

50376
1991
130

68576

50376
1991
130

N° d'ordre : 791

THÈSE D'ETAT

présentée à

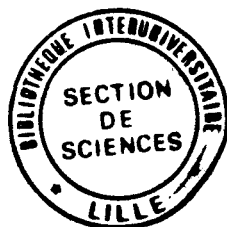
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Claude DEFIVES



LA RELATION PHAGE-BACTERIE CHEZ *RHIZOBIUM MELILOTI*; ROLE DES POLYSACCHARIDES DE SURFACE

Présentée le 11 Juin 1991 devant le Jury composé de :

M.	J.B.	GUILLAUME	Professeur, Université Lille I	Président et Rapporteur
M.	B.	FOURNET	Professeur, Université Lille I	Rapporteur
M.	G.	PRENSIER	Professeur, Université de Clermont-Ferrand	Rapporteur
Mme	J.	ROCOURT	Docteur, Institut Pasteur de Paris	Examineur
M.	J.C.	DERIEUX	Professeur, Université de Lille I	Examineur
M.	R.	TAILLIEZ	Professeur, Université Lille I	Examineur

A Renée

A Christelle, Stéphane

REMERCIEMENTS

Le travail présenté ici a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (U.S.T.L.F.A.) sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur Jean GUILLAUME. En m'accueillant, en 1968, dans votre Laboratoire de Chimie Bactérienne à l'Institut Pasteur de Lille puis au Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Lille, vous m'avez formé à la Recherche. Grâce à vos conseils judicieux et vos qualités humaines, mes travaux aboutissent à ce Mémoire. Je vous exprime ma profonde gratitude et vous remercie vivement d'être à la fois le Rapporteur de ce travail et le Président de ce Jury.

Que M. le Professeur G. PRENSIER (Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand) soit remercié d'avoir accepté d'être Rapporteur de cette Thèse. Par ailleurs, j'ai souvent bénéficié de ses compétences en microscopie électronique. Je l'assure de ma sincère et très amicale gratitude.

Une partie de ce travail, la composition des lipopolysaccharides, a été réalisée en étroite collaboration avec le service de M. le Professeur B. FOURNET (Laboratoire de Chimie-Biologique, U.S.T.L.F.A.). Il m'a toujours accueilli chaleureusement et guidé avec efficacité dans l'analyse biochimique. Je l'en remercie vivement ainsi que d'avoir accepté d'être l'un de mes Rapporteurs.

M. le Professeur J.C. DERIEUX (Institut Universitaire de Technologie de Lille) m'a toujours assuré d'un soutien amical et constant. Au cours de la discussion de ces travaux, j'ai trouvé auprès de lui une aide et une disponibilité sans faille. Je le remercie vivement d'avoir bien voulu participer à ce Jury.

Je remercie Madame le Docteur J. ROCOURT (Unité d'Ecologie Bactérienne, Institut Pasteur de Paris) d'avoir accepté de juger ce travail malgré ses nombreuses occupations.

M. le Professeur R. TAILLIEZ (Institut Agricole et Alimentaire de Lille) m'a toujours apporté une aide amicale. Je le remercie pour sa critique concernant la Restriction-Modification et sa participation à ce Jury.

Que mes Collègues et Amis, J.P. HORNEZ et M. WERQUIN, soient particulièrement remerciés pour leur étroite collaboration scientifique et leur amitié qui ne s'est jamais démentie durant toutes ces années.

L'analyse des produits de dépolymérisation des exopolysaccharides a été effectuée par M. A. HEYRAUD (Centre de Recherches sur les Macromolécules végétales, Université de Grenoble). Je lui suis très reconnaissant d'avoir accepté cette excellente collaboration.

Je dois également remercier chaleureusement :

- M. O. KOL (Maître de Conférences, Laboratoire de Chimie-Biologique, U.S.T.L.F.A.) pour l'analyse des lipopolysaccharides ;
- M. et Mme COURTOIS (Professeur et Maître de Conférences, IUT d'Amiens) pour nos relations amicales et scientifiques ;
- M. H.C. DUBOURGUIER (Directeur de Recherche I.N.R.A. affecté à l'U.S.T.L.F.A.) pour son aide et ses précieux conseils ;
- les Collaborateurs, Etudiants de 3ème Cycle et Stagiaires, qui ont participé à ces recherches ;
- M. J.C. DESRUMEAUX, Technicien du Centre Commun de Microscopie Electronique de l'U.F.R. de Biologie dont les compétences et la disponibilité m'ont été d'un grand secours ;
- Mme A. AUGER et M. D. LAZARECKY pour la qualité d'exécution des planches photographiques ;

- Michèle DELECOURT pour l'efficacité, le soin et la qualité qu'elle a apportés à la dactylographie de ce Mémoire.

Enfin, je ne saurais oublier tous les membres du Laboratoire de Microbiologie et, en particulier, M. M. BECHET, Collègues et Amis qui, à quelque titre que ce soit, m'ont apporté aide et sympathie.

A B R E V I A T I O N S

- Relatives aux polysaccharides :

CPS	: polysaccharides capsulaires
EPS	: exopolysaccharides
LPS	: lipopolysaccharides
ANAN	: acide N-acétylneuraminique
Col	: colitose
Gal	: galactose
GalAU	: acide galacturonique
GalNAc	: N-acétylgalactosamine
Glc	: glucose
GlcAU	: acide glucuronique
GlcNH ₂ ou GlcN	: glucosamine
GlcNAc	: N-acétylglucosamine
Hep	: heptose
KDO	: acide 3 déoxy-D-mannoctulosonique
Man	: mannose
Rha	: rhamnose
Ac	: acétyl
Me	: méthyl

- Relatives aux techniques et mesures :

CPG	: chromatographie en phase gazeuse
CLHP	: chromatographie liquide à haute performance
DO	: densité optique
SM/IE	: spectrométrie de masse par ionisation électronique
SM/IC	: spectrométrie de masse par ionisation chimique
RMN ¹ H	: résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ¹³ C	: RMN du carbone 13

g	: accélération de la pesanteur
nm	: nanomètre (10^{-9} mètre)
ng	: nanogramme (10^{-9} gramme)
PM	: poids moléculaire
M	: concentration molaire
mM	: concentration millimolaire
CEE	: coefficient d'efficacité d'étalement (E)
UFP	: unité formant plage
AU	: acétate d'uranyle
PT	: acide phosphotungstique

- Diverses :

DOC	: déoxycholate (de sodium)
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique
SAM	: S adénosylméthionine
bv	: biovar
pb	: paire de bases
R/M	: Restriction-Modification

S O M M A I R E

REMERCIEMENTS	1
ABREVIATIONS	4
SOMMAIRE	6
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLEAUX	18
AVANT - PROPOS	21
INTRODUCTION	
CHAPITRE I - LES RHIZOBIACEAE	
I. - TAXONOMIE	23
II. - GENOME	26
III. - ECOLOGIE	27
A. - <u>Facteurs écologiques affectant la compétition</u>	29
B. - <u>Facteurs biologiques affectant la compétition</u>	32
IV. - STRUCTURES EXTERNES DES <u>RHIZOBIACEAE</u>	32
A. - <u>Les exopolysaccharides</u>	34
1 - Généralités	34
2 - Les exopolysaccharides de <u>Rhizobiaceae</u>	36

B. - <u>Les lipopolysaccharides</u>	38
1 - Généralités	38
2 - Les lipopolysaccharides de <u>Rhizobiaceae</u>	43

CHAPITRE II - LES INTERACTIONS CELLULAIRES DE SURFACE DANS LA NODULATION

I. - ONTOGENESE DES NODULES	47
A. - <u>Processus général</u>	47
B. - <u>Organisation des nodules de Luzerne</u>	55
II. - ROLE DES STRUCTURES BACTERIENNES DE SURFACE	57

CHAPITRE III - LES BACTERIOPHAGES DES RHIZOBIACEAE

I. - PROPRIETES GENERALES DES BACTERIOPHAGES	69
A. - <u>Taxonomie</u>	69
B. - <u>Nature de la relation phage-bactérie</u>	71
C. - <u>Application des bactériophages</u>	73
D. - <u>Multiplication des phages : le cycle lytique</u>	75
1 - Adsorption et infection	75
a) <u>Les sites d'adsorption</u>	76
α) Sur les phages	76
β) Sur les bactéries	76
b) <u>L'infection</u>	79
2 - Phase d'éclipse	80
3 - Maturation et libération	80
E. - <u>Une alternative au cycle lytique : la restriction-modification</u>	81
1 - Définitions	81
2 - Distribution des systèmes R.M.	82
3 - Les enzymes	83
a) <u>Généralités</u>	83
b) <u>Nomenclature</u>	84
c) <u>Enzymes de type I</u>	85
d) <u>Enzymes de type II</u>	86

e) <u>Enzymes de type III</u>	88
f) <u>Antirestriction</u>	88
II. - LES PHAGES DE <u>RHIZOBIACEAE</u>	89
A. - <u>Caractérisation</u>	89
B. - <u>Adsorption et activités enzymatiques associées</u>	90
C. - <u>Rôles des rhizobiophages</u>	92
1 - Transduction	92
2 - Lysogénie	92
3 - Lysotypie	93
4 - Les phages et la symbiose	93
 M A T E R I E L E T M E T H O D E S	
I. - ORIGINE ET CULTURE DES SOUCHES BACTERIENNES	96
A. - <u>Origine</u>	96
B. - <u>Conditions de culture et de conservation des bactéries</u>	97
II. - ORIGINE ET OBTENTION DES BACTERIOPHAGES	97
A. - <u>Origine</u>	97
B. - <u>Obtention des bactériophages</u>	98
1 - Réalisation d'un stock de phages	98
2 - Dénombrement des phages	99
3 - Conservation des bactériophages	99
III. - MILIEUX DE CULTURE ET SOLUTIONS	99
A. - <u>Milieu RC (Rhizobium complet) de LAIRD (1932)</u> <u>modifié par DELATTRE (1971)</u>	99
B. - <u>Milieu Y.E.M. (Yeast Extract Mannitol) de FRED</u> <u>et al. (1932) modifié par BAL et al. (1978)</u>	100
C. - <u>Milieu R (Rhizobium) ou RHBI (DELATTRE, 1971)</u>	100
D. - <u>Bouillon et gélose nutritives ordinaires</u>	101

E. - <u>Gélose bactériophage à 7,5 % d'agar</u>	101
F. - <u>TNP (Tampon de Non Prolifération) de COURTOIS (1984)</u>	101
G. - <u>Solutions</u>	101
1 - Fructose	101
2 - Vitamines	102
3 - Bactopeptone DIFCO	102
4 - Cations	102
 IV. - METHODES RELATIVES A L'ETUDE DES PHAGES	 102
A. - <u>Paramètres de lyse</u>	102
B. - <u>Cinétiques de lyse</u>	102
1 - En biophotomètre	102
2 - En fermenteur	103
C. - <u>Multiplication en une seule étape</u>	104
D. - <u>Adsorption des phages - Mesure de l'adsorption sur les bactéries</u>	105
1 - Cinétiques et constantes d'adsorption	105
2 - Quantité de phages pouvant s'adsorber sur une bactérie	106
3 - Inhibition par les lectines	106
4 - Inhibition par les oses	107
5 - Rôle des EPS	107
6 - Rôle des LPS	107
a) <u>Action du déoxycholate de sodium (DOC)</u>	108
b) <u>Action de l'EDTA</u>	108
E. - <u>Restriction - Modification</u>	108
1 - Calcul des coefficients d'efficacité d'étalement	108
2 - Facteurs influençant la Restriction-Modification	109
a) <u>Milieu de culture et temps de croissance</u>	109
b) <u>Chloramphénicol</u>	109
c) <u>Température</u>	109
3 - Détection des nucléotides libres dans le lysat	109
 V. - METHODES DE DOSAGE	 110
A. - <u>Protéines totales</u>	110
B. - <u>Oses totaux</u>	110

C. - <u>Acides sialiques libres</u>	110
D. - <u>Acides nucléiques</u>	110
VI. - ETUDE DES EXOPOLYSACCHARIDES	110
A. - <u>Production</u>	110
1 - Croissance non régulée	110
2 - Croissance en fermenteur	110
B. - <u>Extraction des EPS</u>	111
C. - <u>Mesures viscosimétriques</u>	111
D. - <u>Analyse des produits de dépolymérisation</u>	112
1 - Préparation des échantillons	112
2 - Ultrafiltration	112
3 - Analyse de la fraction retenue (P1)	112
a) <u>Hydrolyse sulfurique</u>	112
b) <u>Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)</u>	112
c) <u>RMN¹H</u>	113
4 - Analyse de la fraction non retenue (P2)	113
a) <u>Biogel P4</u>	113
VII. - ETUDE DES LIPOPOLYSACCHARIDES	113
A. - <u>Extraction par la technique de WESTPHAL et JANN (1965)</u> .	113
B. - <u>Purification des lipopolysaccharides</u>	114
1 - Traitement à la DNase, RNase et pronase	114
a) <u>Traitement à la DNase</u>	114
b) <u>Traitement à la RNase</u>	114
c) <u>Digestion par la pronase</u>	114
d) <u>Ultracentrifugations</u>	115
2 - Purification de l'extrait phénol/eau par chromatographie de gel filtration	115
3 - Chromatographie Liquide de Haute Performance (CLHP)	115
C. - <u>Caractérisation des lipopolysaccharides</u>	116
1 - Test au lysat d'amoebocytes de Limule	116
2 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide - dodécylsulfate de sodium (SDS - PAGE)	116
3 - Epreuve à l'acriflavine et au chlorure de sodium	117

