol. 121:1-7.
- STROBEL G.A., LAM B., HARRISON L., HESS B.M. and LAM S. 1985.  
Introduction of the hairy root plasmid into Rhizobium meliloti results in increased nodulation on its hosts.  
J. Gen. Microbiol. 131:355-361.
- SUTTON W.D., PANKHURST C.E. and GRAIG A.S. 1981.  
The Rhizobium bacteroid state.  
In : Int. Rev. Cytol., Suppl 13, ATHERLY A. Ed., New York Acad. Press:149-177.
- SZABO L.J. and MILLS D. 1984a.  
Integration and excision of pMC7105 in Pseudomonas syringae pv. phaseolicola : Involvement of repetitive sequences.  
J. Bacteriol. 157:821-827.
- SZABO L.J. and MILLS D. 1984b.  
Characterization of eight excision plasmids of Pseudomonas syringae pv. phaseolicola.  
Mol. Gen. Genet. 195:90-95.
- SZETO W.W., ZIMMERMAN J.L., SUNDARESAN V. and AUSUBEL F.M. 1984.  
A Rhizobium meliloti symbiotic regulatory gene.  
Cell 36:1035-1043.
- TEMPE J., PETIT A. et BANNEROT H. 1982.  
Présence de substances semblables à des opines dans des nodosités de Luzerne.  
C.R. Acad. Sc. Paris 295:413-416.
- TOMAS J., REGUE M., PARES R. and JOFRE J. 1982.  
Citrate utilizing ability linked to glutamic acid excretion governing conjugative plasmid in Klebsiella pneumoniae C3.  
Zbl. Bakt. Hyg, I Abt. Orig. C3 457-465.



- VERMA D.P.S. 1980.  
Expression of host genes during symbiotic nitrogen fixation.  
"Genome organization and expression in plants".  
Ed. C.J. Leaver. Plenum Press. 439-451.
- VERMA D.P.S. and LONG S.L. 1983.  
The molecular biology of Rhizobium-legume symbiosis.  
Int. Rev. Cytol. 14:211-245.
- VEEGER C. and NEWTON W.E. 1984.  
Advances in Nitrogen Fixation Research. Proc. 5th  
Int. Symp. Nitrogen Fixation Noordwijkerhout,  
The Netherlands, The Hague : Nijhoff. p.760.
- VINCENT J.M. and HUMPHREY B. 1970.  
Somatic antigens of two strains of Rhizobium trifolii.  
J. Gen. Microbiol. 63:379-382.
- VINCENT J.M. 1974.  
Root- nodule symbioses with Rhizobium. The biology  
of nitrogen fixation.  
(A. QUISPÉL Editor). Frontiers of Biology. 33:265-341.
- VINCENT J.M. 1980.  
Factors controlling the legume-Rhizobium symbiosis.  
In : Nitrogen fixat. (Kettering Int. Symp. Nitrogen  
Fixation) :103-129.
- VINCZE E., KONCZ C. and KONDOROSI A. 1982.  
Construction in vitro of R-prime plasmids and their use  
for transfer of chromosomal gene and plasmids of  
Rhizobium meliloti.  
Acta. Biol. Acad.-Sci. Hung. 32:195-204.
- WATSON B., CURRIER T.C., GORDON M.P., CHILTON M.D.  
and NESTER E.W. 1975.  
Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens.  
J. Bacteriol. 123:255-264.
- WEBER G., REILANDER H. and PUHLER A. 1985.  
Mapping and expression of a regulatory nitrogen fixation  
gene (fix D) of Rhizobium meliloti.  
EMBO J. 4:2751-2756.
- WERNER D., MORSCHEL E., STRIPF R. and WINCHENBACH B. 1980.  
Development of nodules of Glycine max infected with  
an ineffective strain of Rhizobium japonicum.  
Planta. 147:320-329.
- WHITE L.O. 1972.  
The taxonomy of the crown-gall organism Agrobacterium  
tumefaciens and its relationship to Rhizobia and other  
Agrobacterium.  
J. Gen. Microbiol. 72:565-574.



- WIJFFELMAN C.A., PEES E., VAN BRUSSEL A.A.N., OKKER R.J.H.  
and LUGTENBERG B.J.J. 1985.  
Genetic and functional analysis of the nodulation region of  
the Rhizobium leguminosarum Sym plasmid pRL1J1.  
Arch. Microbiol. 143:225-232.
- ZAFARULLAH M., CHARLIER D. and GLANSDORFF. 1981.  
Insertion of IS3 can "Turn-on" a silent gene in  
Escherichia coli.  
J. Bacteriol. 146:415-417.
- ZIMMERMAN J.L., SZETO W.W. and AUSUBEL F.M. 1983.  
Molecular characterization of Tn5-induced symbiotic  
(Fix-) mutants of Rhizobium meliloti.  
J. Bacteriol. 156:1025-1035.
- ZURKOWSKI W. and LORKIEWICZ Z. 1976.  
Plasmid DNA in Rhizobium trifolii.  
J. Bacteriol. 128:481-484.
- ZURKOWSKI W. and LORKIEWICZ Z. 1978.  
Effective method for the isolation of non-nodulating mutants  
of Rhizobium trifolii.  
Genet. Res. 32:311-314.
- ZURKOWSKI W. and LORKIEWICZ Z. 1979.  
Plasmid mediated control of nodulation in Rhizobium trifolii.  
Arch. Microbiol. 123:195-201.
- ZURKOWSKI W. 1981.  
Conjugational transfer of the nodulation-conferring  
plasmid pWZ2 in Rhizobium trifolii.  
Mol. Gen. Genet. 181:522-524.
- ZURKOWSKI W. 1982.  
Molecular mechanism for loss of nodulation properties of  
Rhizobium trifolii.  
J. Bacteriol. 150:999-1007.