D. - <u>Analyse des sucres et des acides gras du LPS de R. meliloti M11S</u>	117
1 - Chromatographie de Partage en Phase Gazeuse (CPG) ..	117
2 - Caractérisation des acides sialiques	118
a) <u>Hydrolyse partielle de l'acide sialique par la méthode de VARKI et DIAZ (1984)</u>	118
b) <u>Identification des acides sialiques en spectrométrie de masse</u>	119
c) <u>Action de la neuraminidase</u>	119
 VIII. - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	 120
A. - <u>A transmission</u>	120
1 - Sur coupes ultra-fines	120
a) <u>Nodules de Luzerne</u>	120
b) <u>Cellules bactériennes</u>	121
2 - Après coloration négative	121
a) <u>LPS</u>	121
b) <u>Phages</u>	122
c) <u>Cellules de R. meliloti productrices d'EPS</u>	122
B. - <u>A balayage</u>	122

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I - DEVELOPPEMENT DES PHAGES DE RHIZOBIUM MELILOTI

I. - DESCRIPTION DES PHAGES ET CHOIX DES SOUCHES BACTERIENNES PROPAGATRICES	124
 II. - ETUDE GENERALE DU CYCLE LYTIQUE	 126
A. - <u>Paramètres de lyse</u>	126
1 - Milieu de culture et cations divalents	126
2 - Multiplicité d'infection	130
B. - <u>Cinétiques de lyse</u>	133
1 - En biophotomètre	133
2 - En fermenteur	136

C. - <u>Développement intracellulaire</u>	138
1 - Adsorption	138
2 - Production des virions	138
a) <u>Multiplication en une seule étape</u>	138
b) <u>Etude en microscopie électronique</u>	140
D. - <u>Restriction-Modification</u>	141
1 - Mise en évidence	141
2 - Répartition des systèmes R/M	143
3 - Aspects physiologiques de la Restriction-Modification ...	152
a) <u>Apparition de nucléotides dans le lysat</u>	152
b) <u>Effet de la croissance bactérienne et du milieu de culture</u>	153
c) <u>Effet de la température et du chloramphénicol</u>	154

C H A P I T R E II - ADSORPTION DES PHAGES DE R. MELILOTI ET INTERACTIONS AVEC LES STRUCTURES EXTERNES

I. - ETUDE GENERALE DE L'ADSORPTION	157
A. - <u>Cinétiques d'adsorption</u>	157
B. - <u>Constantes d'adsorption</u>	157
C. - <u>Détermination du nombre de phages pouvant s'adsorber sur une bactérie</u>	159
1 - Détermination théorique	159
2 - Détermination expérimentale	160
II. - INTERACTIONS ENTRE LES PHAGES ET LES EXOPOLYSACCHARIDES DE <u>R. MELILOTI</u>	162
A. - <u>Synthèse d'EPS et inhibition de l'adsorption</u>	162
B. - <u>Activités enzymatiques associées aux phages</u>	163
C. - <u>Analyse des produits de dépolymérisation</u>	168
1 - Etude des produits P1	169
a) <u>CLHP</u>	169
b) <u>RMN¹H</u>	169
2 - Etude des produits P2	171

III. - INTERACTIONS ENTRE LE PHAGE NM8 ET LES LIPOPOLYSACCHARIDES DE <u>R. MELILOTI M11S</u>	172
A. - <u>Extraction des LPS</u>	172
B. - <u>Modalités de l'adsorption du phage</u>	173
C. - <u>Caractérisation des LPS</u>	175
1 - Test au lysat d'amœbocytes de Limule	175
2 - Microscopie électronique	176
3 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide - Dodécylsulfate de sodium	177
D. - <u>Analyse du LPS</u>	178
E. - <u>Etude du site récepteur du phage NM8.M11S</u>	187
 CONCLUSION	 192
 ANNEXE I	
 PLANCHE 1 : <u>RHIZOBIUM MELILOTI</u>	 196
 PLANCHE 2 : PRODUCTION D'EPS PAR DES CELLULES DE <u>R. MELILOTI M11S</u> CULTIVEES EN MILIEU RC FRUCTOSE	 198
 PLANCHE 3 : NODULES DE LUZERNE (<u>MEDICAGO SATIVA</u>) EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE	 200
 PLANCHE 4 : NODULES DE LUZERNE (<u>MEDICAGO SATIVA</u>) EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION	 202
 PLANCHE 5 : RHIZOBIOPHAGES	 204
 PLANCHE 6 : DEVELOPPEMENT INTRACELLULAIRE DU PHAGE ϕ CM1.M12S	 206

ANNEXE II

**IDENTIFICATION PRESOMPTIVE RAPIDE DE RHIZOBIUM
MELILOTI PAR MICROGALERIES API**

I. - PRINCIPE	208
II. - REALISATION PRATIQUE	209
Tableau 1 - Origine des souches utilisées	210
III. - RESULTATS - CONCLUSION	211
A. - <u>API 20 NE</u>	211
Tableau 2 - Résultats des galeries API 20 NE	212
B. - <u>API 20 B</u>	213
Tableau 3 - Résultats des galeries API 20 B	214
Tableau 4 - Profil numérique des bactéries hétérotrophes aérobies de l'environnement (galeries API 20 B)	215
ABREVIATIONS DES TESTS ET REACTIONS UTILISES DANS LES GALERIES API 20 NE ET API 20 B	216
BIBLIOGRAPHIE	218

LISTE DES FIGURES

Figure 1 -	Facteurs pouvant influencer la compétition pour la nodulation	30
Figure 2 -	Organisation des enveloppes des bactéries à Gram-négatif	33
Figure 3 -	Différentes formes d'exopolysaccharides bactériens	34
Figure 4 -	Unités de répétition des EPS synthétisés par <i>R. meliloti</i> (type I) et <i>R. leguminosarum</i> (types II et III) ..	37
Figure 5 -	Structure du succinoglycane de <i>R. meliloti</i> M5N1	39
Figure 6 -	Structure des unités de répétition de <i>B. japonicum</i> CB1795 et 311b38	39
Figure 7 -	Architecture des LPS d' <u>Enterobacteriaceae</u>	40
Figure 8 -	LPS de <i>E. coli</i> 0111B:4	40
Figure 9 -	Structure chimique du lipide A d' <i>E. coli</i>	41
Figure 10 -	"Core" du LPS de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> ANU843 .	44
Figure 11 -	Lipide A de <i>R. meliloti</i> 10406	45
Figure 12 -	Infection d'un poil racinaire par <i>Rhizobium</i>	48
Figure 13 -	Les 3 zones du cordon infectieux des nodules de Soja	49
Figure 14 -	Schéma représentant quelques cellules de la zone bactérienne du nodule (type Pois) avec, dans chacune d'elles, les quelques centaines de bactéroïdes entourant la vacuole centrale	51
Figure 15 -	Schéma d'une section longitudinale d'un nodule (type Pois)	52
Figure 16 -	Modèle de reconnaissance <i>Rhizobium</i> -Trèfle	58
Figure 17 -	Modèle pour l'attachement de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> aux poils racinaires de Pois	60
Figure 18 -	EPSb de <i>R. meliloti</i> SU47	65
Figure 19 -	EPSII de <i>R. meliloti</i> 1021	65
Figure 20 -	Bactériophage T2 à symétrie mixte	70

Figure 21 -	Types morphologiques des phages	70
Figure 22 -	Morphotypes phagiques	70
Figure 23 -	Schéma de la démonstration de la R.M. d'un phage	81
Figure 24 -	Lyses de cultures de R. meliloti en milieu RC fructosé, par les phages NM8, NM3, CM1, CM2, en fonction de la concentration en Ca^{2+} et Mg^{2+} , après 15 h d'incubation à 30°C	127
Figure 25 -	Lyses de cultures de R. meliloti en milieu RHBI par les phages CM3 et CM4, en fonction de la concentration en Ca^{2+} et Mg^{2+} , après 15 h d'incubation à 30°C	128
Figure 26 -	Lyses de cultures de R. meliloti , en milieu RHBI, par les phages CM1 et NM2, après 15 h d'incubation à 30°C, en présence de Ca^{2+} (0,4 mM) et Mg^{2+} (0,5 mM)	129
Figure 27 -	Cinétiques de lyse d'une culture de R. meliloti M11S par le phage NM8 en fonction de la multiplicité d'infection	131
Figure 28 -	Lyses de R. meliloti par les phages CM1 et NM8, en fonction de la présence des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} .	134
Figure 29 -	Variations, en fonction du temps, du pourcentage d'oxygène dissous et de la densité optique lors de la production du phage NM8.M11S, en fermenteur	137
Figure 30 -	Multiplication en une seule étape des phages NM8.M11S (A) et CM1.M12S (B)	139
Figure 31 -	Absorbance à 260 nm des fractions dialysables	153
Figure 32 -	Effet du milieu de culture et de la croissance de R. meliloti M5N1 sur la restriction	154
Figure 33 -	Cinétiques d'adsorption de Φ NM8.M11S sur R. meliloti M11S et M5N1	158
Figure 34 -	Cinétiques et pourcentages d'adsorption des phages NM7.M9S (A) et NM6.M9S (B)	158
Figure 35 -	Représentation schématique de l'adsorption des phages NM8 sur R. meliloti M11S	160
Figure 36 -	Estimation expérimentale du nombre de phages NM8 pouvant s'adsorber sur R. meliloti M11S	161
Figure 37 -	(1) Pourcentage d'adsorption du phage Φ NM8.M11S sur les cellules de R. meliloti M11S en fonction du temps	162
	(2) Synthèse d'exopolysaccharides par des bactéries de la souche M11S placées en condition de prolifération	162

	(3) Pourcentage d'adsorption du phage Φ NM8.M11S sur les cellules de <i>R. meliloti</i> M11S lavées après des temps de culture différents	162
Figure 38 -	Viscosité relative de l'exopolysaccharide de la souche M5N1 en présence de lysat du phage CM1.M5N1 en fonction du pH dans le tampon tris-maléate 0,2 M	166
Figure 39 -	Viscosité relative en fonction du temps, de l'exopolysaccharide de la souche M5N1 en présence de lysat du phage CM1.M5N1, dans le tampon tris-maléate, pH 6, à différentes molarités	167
Figure 40 -	Viscosité relative en fonction du temps, de l'exopolysaccharide de la souche M5N1 en présence de lysat du phage CM1.M5N1, dans le tampon tris-maléate 0,1 M, pH 6, additionné d'EDTA à différentes concentrations	167
Figure 41 -	Spectres de RMN ¹ H d'une solution d'EPS de <i>R. meliloti</i> M5N1	170
Figure 42 -	Pourcentages d'adsorption du phage NM8.M11S en fonction de la concentration en LPS	174
Figure 43 -	LPS de <i>R. meliloti</i> M11S observés en microscopie électronique	176
Figure 44 -	Electrophorégrammes des LPS de <i>R. meliloti</i> M11S extraits à différents temps de croissance	177
Figure 45 -	Profil d'élution du LPS de <i>R. meliloti</i> M11S sur Séphadex G50	178
Figure 46 -	Chromatographie liquide haute performance du LPS de <i>R. meliloti</i> M11S sur une colonne d'échange d'ions	181
Figure 47 -	Analyse par CPG-SM des acides sialiques des LPS de <i>R. meliloti</i> M11S	183
Figure 48 -	Profil d'élution des LPS de M11S digérés par la neuraminidase	185
Figure 49 -	Chromatographie en phase gazeuse des LPS de <i>R. meliloti</i> M11S avant (A) et après (B) action de la neuraminidase	186
Figure 50 -	Effet des lectines sur l'adsorption du phage NM8.M11S sur <i>R. meliloti</i> M11S	190

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Exemples d'associations <i>Rhizobium</i> -plante	25
Tableau 2 - Exemples d'oses rares rencontrés dans les LPS	42
Tableau 3 - Classification ICTV	70
Tableau 4 - Souches bactériennes utilisées et leur origine	96
Tableau 5 - Milieux liquides et températures d'incubation usuels	97
Tableau 6 - Les bactériophages et leurs souches propagatrices	98
Tableau 7 - Protocole de la multiplication en une seule étape	104
Tableau 8 - Les lectines utilisées	106
Tableau 9 - Concentrations phagiques obtenues après 15 h de lyse, en fonction de la multiplicité d'infection (<i>R. meliloti</i> M11S, Φ NM8)	132
Tableau 10 - Durée de la phase de lyse (en heures) en fonction des ions Ca^{2+} et Mg^{2+}	135
Tableau 11 - Temps de latence et rendement individuel moyen de quelques phages de <i>R. meliloti</i>	140
Tableau 12 - Efficacité d'étalement (E) du phage NM8 sur diverses souches de <i>R. meliloti</i> et en fonction de son dernier hôte	142
Tableau 13 - Coefficient d'efficacité d'étalement (E) des phages NM8, NM4 et CM8 sur <i>R. meliloti</i> M11S, M5N1 et M14S	144
Tableau 14 - Schéma de répartition des deux systèmes R/M dans les 3 souches de <i>R. meliloti</i> M11S, M5N1 et M14S ...	144
Tableau 15 - $d_{ij} = \log_{10} \frac{1}{E}$	146
Tableau 16 - $k_{ij} = d_{ij}/C_p$	147
Tableau 17 - Ensemble des coordonnées x_{ip} des souches M11S, M5N1, M14S de <i>R. meliloti</i>	148
Tableau 18 - Valeurs des coefficients d'efficacité d'étalement E, d_{ij} et k_{ij} pour les phages NM8, NM4, CM8 et CM20 et les souches M11S, M5N1, M14S et M12S de <i>R. meliloti</i>	150

Tableau 19 - Ensemble des coordonnées x _i des souches de R. meliloti M11S, M5N1, M1 ¹ PS, M12S	151
Tableau 20 - Efficacité d'étalement de ϕ NM8.M11S sur les cellules chauffées de R. meliloti M5N1	155
Tableau 21 - Restauration de la restriction chez des cellules de R. meliloti M5N1 après traitement au chloramphénicol ou chauffage	156
Tableau 22 - Constantes d'adsorption de phages de R. meliloti à t = 1 min	159
Tableau 23 - Variations de la viscosité relative (V_R) de solutions d'EPS de B. japonicum J5 et R. meliloti M11S sous l'influence de lysats phagiques	164
Tableau 24 - Activité dépolymérasique liée au phage	165
Tableau 25 - Viscosité relative, après 48 h, de la solution d'EPS de R. meliloti M5N1 soumis au culot et au surnageant d'ultracentrifugation et au lysat brut	168
Tableau 26 - Composition en glucose et galactose des EPS de R. meliloti M5N1, natifs et dépolymérisés par le lysat de ϕ NM8.M12S	169
Tableau 27 - Variations de la composition centésimale des substituants de l'EPS de R. meliloti M5N1 natif et hydrolysé par le phage ϕ NM8.M12S	171
Tableau 28 - Teneur en protéines et acides nucléiques des LPS avant et après action d'enzymes protéolytiques et nucléasiques	173
Tableau 29 - Pourcentages d'adsorption phagique sur les trois fractions issues de la souche M11S de R. meliloti	173
Tableau 30 - Pourcentages d'adsorption du phage NM8 sur les LPS de R. meliloti M11S (5 mg/ml) après action du DOC (10 mM), EDTA (10 mM), Ca ²⁺ (2 mM) et Mg ²⁺ (2 mM)	175
Tableau 31 - Rapports molaires des monosaccharides et des acides gras du LPS de R. meliloti M11S après purification par gel filtration	179
Tableau 32 - Rapports molaires des monosaccharides et des acides gras contenus dans les pics obtenus par CLHP sur colonne anionique	181
Tableau 33 - Libération d'acides sialiques par action de la neuraminidase sur les LPS de R. meliloti M11S	184

Tableau 34 - Pourcentages d'adsorption de ϕ NM8 sur les LPS et sur les fractions de l'hydrolysate partiel du LPS de R. meliloti M11S	187
Tableau 35 - Adsorption du phage NM8.M11S en relation avec les rapports molaires des monosaccharides de divers LPS de Rhizobium	188
Tableau 36 - Inhibition de l'adsorption du phage ϕ NM8 sur R. meliloti M11S par les sucres constitutifs du LPS	190

AVANT - PROPOS

L'assimilation, ou la production métabolique, d'un gaz par des microorganismes est un phénomène naturel fréquent que l'Homme essaye d'utiliser au maximum et, à cet égard, la fixation biologique de l'azote atmosphérique figure parmi les domaines les plus intéressants.

Des bactéries fixatrices d'azote sont présentes dans le tractus intestinal de différents Mammifères mais les quantités métabolisées sont faibles. Par contre, dans les écosystèmes terrestres, de nombreux organismes, libres, en associations ou en symbioses, réalisent une fixation biologique de l'azote atmosphérique estimée à 175 millions de tonnes par an.

A cet égard, les symbioses bactéries-plantes sont les systèmes les plus efficaces et l'exploitation de cette propriété, dans le domaine agronomique, bien qu'ancienne, reste l'objet d'enjeux économiques et humains considérables.

En effet, certaines plantes fixatrices d'azote (**Sesbania**, Mélilot, ...) peuvent pratiquement remplacer les engrais chimiques, dispendieux et polluants, si elles sont utilisées comme "engrais vert", enfouies dans le sol. D'autres Végétaux pionniers possédant un système racinaire puissant servent à stabiliser les dunes et à régénérer les sols érodés et dégradés (**Acacia**, **Casuarina**, ...). Par ailleurs, des plantes vivrières ou fourragères (Fève, Pois, Haricot, Soja, Trèfle, Luzerne, ...) acquièrent une autonomie qui leur permet de croître dans des sols déficients en azote. On imagine l'impact de ces cultures, en particulier dans les pays tropicaux en voie de développement confrontés à la pauvreté des sols en éléments minéraux indispensables, aux déficits alimentaires et financiers.

On comprend ainsi l'importance des recherches entreprises dans ce domaine où la symbiose la plus étudiée concerne les bactéries du genre **Rhizobium** et les plantes de la famille des Légumineuses.

Il s'agit, en effet, d'une association très particulière où deux symbiotes, capables de vivre séparément, s'unissent pour former une structure tout à fait différente, ni Légumineuse, ni bactérie. Morphologiquement banal (une gale) mais physiologiquement très spécialisé, cet organe, nommé nodosité ou nodule, effectue des opérations biochimiques originales résultant en la bioconversion de l'azote moléculaire en azote protéique.

L'établissement de cette symbiose est le fruit d'un "dialogue" qui débute par des reconnaissances où sont impliquées, entre autres, les constituants externes des deux partenaires.

Mais la rhizosphère est un environnement complexe et de nombreux facteurs, physico-chimiques et biologiques, vont intervenir dans les processus symbiotiques. Ainsi, les bactériophages, ubiquitaires dans tout écosystème comportant des bactéries dont ils sont les virus-parasites, sont en principe capables d'agir sur la composante bactériologique. Par voie de conséquence, ils influencent la symbiose **Rhizobium**-Légumineuse.

Or, la relation entre le microsymbiote et son prédateur, le bactériophage, est un autre modèle de reconnaissance entre des structures cellulaires superficielles.

Elle fait l'objet de cette étude.

INTRODUCTION

CHAPITRE I

LES RHIZOBIACEAE

L'établissement des relations entre les partenaires impliqués dans un phénomène biologique débute généralement par des réactions mettant en oeuvre les surfaces des protagonistes.

Il en est ainsi dans la relation phage-bactérie comme dans l'instauration de la symbiose **Rhizobium**-Légumineuse.

Aussi, après avoir envisagé les Rhizobiaceae et leur écologie, nous exposerons les connaissances actuelles sur la composition et le rôle de leurs structures externes. Nous terminerons par les Rhizobiophages, largement utilisés dans ce travail, pour l'étude de leurs interactions avec les polysaccharides superficiels de **R. meliloti**.

I. - TAXONOMIE

La nature bactérienne des microorganismes présents dans les nodules de Légumineuses fut établie en 1888 par BEIJERINCK qui en réalisa les premières cultures pures et les dénomma **Bacillus radicola**. L'appellation **Bacillus** étant ensuite réservée aux bacilles sporulés, c'est le terme de **Rhizobium** (= qui vit dans la racine), proposé par FRANCK en 1889, qui prévalut. Le "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" de 1984 a retenu le genre **Rhizobium** (FRANCK, 1889) pour les bactéries à croissance rapide et celui de **Bradyrhizobium** (JORDAN, 1982) pour celles à croissance lente qui appartiennent à la famille des Rhizobiaceae (CONN, 1938).

Le genre **Rhizobium** est divisé en trois espèces : **R. meliloti** (DANGEARD, 1926), **R. loti** (JARVIS et al., 1982) et **R. leguminosarum** (FRANCK, 1889) qui comprend trois biovars : **trifolii**, **phaseoli** et **viceae**. Ils entrent en symbiose avec des Légumineuses cultivant essentiellement en zone climatique tempérée.

Parmi leurs caractères généraux, on retiendra qu'il s'agit de bacilles mobiles de 1,2-3 x 0,5-0,9 µm présentant les caractéristiques communes aux bactéries à Gram-négatif (FERNANDEZ-ARIAS et al., 1973). Ils contiennent fréquemment des granules denses aux électrons et des granules de poly-β-hydroxybutyrate surtout en cultures âgées (Annexe I, Planche I, Photo A).

Ils sont aérobies et produisent des colonies de 2 à 4 mm de diamètre en 3 à 5 jours, à 25-30°C, sur milieu de FRED *et al.* (1932). La croissance en présence d'oses s'accompagne souvent d'une acidification et d'une abondante sécrétion de polysaccharides. Les colonies de *R. meliloti*, d'aspect très muqueux, sont entourées d'un enchevêtrement dense de filaments polysaccharidiques (Annexe I, Planche I, Photo B).

Les *Rhizobium* sont phylogéniquement proches du genre *Agrobacterium* (CONN, 1942), parasite végétal appartenant aussi à la famille des Rhizobiaceae.

Le genre *Bradyrhizobium* ne possède qu'une seule espèce reconnue : *B. japonicum* (KIRCHNER, 1896 ; JORDAN, 1982) symbionte du Soja (*Glycine max*). Ses caractères morphologiques sont identiques aux précédents. La culture sur le milieu de FRED *et al.* (1932) fournit des colonies n'excédant pas 1 mm de diamètre, sans acidification du milieu, en 5 à 7 jours d'incubation.

L'écologie des *Bradyrhizobium* est à dominante tropicale. Par ailleurs, ce groupe est très hétérogène. JORDAN (1984) suggère que jusqu'à ce que d'autres espèces ou biovars soient créés, ces bactéries, autres que *B. japonicum*, soient désignées comme *Bradyrhizobium* sp. suivi du nom entre parenthèses de la plante-hôte appropriée : *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*), *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), etc... Mais AULING *et al.* (1988) utilisent l'appellation *B. lupinus*.

A chacun de ces genres sont rattachés de nombreuses espèces ou biovars en attente de classification. Ainsi, une souche isolée de nodules racinaires de Soja mais ayant une croissance rapide a été baptisée *R. fredii* (SCHOLLA *et* ELKAN, 1984) mais CHEN *et al.* (1988) proposent de l'assigner à *Sinorhizobium* *gen. nov.* LINDSTRÖM (1989) appelle *R. galegae* une bactérie provenant de *Galega orientalis*, une Légumineuse utilisable comme fourrage en région tempérée.

Signalons également *Azorhizobium caulinodans* *gen. nov., sp. nov.*, une bactérie fixatrice d'azote induisant des nodules sur les tiges de *Sesbania rostrata* (DREYFUS *et al.*, 1988).

En principe, une espèce de Rhizobiaceae initie la formation de nodules chez un groupe restreint de Légumineuses (tab. 1).

Rhizobium	Plantes
Rhizobium meliloti	Medicago (Luzernes), Melilotus (Mélilots), Trigonella (fenu-grec)
Rhizobium leguminosarum	
biovar viceae	Pisum (Pois), Lens (Lentilles)
biovar trifolii	Trifolium (Trèfles)
biovar phaseoli	Phaseolus (Haricots)
Rhizobium loti	Lotus (Lotier)
Rhizobium fredii	Glycine max (Soja)
Bradyrhizobium japonicum	Glycine soja
Azorhizobium caulinodans	Sesbania (nodules sur les tiges)
Rhizobium NGR234	Parasponia
Bradyrhizobium sp.	(non légumineuse)

Tableau 1 - Exemples d'associations Rhizobium-plante.

Toutefois les anomalies sont nombreuses. Ainsi, certaines plantes telles que Lotus, Vigna, Lupinus, Cicer, Leucaena, Mimosa, Acacia, peuvent être infectées aussi bien par *R. loti* que par des biovars de *Bradyrhizobium*.

La spécificité de ces derniers est beaucoup plus large et difficile à cerner que celle des *Rhizobium*.

Signalons enfin l'unique cas connu de symbiose entre les Rhizobiaceae et une plante n'appartenant pas aux Légumineuses : *Parasponia*.

II. - GENOME

Les espèces de **Rhizobium** à croissance rapide sont génétiquement caractérisées par la présence de grands plasmides, porteurs des gènes de la symbiose, désignés pSym.

L'ADN extrachromosomique, mis en évidence chez **R. meliloti** (BECHET et GUILLAUME, 1978), est essentiellement constitué de deux mégaplasmides (BANFALVI **et al.**, 1985), tous deux impliqués dans la nodulation et l'efficacité (HYNES **et al.**, 1986).

Les **Bradyrhizobium** à croissance lente ne semblent pas posséder un tel équipement plasmidique et les gènes symbiotiques sont localisés sur le chromosome (RUSSEL **et al.**, 1985). Plusieurs groupes de gènes : nod, exo, fix, nif concernent la symbiose.

Les opérons nodABCIIJ et nodD sont requis pour la nodulation. Ils sont présents et fonctionnellement interchangeables dans toutes les espèces (RODRIGUEZ-QUINONES **et al.**, 1987). Ils constituent les gènes "nod communs".

Un second groupe de gènes : nodFE, nodG, nodH, etc..., intéresse la spécificité d'hôte et l'importance de la nodulation. Ils ne sont pas nécessairement présents ou fonctionnels dans toutes les espèces.

Les gènes nod ne s'expriment pas dans les cellules en culture **in vitro** à l'exception de la famille des gènes régulateurs nodD constitutifs.

R. meliloti possède trois copies fonctionnelles de nodD (HONMA et AUSUBEL, 1987) dont deux au moins sont nécessaires pour une nodulation efficace de la Luzerne (**Medicago sativa**) (GÖTTFERT **et al.**, 1986). Ces trois gènes ne sont pas identiques et ont des propriétés distinctes (MULLIGAN et LONG, 1989).

L'expression des gènes "nod communs" exige le produit du gène nodD et des composés excrétés par la plante, identifiés comme des flavones (REDMOND **et al.**, 1986). La lutéoline, isolée des graines de Luzerne, est l'inducteur des gènes nod de **R. meliloti** (PETERS **et al.**, 1986).

Les gènes exo contrôlent la production d'exopolysaccharides. Chez **R. meliloti**, certains sont localisés sur le second plasmide symbiotique et d'autres sur le chromosome. Les mutants exo sont souvent connus pour former des nodules inefficients (GLAZEBROOK et al., 1990).

Les gènes pour la fixation de l'azote sont divisés en deux groupes (BERINGER et al., 1980) :

- les gènes fix, requis pour la fixation symbiotique, sont spécifiques des Rhizobiaceae ;
- les gènes nif sont homologues des systèmes fixateurs libres d'azote atmosphérique comme chez **Klebsiella pneumoniae** : nifKHD code pour le complexe nitrogénasique.

Les mutations sur ces gènes affectent la fixation de l'azote mais pas la nodulation.

Signalons enfin que des transferts génétiques entre les souches de **Rhizobium** se produisent spontanément dans la rhizosphère, permettant l'échange des informations (BROUGHTON et al., 1987 ; SCHOFIELD et al., 1987).

III. - ECOLOGIE

Grâce à sa compétence saprophytique, **Rhizobium** est capable de se maintenir longtemps dans un sol inculte (DOWLING et BROUGHTON, 1986) où les nombreux constituants de la microflore entrent en compétition pour l'utilisation de ressources limitées. Il peut ainsi se multiplier lentement, avec un temps de génération estimé à 200 heures (BOWEN et ROVIRA, 1976). Par contre, dans la rhizosphère d'une plante, c'est-à-dire la portion du sol sous l'influence directe du système racinaire, les nutriments excrétés par le végétal stimulent la croissance des microorganismes. S'il s'agit d'une Légumineuse, **Rhizobium** sera d'autant plus stimulé, avec un temps de génération d'environ 12 heures (BOWEN et ROVIRA, 1976) et les bactéries homologues de la plante vont rivaliser pour coloniser le système racinaire et

établir la symbiose. Les microorganismes qui remporteront cette compétition et engendreront les clones infectant les nodules sont ceux qui auront fait preuve de la meilleure compétitivité.

La distribution des souches et leur pouvoir symbiotique sont très variables. Les évaluations de populations de **R. meliloti** (LOWTHER et al., 1987 a, b) dans différentes régions ont mis en évidence la faible efficacité d'un grand nombre de **Rhizobium** indigènes et la dominance d'un groupe de souches dans la formation des nodules. L'implantation d'une culture de Légumineuses et son rendement peuvent alors s'avérer aléatoires et il sera envisagé d'introduire dans le sol des bactéries sélectionnées pour leur compétitivité et leur efficacité supérieures. Cette inoculation est obligatoire lorsque les **Rhizobium** appropriés à la plante ne sont pas présents.

La sélection des bactéries, les supports et les méthodes d'inoculation peuvent varier mais la tolérance à la dessiccation est souvent un facteur décisif. MARY et al. (1985) ont montré qu'un séchage rapide diminue beaucoup le nombre de **R. meliloti** vivants. Un séchage lent suivi d'une conservation dans une humidité relative moyenne, en présence d'air, améliore la viabilité des cellules mais les résultats sont très variables d'une souche à l'autre.

En fait, quelle que soit la technique employée, les plantes sont souvent nodulées par des **Rhizobium** indigènes moins efficaces que l'inoculum, voire même totalement inefficaces, mais ayant une compétitivité supérieure.

Même si le **Rhizobium** inoculé produit effectivement des nodules sur la plante hôte, la première saison, il peut ne pas persister les saisons suivantes et être remplacé par une population indigène (DOWLING et BROUGHTON, 1986). Dans d'autres cas, la compétition entre les souches n'apporte pas d'amélioration sensible à la croissance végétale (MARTENSSON et al., 1987). DOWDLE et BOHLOOL (1987) ont aussi mis en évidence l'importance du caractère indigène de **B. japonicum** et **R. fredii** dans la nodulation du Soja.

Toutefois, DUNIGAN et al. (1984) ont rapporté que le pourcentage de nodules formés par la souche de **B. japonicum**, introduite dans une culture de Soja, augmentait avec le temps, indiquant une installation permanente et une haute

compétitivité. JENSEN et SØRENSEN (1987) ont constaté la survie de *R. leguminosarum* dans le sol, après son inoculation, même si le nombre de nodules formés diminue pendant 3-4 ans.

Le devenir d'une inoculation au champ dépend donc non seulement de la taille mais aussi de la nature de la population indigène de *Rhizobium*. Aussi, le facteur de succès le plus important est peut être le taux d'inoculation, c'est-à-dire le nombre des bactéries ajoutées à la graine de Légumineuse. WEAVER et FREDERICK (1974) suggèrent que pour obtenir 50 % des nodules du Soja colonisés par les *B. japonicum* inoculés, ceux-ci doivent être 1 000 fois plus nombreux que la population naturelle.

Que la flore de *Rhizobium* soit purement indigène ou modifiée par l'inoculation de souches sélectionnées, d'autres facteurs interviendront encore dans la compétition. La figure 1 résume ces interactions dont nous ne détaillerons que celles qui concernent *Rhizobium*.

A. - Facteurs écologiques affectant la compétition

La nature du sol, le pH, la salinité, le climat, la végétation, les pratiques culturales sont autant de paramètres qui peuvent influencer la compétition entre les souches de *Rhizobium*. Une abondante littérature leur a été consacrée et elle a été récemment résumée par DOWLING et BROUGHTON (1986). Il est difficile d'en obtenir des conclusions générales, chaque situation semblant particulière. Nous nous bornerons à quelques exemples.

En 1987, RUPELA *et al.* ont montré que les populations de *Rhizobium* associées au Pois chiche (*Cicer arietinum* L.) diminuent avec la profondeur du sol et les températures estivales élevées en Inde. Par contre, elles augmentent avec la saison des pluies. Le potentiel aqueux et la texture du sol influencent également la survie des bactéries. La sécheresse, le plus souvent combinée à des températures tropicales, altère la survie et la compétitivité bien que des souches de *Bradyrhizobium*, isolées dans des zones arides, se montrent plus résistantes à la dessiccation que celles provenant de régions plus froides et humides.

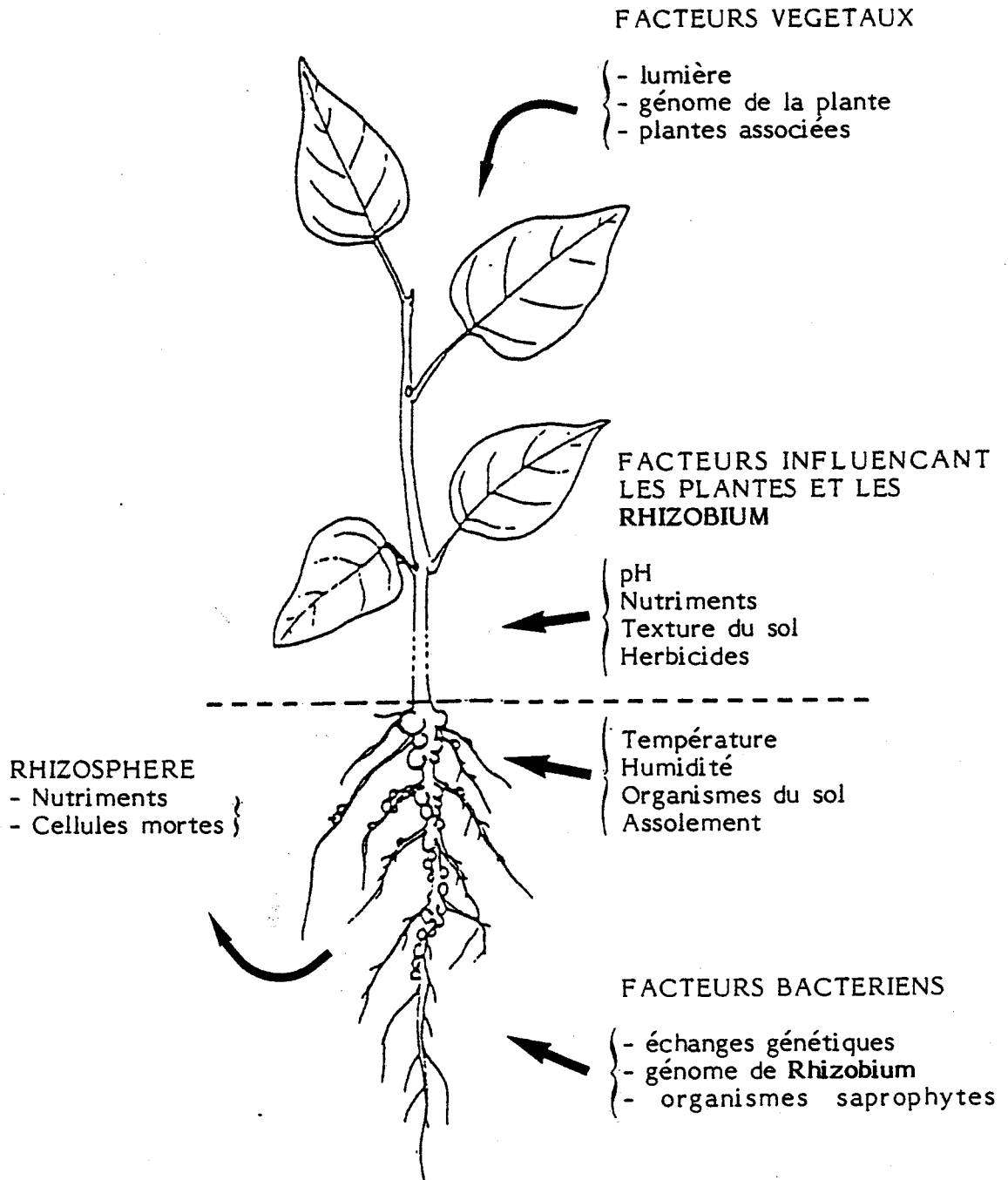


Figure 1 - Facteurs pouvant influencer la compétition pour la nodulation, d'après DOWLING et BROUGHTON (1986).

LAWSON **et al.** (1987), en Australie, sur une période de 17 mois, ne trouvent pas de corrélation entre les variations de population de **R. leguminosarum** bv. **trifolii**, de l'ordre de $1,6 \times 10^2$ à 2×10^4 bactéries par g de terre, et le type de sol, la moyenne des températures et l'humidité. Mais il y a une relation avec l'ensoleillement et l'importance de la végétation.

Par ailleurs, on constate fréquemment qu'une partie des **Rhizobium** dans le sol est de petite taille ($< 0,3 \mu\text{m}$) (CROZAT **et al.**, 1982 ; POSTMA **et al.**, 1988). Ce phénomène est sans doute relié à des carences nutritionnelles mais on ne connaît pas son impact sur la compétitivité.

La tolérance à l'acidité est une des propriétés recherchées pour les souches inoculées dans les sols acides, nombreux en zone tropicale. Un pH bas s'accompagne généralement de taux élevés en aluminium et faibles en calcium et phosphore. Ces conditions sont d'ailleurs plus dommageables pour la plante que pour les bactéries. Ainsi, **R. leguminosarum** TAL271 tolère une large gamme de pH (HELEMISH et ELGAMMAL, 1987), mais il y a souvent peu de corrélation entre les résultats au laboratoire et l'acido-tolérance exprimée dans les champs (HOWIESON **et al.**, 1988). Toutefois, des variations telluriques de pH peuvent modifier la compétition et la formation des nodules.

Enfin, l'étude de l'effet de la salinité sur la croissance a montré que **R. leguminosarum** TAL271 (HELEMISH et ELGAMMAL, 1987) acceptait jusqu'à 2 % de NaCl mais supportait moins bien les carbonates.

Les pratiques culturales peuvent également affecter l'aptitude des bactéries à la nodulation. LA FAVRE et EAGLESHAM (1987) montrent que l'application de nitrate de potassium, au moment de la plantation du Soja, stimule la nodulation par des souches de **Bradyrhizobium** peu efficaces. En règle générale, des populations de **Rhizobium** survivent mieux si la Légumineuse homologue est persistante ou renouvelée. En revanche, certaines rotations de culture peuvent entraîner une phytotoxicité. Ainsi, les acides coumariques et ferruliques, provenant des résidus de récolte du Blé, Maïs ou Sorgho, réduisent ensuite la croissance de la Luzerne, la nodulation et la fixation d'azote par **R. meliloti** (ALSAADAWI, 1987).

Enfin, si des herbicides utilisés aux doses recommandées en agriculture n'influent pratiquement pas sur les populations de *Rhizobium* (ROSLYCKY, 1981, 1982), un fongicide tel que le parathion affecte la croissance et le métabolisme de *R. meliloti* (DESTORANI et al., 1986).

B. - Facteurs biologiques affectant la compétition

Comme toutes les bactéries, *Rhizobium* est susceptible d'être infecté par des virus. Ces phages sont également présents dans les sols et il s'établit une relation phage-bactérie qui n'est pas sans incidence sur la symbiose. Nous détaillerons ce phénomène ultérieurement. Mais d'autres prédateurs peuvent intervenir. Si *Bdellovibrio* ne semble pas avoir une grande influence, les protozoaires se nourrissent de bactéries et réduisent le nombre de *Rhizobium* (DANSO et al., 1975).

Enfin, le chimiotactisme et la mobilité sont des facteurs importants dans la compétition. Les exsudats racinaires contiennent des sucres et des acides aminés qui attirent *R. meliloti* (BURG et al., 1982) et les mutants hypermobiles se montrent nettement plus compétitifs (EL-HALOUÏ et al., 1986). En général, les mutants de *R. meliloti* (CAETANO-ANOLLES et al., 1988) et de *R. trifolii* (MELLOR et al., 1987), déficients en mobilité ou chimiotactisme, sont de moins bons compétiteurs que leurs parents.

IV. - STRUCTURES EXTERNES DES RHIZOBIACEAE

Il est admis que les Rhizobiaceae possèdent une organisation des enveloppes identique à celle des autres bactéries à Gram-négatif (fig. 2).

Particulièrement concernée par des interactions cellulaires, la membrane externe est constituée de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides (LPS). Ces derniers sont spécifiques et présents chez toutes ces bactéries.

Souvent, existent également des polysaccharides extracellulaires ou exopolysaccharides (EPS) entourant la cellule.

Enfin, les Rhizobiaceae peuvent posséder des flagelles et pili qui sortent de la surface.

Après quelques généralités, nous envisagerons plus précisément les EPS et LPS de Rhizobiaceae.

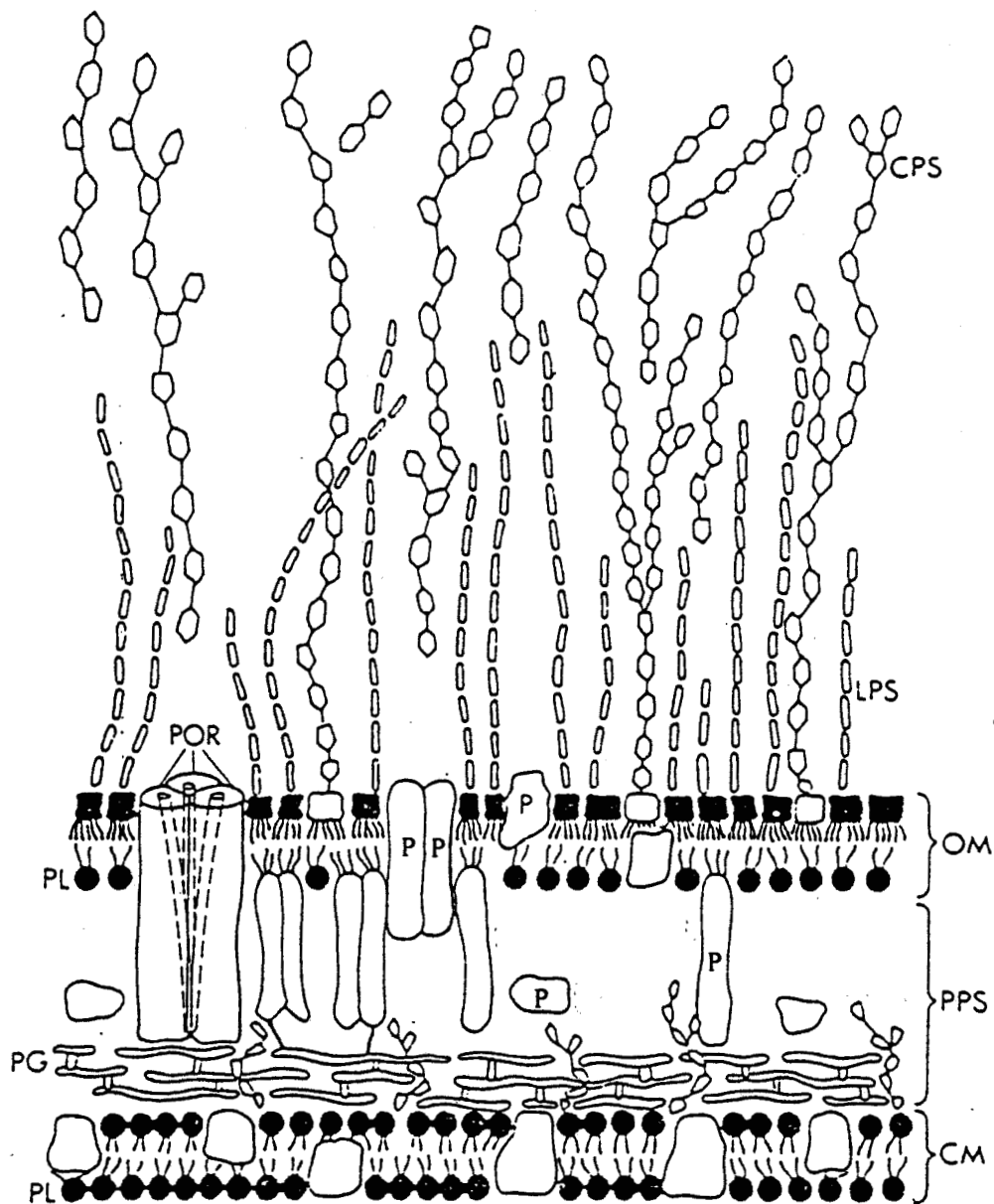


Figure 2 - Organisation des enveloppes des bactéries à Gram-négatif, selon LAMBERT (1988).

CPS : polysaccharides capsulaires ; LPS : lipopolysaccharides ;
 OM : membrane externe ; PPS : espace périplasmique ; POR :
 porines ; PL : phospholipides ; PG : peptidoglycane ; CM :
 membrane cytoplasmique ; P : protéines.

A. - Les exopolysaccharides

1 - Généralités

Synthétisés par de nombreuses bactéries, les exopolysaccharides peuvent être à l'origine soit d'une capsule qui reste fixée à la bactérie, soit d'une substance muqueuse (slime) mal délimitée, pratiquement libre et pouvant être éliminée par centrifugation (fig. 3).

La différenciation est parfois difficile lorsque des bactéries surproduisent des EPS capsulaires dont l'excès donne l'apparence d'un mucus périphérique. De plus, certaines bactéries produisent simultanément les deux formes (WHITFIELD, 1988).

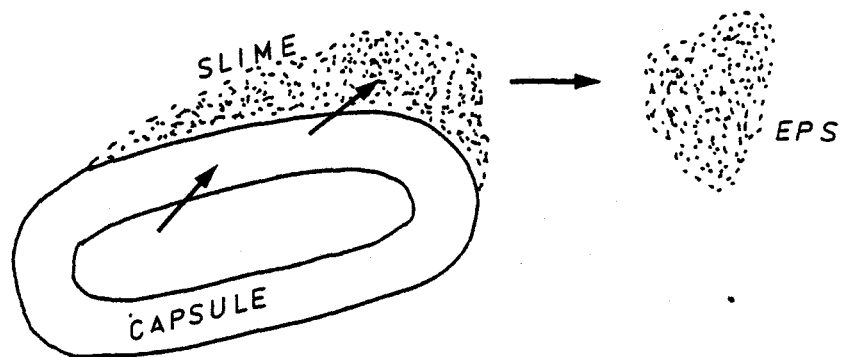
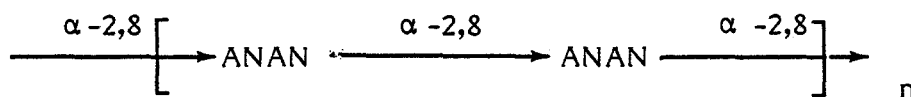
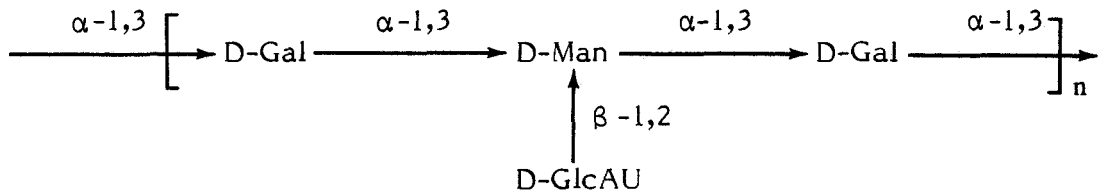


Figure 3 - Différentes formes d'exopolysaccharides bactériens.

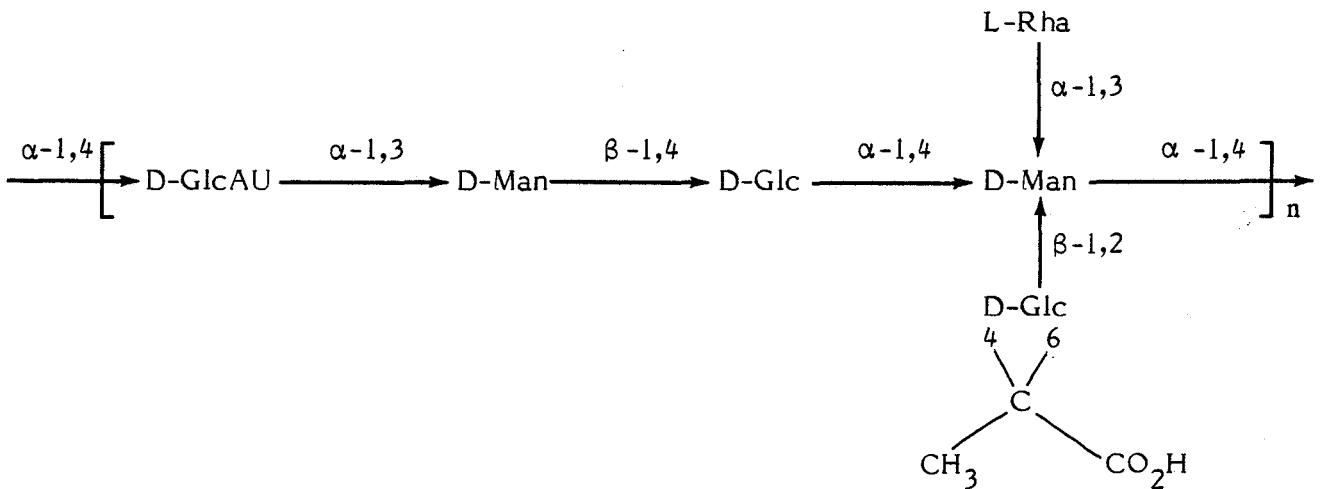
Les EPS peuvent être homopolysaccharidiques comme l'acide colominique d'*Escherichia coli* K1 (McGUIRE et BINKLEY, 1964) :



mais le plus souvent ils sont composés d'unités de répétition invariables plus ou moins complexes comme les polysaccharides capsulaires d'*Aerobacter aerogenes* (YUREWICZ et al., 1971) :



ou de *Klebsiella* K64 (KENNE et LINDBERG, 1983) :



Ils sont souvent substitués par des composants non glucidiques dont les taux dépendent beaucoup des conditions de culture et de la phase de croissance.

La plupart des fonctions attribuées aux EPS concernent la protection de la bactérie en réponse à la pression de l'environnement.

La présence d'une couche hydratée peut la prémunir contre la dessiccation et la prédation par les protozoaires. Le gel polysaccharidique a aussi des effets significatifs sur la diffusion de substances comme les antibiotiques et les ions métalliques toxiques ou non. La production d'EPS capsulaires est particulièrement répandue chez les bactéries pathogènes et leur permet d'échapper à la phagocytose.

Enfin, les EPS sont souvent présents dans les biofilms adhésifs lorsque la survie de la bactérie dépend de son aptitude à adhérer sur les surfaces, d'où le rôle important qu'on leur attribue dans la sélection naturelle.

Dans la majorité des bactéries à Gram-négatif, les précurseurs de la synthèse d'EPS seraient localisés dans le cytoplasme. Les intermédiaires sont transportés par un lipide en C_{55} , l'undecaprenol phosphate, et assemblés au

niveau de la membrane cytoplasmique. L'élongation de l'EPS se poursuivrait dans le périplasme. Le passage du polymère à travers la membrane externe semble s'effectuer en certains sites où les membranes cytoplasmiques et externes sont accolées.

2 - Les exopolysaccharides de Rhizobiaceae

Les Rhizobiaceae sont connues pour sécréter d'importantes quantités d'exopolysaccharides dont la localisation réelle a souvent été négligée par les auteurs. La capsule est variable selon les espèces et même les souches, **R. meliloti** étant l'espèce la moins capsulée (DUDMAN et al., 1968). Mais tous les **Rhizobium** produisent un hétéropolyoside acide, soluble dans l'eau, commun au sein d'une espèce sauf chez **R. leguminosarum**.

De nombreux **Rhizobium** sont également capables de synthétiser des β -2-glycannes cycliques (YORK et al., 1980) tandis que des espèces de **Bradyrhizobium** synthétisent des glycannes cycliques branchés composés de 10 à 13 résidus de glucose liés en β -1,6 et β -1,3 (MILLER et al., 1990).

Les polysaccharides de surface de Rhizobiaceae ont fait l'objet de nombreux travaux. Une synthèse de CARLSON (1982) fait apparaître que **Rhizobium** produit trois types d'EPS qui sont d'ailleurs repris par JORDAN (1984) comme éléments comparatifs entre **R. leguminosarum** et **R. meliloti** (fig. 4).

Les EPS de **R. meliloti** (type I) diffèrent de ceux des autres **Rhizobium** à croissance rapide par l'absence ou la très faible proportion d'acides uroniques (COURTOIS et al., 1975, 1986). De plus, ils sont substitués par des radicaux pyruvyle, acétyle et succinyle. Il s'agit de succinoglycannes, à la différence des EPS de type II qui ne contiennent pas de succinate.

COURTOIS (1984) et HEYRAUD et al. (1986) ont proposé une unité de répétition pour le succinoglycanne de **R. meliloti** M5N1 (fig. 5), un peu différente par l'emplacement du galactose mais conforme à celle décrite précédemment par JANSSON et al. (1977).

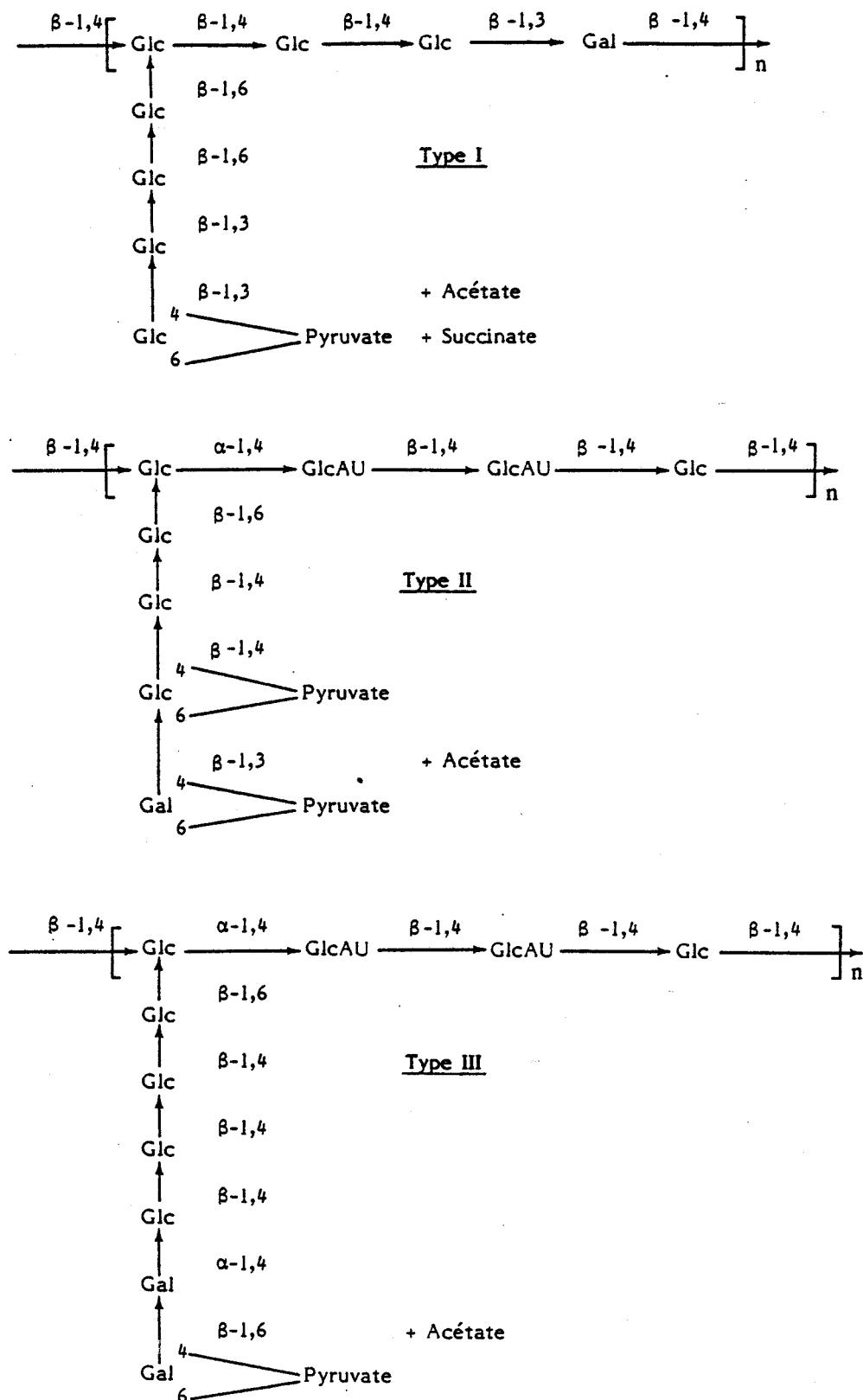


Figure 4 - Unités de répétition des EPS synthésés par *R. meliloti* (type I) et *R. leguminosarum* (types II et III).

Les EPS de *B. japonicum* semblent plus variés et plus complexes comme le montrent les deux exemples de la figure 6. On remarque une plus grande hétérogénéité dans la composition, la structure et la présence d'oses méthylés.

Les conditions de biosynthèse du polysaccharide n'influencent pas la composition osidique mais peuvent faire varier les taux de substitution par les acides organiques (COURTOIS *et al.*, 1986). L'âge de la culture agit de même. Cependant des EPS de *R. meliloti*, élaborés par des cellules en croissance ou en non-prolifération, n'ont pas les mêmes propriétés viscosimétriques. Les seconds ont une viscosité plus élevée mais beaucoup plus sensible à l'élévation de température (HEYRAUD, 1986).

Quant à l'étude ultrastructurale des exostructures de *R. meliloti*, réalisée par MUTAFTSCHIEV *et al.* (1982) ou dans notre laboratoire, elle a fourni les mêmes résultats (Annexe I, Planche II). Après 20 h de culture en milieu liquide sucré (FRED *et al.*, 1932), les cellules excrètent des EPS qui se présentent sous l'aspect de longs filaments formant de nombreuses boucles (Photo A).

Lorsque l'on observe un grand nombre de bactéries, on remarque que beaucoup d'entre elles émettent préférentiellement leurs EPS en un site proche d'un des pôles cellulaires (Photo B). Le réseau de fibres de polysaccharides s'épaissit avec l'âge de la culture et emprisonne les bactéries (Photos C à E).

Des centrifugations successives éliminent complètement les EPS, restaurant des cellules nues, identiques, en microscopie, à celles prélevées après seulement quelques heures de culture (Photo F).

B. - Les lipopolysaccharides

1 - Généralités

On sait depuis plus d'un siècle que certains symptômes, tel que la fièvre, rencontrés lors d'infections par des bactéries à Gram-négatif, sont causés par une endotoxine solidement attachée à la paroi bactérienne. BOIVIN *et* MESSROBEANU (1935) puis WESTPHAL *et al.* (1952) ont précisé la nature lipopolysaccharidique de la molécule.

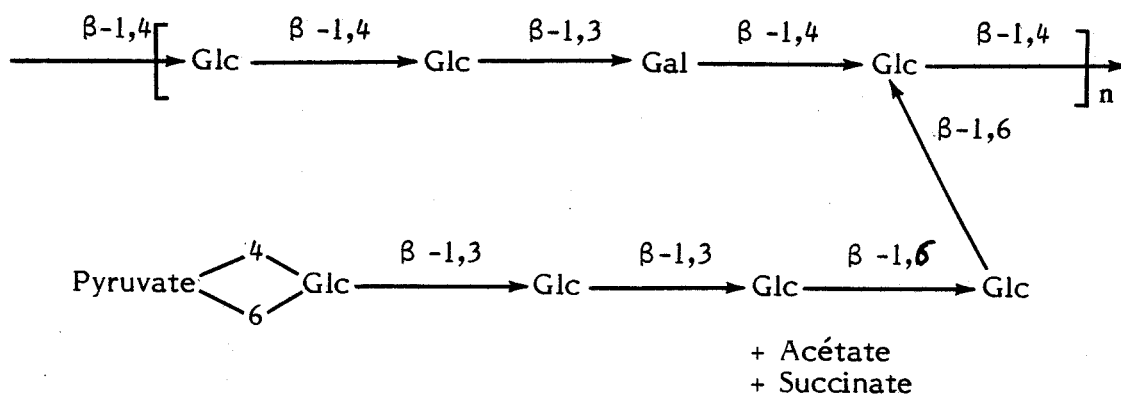


Figure 5 - Structure du succinoglycane de *R. meliloti* M5N1.

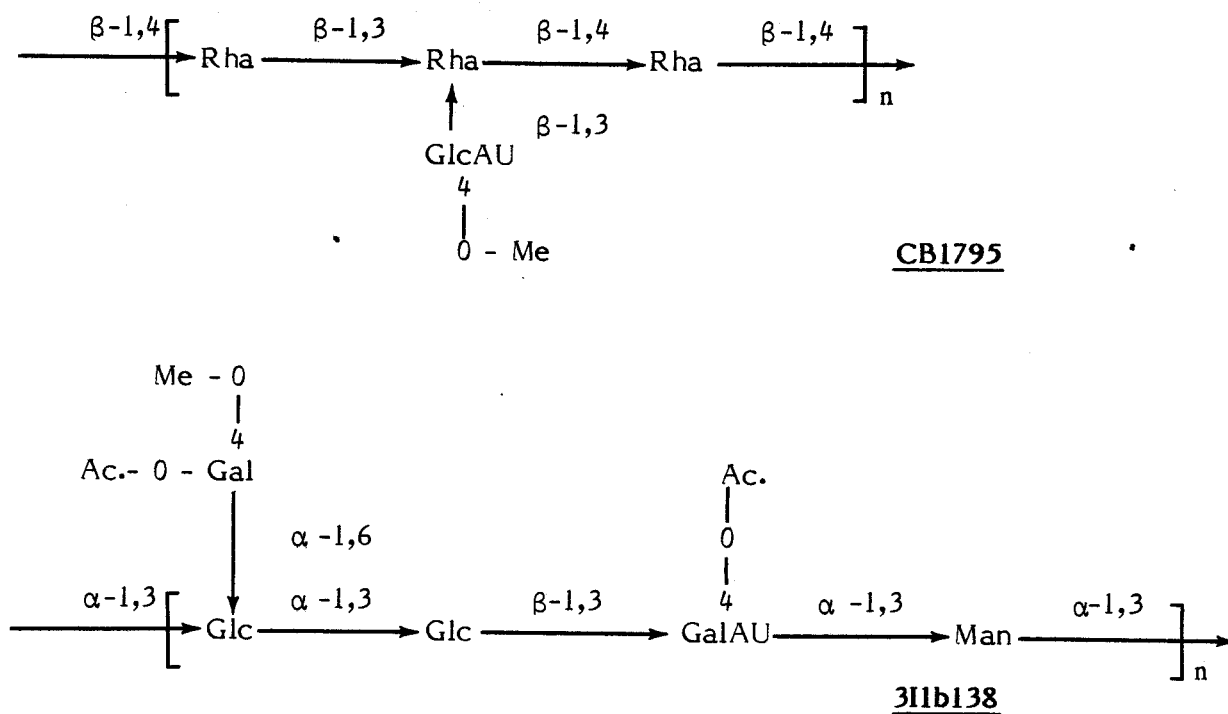


Figure 6 - Structure des unités de répétition de *B. japonicum* CB1795 (DUDMAN, 1978) et 311b138 (MORT et BAUER, 1982).

En fait, seule la structure des LPS de quelques Enterobacteriaceae est bien connue et sert de modèle de référence.

Trois régions peuvent être chimiquement, biologiquement et génétiquement distinguées (fig. 7 et 8).

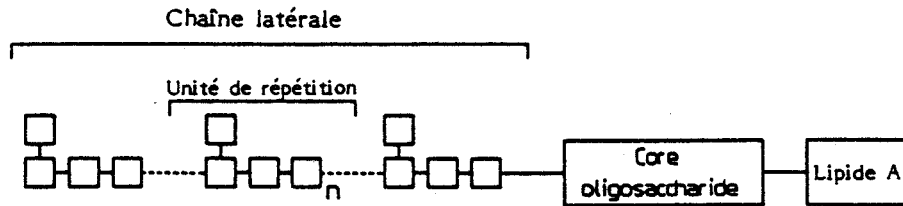


Figure 7 - Architecture des LPS d'Enterobacteriaceae.

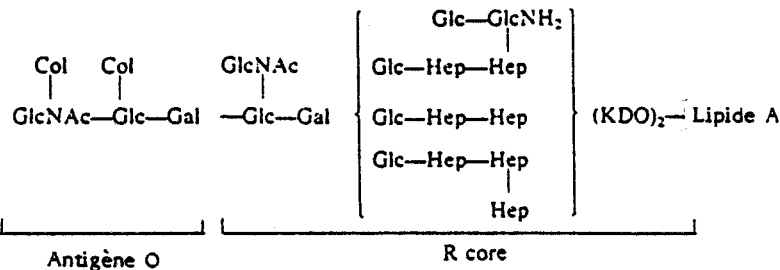


Figure 8 - LPS de *E. coli* O111B:4 (EDSTROM et HEATH, 1965).

La chaîne latérale ("side-chain") est un hétéropolysaccharide composé d'unités répétitives de plusieurs résidus monosaccharidiques parmi lesquels les formes pyrananes et furannes des oses neutres, des osamines et des acides uroniques pouvant se trouver en configuration α ou β . Par conséquent, les possibilités de combinaison sont énormes. Cette fraction du LPS est responsable de l'antigénicité, car elle porte les déterminants antigéniques O. La variation d'un seul ose suffit à modifier la spécificité de l'antigène. De nombreux systèmes de sérotypage bactériens, dont le schéma de KAUFFMAN-WHITE pour les *Salmonella*, reposent sur ce principe.

Le "core" est aussi un hétérooligosaccharide dont la région proximale du lipide A contient souvent deux oses particuliers : le L-glycero-D-mannoheptose et l'acide 3-deoxy-D-mannoctulosonique (KDO). L'éthanolamine et les

groupements phosphate sont des substituants communs. Les variations interspécifiques du "core" sont faibles, comparées à celles de l'antigène O. Chez *Salmonella*, un seul type de "core" existe pour tous les sérotypes et chez *E. coli*, six "cores" ont été décrits pour plus d'une centaine de sérotypes (BRADE et al., 1988).

Le lipide A est un glycophospholipide. Des unités disaccharidiques de glucosamine-phosphate liées en β -1,6 constituent un squelette hydrophile auquel se rattachent des acides gras souvent hydroxylés (fig. 9).

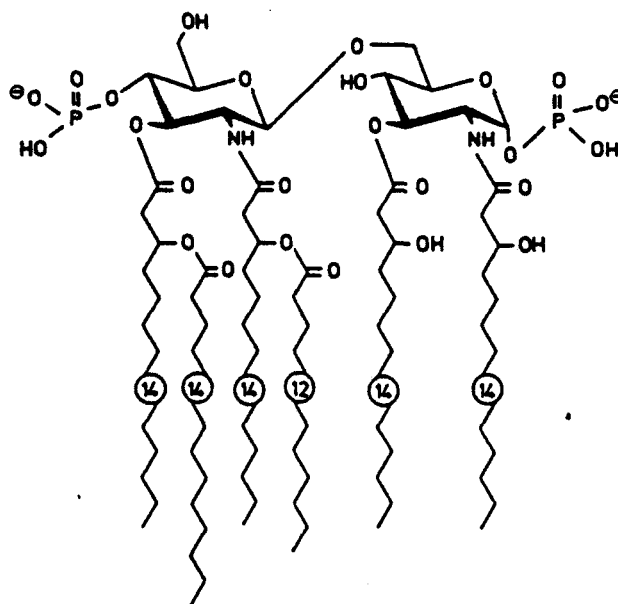


Figure 9 - Structure chimique du lipide A d'*E. coli*.

Les nombres dans les cercles indiquent le nombre d'atomes de carbone de la chaîne.

La présence constante de l'acide β -hydroxymyristique ($3\text{-OH-C}_{14}\text{:O}$) semble spécifique et caractéristique du lipide A.

Les groupes hydroxyles libres en C_4 et C_6 servent à la liaison du lipide A avec la chaîne polysaccharidique via le KDO.

Le lipide A est le support de la toxicité de la molécule entière de LPS.

L'intégrité de la structure du LPS, telle que nous l'avons décrite, confère le type S (Smooth) aux bactéries. L'absence totale ou partielle de la chaîne latérale polysaccharidique donne le caractère R (Rough).

L'hétérogénéité des LPS est une autre caractéristique importante. Elle suppose que la structure des LPS n'est pas uniforme dans une souche donnée et que des longueurs de chaînes latérales variables, des structures du "core" ou du lipide A modifiées, peuvent exister. Ces variations sont incontestablement démontrées dans des groupes bactériens très divers. Elles sont souvent aussi reliées aux conditions et au stade de développement de la bactérie (TORTORELLO et DELWICHE, 1984 ; PANASENKO et al., 1989).

D'abondantes études ont aussi montré les grandes diversités de composition moléculaire. Ainsi, l'heptose est fréquemment absent chez les bactéries autres que les Enterobacteriaceae. Par ailleurs, les LPS recèlent des oses rares dont le tableau 2 donne quelques exemples.

Oses	Bactéries	Références
Ac. 2-ceto-3-deoxy-1,7-dicarboxyheptonique	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Brade et Rietschel (1985)
2-amino-2,6-dideoxy-D-glucose (D-quinovosamine) 4-acetamido-4,6-dideoxy-D-mannose (D-perosamine)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Alteromonas putrefaciens</i> <i>E. coli</i> 0157:47	Wilkinson et Galbraith (1975) Moule et Wilkinson (1989) Perry et al. (1986)
6-0-methylgalactosamine	<i>Myxococcus xanthus</i>	Panasenko et al. (1989)
Ac. 5,7-diamino-3,5,7,9-tetraoxynonulosonique (ac. pseudaminique)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Shigella boydii</i>	Knirel et al. (1984)
Ac. 2,3-diamino-2,3-dideoxyuronique	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Knirel et Kochetkov (1987)

Tableau 2 - Exemples d'oses rares rencontrés dans les LPS

2 - Les lipopolysaccharides de Rhizobiaceae

Il faut constater que les lipopolysaccharides des Rhizobiaceae ont été moins étudiés que les autres polysaccharides. En 1968, GRAHAM et O'BRIEN préparent et analysent les LPS de 16 souches de **Rhizobium**. Le glucose et le rhamnose sont les seuls monosaccharides présents dans toutes les préparations mais le mannose, la glucosamine et l'acide 4-0-méthylglucuronique sont fréquents. Ils détectent également le fucose, le galactose, le xylose et l'arabinose mais pas de desoses, d'heptose et d'autres hexosamines.

La caractérisation d'autres LPS de **Rhizobium** à croissance rapide a mis en évidence une importante diversité (CARLSON et al., 1978 ; PLANQUE et al., 1979 ; ZEVENHUIZEN et al., 1980). Ces préparations peuvent contenir des sucres neutres, des hexosamines, des acides uroniques, le KDO. Glucose, galactose, mannose et rhamnose sont présents dans la majorité des cas mais en proportions variables. Les oses méthylés sont en petite quantité dans de nombreux échantillons. L'heptose est rare mais parfois méthylé (RUSSA et LORKIEWYCZ, 1979).

Les lipides A révèlent des compositions en acides gras similaires entre les espèces. Les acides β -hydroxymyristique (3-OH-14:O) et β -hydroxypalmitique (3-OH-16:O) sont les plus importants. On trouve également d'autres acides, le plus souvent hydroxylés, en proportions plus faibles.

L'examen comparatif de ces LPS montre autant de différences entre les espèces de **Rhizobium** qu'entre des souches au sein d'une même espèce. Non seulement cette notion sera constamment vérifiée mais, de plus, il s'avère que les molécules de LPS sont très hétérogènes. Il existe différentes formes qui pourraient résulter d'agrégats à divers stades, de quantités variables d'unités de répétition dans l'antigène O, de types multiples de molécules et de la combinaison de ces facteurs (CARLSON, 1984).

La variabilité de la composition et des propriétés immunochimiques des LPS au cours de la phase de croissance de **R. leguminosarum** bv. **trifolii** (HRABAK et al., 1981) conforte l'observation précédente.

Une étude plus détaillée des LPS de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* et bv. *phaseoli* a mis en évidence un motif structural commun au niveau du "core". Celui-ci est essentiellement composé d'acide galacturonique, avec de petites quantités de mannose, galactose, glucose et KDO (CARLSON, 1984 ; CARLSON et al., 1987 a,b). La structure caractéristique moyenne consiste en 2 résidus terminaux d'acide galacturonique associés par des liaisons α aux carbones 4 et 7 du KDO (CARLSON et al., 1988) (fig. 10).

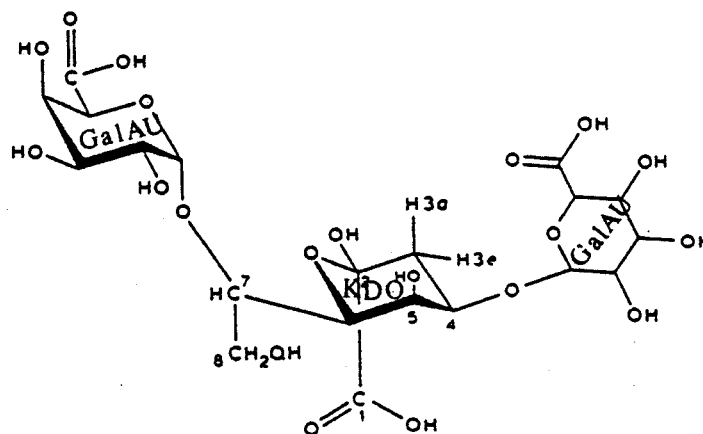


Figure 10 - "Core" du LPS de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843.

Un composant mineur est constitué de mannose, galactose, acide galacturonique et KDO. L'existence de ces deux fragments indiquerait la présence possible de ces deux types de LPS, peut être synthétisés à des moments différents de la croissance. Chaque isolat de LPS pourrait contenir les deux formes (HOLLINGSWORTH et al., 1989 a,b).

Quant à l'antigène O, sa composition est très variable selon les souches. Il contient fréquemment des oses et osamines méthylés et, quand l'heptose est présent, il est localisé dans l'antigène O et non dans le "core". Par ailleurs, des oligosaccharides issus de l'antigène O et du "core" contiennent le KDO à leurs extrémités réductrices indiquant ainsi que c'est ce dernier qui lie la chaîne latérale et le "core" au reste de la molécule (CARLSON et al., 1987a).

Ces résultats montrent que les LPS de *R. leguminosarum* sont différents de ceux des Enterobacteriaceae. La forme complète du LPS de *Rhizobium* aurait un antigène O court, constitué d'un polysaccharide complexe plutôt que d'un oligosaccharide formé d'unités répétitives.

Dans les LPS de *R. meliloti* 10406, URBANIK-SYPNIEWSKA et al. (1989) ont démontré de fortes teneurs en glucose, acide galacturonique et KDO. Par contre, il n'y a pas d'heptose. Ceci suggère une structure du core identique à celle de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Le lipide A (fig. 11) contient un disaccharide constitué de deux glucosamines phosphorylées liées en β -1,6. Les acides gras, associés par des liaisons ester ou amide sont : l'acide 3-hydroxymyristique (3-OH-14:0), 3-hydroxystéarique (3-OH-18:0) et un acide gras particulier : l'acide 27-hydroxyoctacosanoïque (27-OH-28:0), primitivement mis en évidence chez *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 (HOLLINGSWORTH et al., 1989b) et qui semble propre aux Rhizobiaceae.

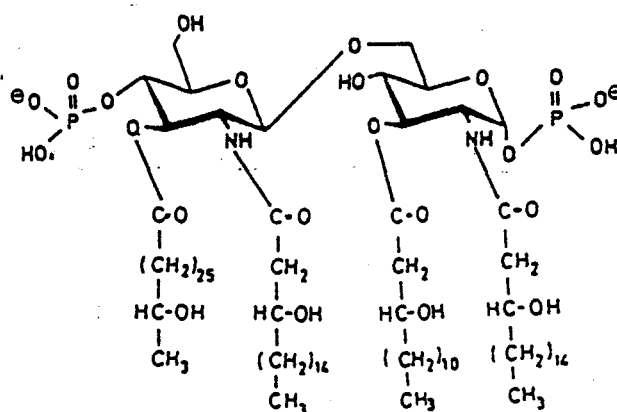


Figure 11 - Lipide A de *R. meliloti* 10406.

Il y a peu de travaux sur la purification et la composition des LPS de *Bradyrhizobium*. Toutefois, différentes souches de *B. japonicum* (CARLSON et YADAV, 1985 ; PUVANESARAJAH et al., 1987 ; CARRION et al., 1990) et de *B. lupini* (MAYER et al., 1989) ont été étudiées. On constate généralement la présence d'une assez grande variété d'oses neutres méthylés ou non, osamines, acides uroniques, etc... La teneur en KDO est plus ou moins importante. Le

lipide A contient l'acide 27-hydroxyoctacosanoïque mais il est surtout caractérisé par un ose rare : le 2,3-diamino-2,3-didéoxyglucose que l'on ne trouve pas chez les **Rhizobium** à croissance rapide et qui remplacerait la glucosamine dans le squelette osidique du lipide A des LPS de **Bradyrhizobium**.

CHAPITRE II

LES INTERACTIONS CELLULAIRES DE SURFACE DANS LA NODULATION

La morphogenèse du nodule efficient, capable de fixer l'azote atmosphérique, constitue sans doute l'événement le plus complexe de la symbiose, car elle met en oeuvre des échanges de signaux entre la plante et la bactérie, prélude à des différenciations morphologiques et physiologiques chez les partenaires. Dans les premiers instants, ces interactions concernent essentiellement les surfaces cellulaires.

Aussi, après avoir décrit la formation des nodules, nous nous intéresserons au rôle des structures externes de **Rhizobium**, en focalisant notre attention sur les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides.

I. - ONTOGENESE DES NODULES

A. - Processus général

L'étape d'initiation correspond à un chimiotactisme bactérien positif vis-à-vis des exsudats racinaires aboutissant à un enrichissement de la rhizosphère en **Rhizobium** (fig. 12A). Dans un premier temps, ceux-ci s'attachent de façon polaire aux poils radiculaires ou à des cellules génétiquement prédisposées à se différencier en radicelles (fig. 12B).

BHUVANESWARI **et al.** (1981) ont montré que les cellules-hôtes infectibles se situent dans la zone de préémergence des poils radiculaires et qu'il n'y a pratiquement pas de nodulation sur les poils anciens des racines de Soja, de Trèfle ou de Luzerne. De même, la susceptibilité à l'infection par **R. leguminosarum** est essentiellement confinée dans les régions des jeunes racines primaires du Pois où émergent les poils (DIAZ **et al.**, 1986).

La première réponse visible de l'infection est la courbure du poil en "crosse de berger" (fig. 12C). Peu de choses sont connues sur ce mécanisme mais il serait induit par les bactéries (HALVERSON **et** STACEY, 1986). Toutefois, la courbure ne semble pas essentielle et elle est parfois absente (ROBERTSON **et al.**, 1985). La bactérie est ainsi enclose dans une sorte de poche formée par une invagination de la paroi du poil. On considère généralement qu'un seul type de **Rhizobium** est à l'origine du nodule mais certains travaux, en particulier sur le Soja (MOAWAD **et** SCHMIDT, 1987), indiquent que les infections mixtes sont suffisamment fréquentes pour attirer l'attention. Des

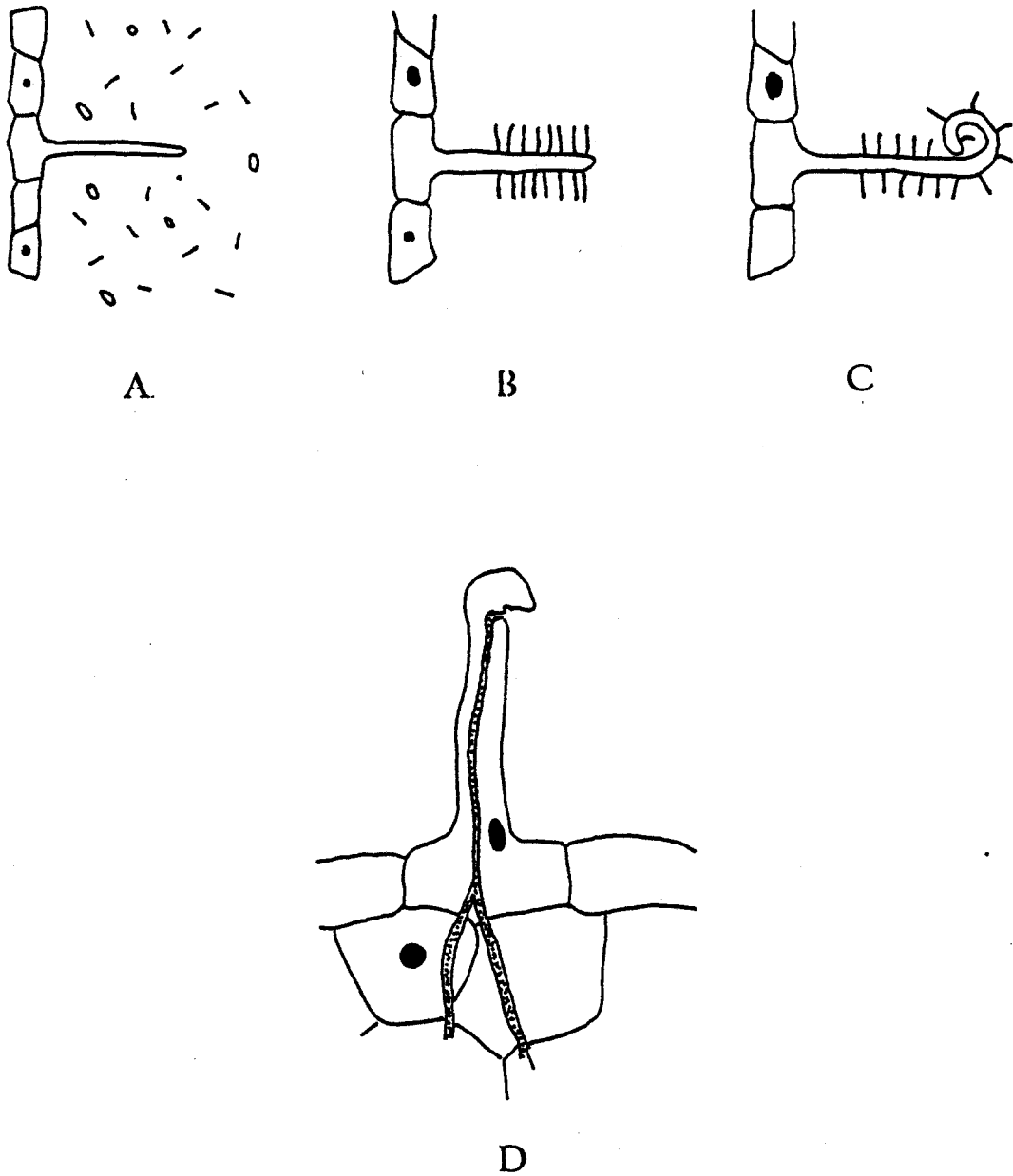


Figure 12 - Infection d'un poil racinaire par *Rhizobium*.

- A : *Rhizobia* dans la rhizosphère.
- B : Attachement polaire aux poils racinaires.
- C : Courbure du poil.
- D : Propagation du cordon d'infection.

enzymes hydrolytiques, pectinases et cellulases, d'origine mal définie, dégradent la paroi végétale, permettant l'entrée du *Rhizobium* et la formation d'un cordon infectieux qui pénètre dans les cellules corticales.

Le cordon se ramifie et se dirige vers la racine (fig. 12D), limité extérieurement par la paroi cellulosique et la membrane cytoplasmique de la plante. Toutefois, certaines Légumineuses, comme l'Arachide, ne sont pas envahies par un cordon infectieux mais par les espaces intracellulaires du cortex racinaire (ROLFE et GREESHOF, 1988). VANDENBOSCH et al. (1989a) réconcilient ces deux modes d'entrée, apparemment différents, en montrant, par immunocytochimie, que le cordon d'infection peut être considéré comme une modification anatomique spécialisée de l'espace intracellulaire normal.

La gaine du cordon est néosynthétisée lors de son avancée et peut être considérée comme une réaction de défense qui permet au *Rhizobium* d'atteindre l'intérieur de la plante mais sans accéder au cytoplasme (DJORDJEVIC et al., 1987a).

Dans le cas du Soja, ROTH et STACEY (1989) distinguent trois régions dans le cordon (fig. 13).

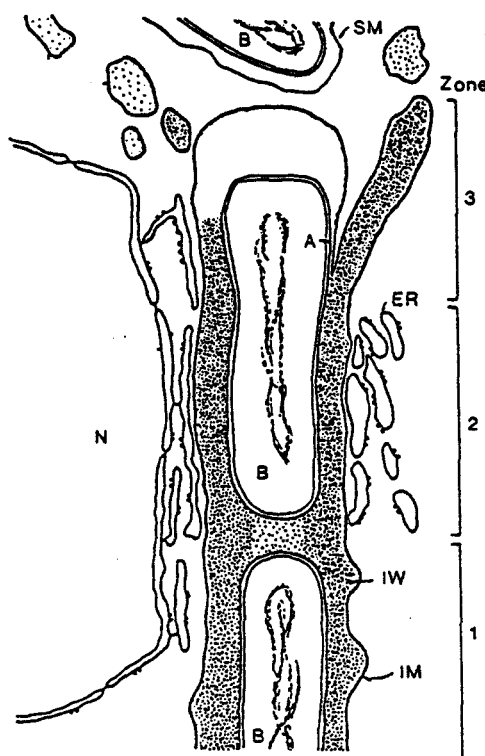


Figure 13 - Les 3 zones du cordon infectieux des nodules de Soja, d'après ROTH et STACEY (1989).

A : membrane externe de la bactérie ; B : bactérie ; ER : réticulum endoplasmique végétal ; IM : membrane du cordon infection ; IW : paroi du cordon infectieux ; N : noyau de la cellule végétale ; SM : membrane de séquestration.

Zone 1 : la partie moyenne du cordon contient des bactéries qui se divisent, entourées d'une matrice polysaccharidique certainement d'origine bactérienne.

Zone 2 : il s'agit d'une région de mobilisation membranaire. Une intense activité du réticulum endoplasmique fournit les quantités importantes de membranes exigées ultérieurement.

Zone 3 : à l'extrémité du cordon, un processus d'endocytose permet l'intégration dans le cytoplasme de la cellule méristématique d'une bactérie entourée d'une membrane de séquestration ou pér bactéroïde qui a une triple origine : le réticulum endoplasmique, le cordon infectieux et une synthèse *de novo*. La juxtaposition de cette membrane avec la membrane externe de la bactérie, suggère des interrelations fonctionnelles. Chez le Soja, elle est le siège des échanges entre le macro et le microsymbionte. Glucose et saccharose pourraient diffuser passivement tandis qu'un transport actif intéresse le succinate et le malate (MELLOR, 1989).

Dès le début de l'infection, le **Rhizobium** émettrait un signal vers la plante-hôte, ordonnant la production de cette membrane pér bactéroïdienne (MELLOR *et al.*, 1989).

La bactérie, l'espace et la membrane pér bactéroïdiens constituent un compartiment endosymbiotique comparable à un lysosome. En effet, il contient les mêmes protéines à caractère lytique, les bactéroïdes seraient protégés, durant la phase de fixation de l'azote, par l'ammonium agissant par "rétro-action" sur les protéases lysosomales, en tant que produit final du catabolisme des protéines. Ceci ne serait pas suffisant, d'autres mécanismes devant protéger les bactéroïdes (MELLOR, 1989). De telles organelles existent dans pratiquement toutes les endosymbioses, le terme de "symbiosome" semble admis (ROTH *et al.*, 1988).

Dans leur vacuole de séquestration, les *Rhizobium* à croissance lente effectuent quelques divisions, donnant des îlots de cellules non déformées tandis que les *Rhizobium* à croissance rapide ne se divisent plus mais augmentent de volume et se déforment de façon importante.

BERGERSEN (1974) a proposé d'appeler "bactéroïde" toute forme symbiotique de *Rhizobium* se trouvant dans le nodule, dont une cellule peut en contenir quelques centaines, entourant une vacuole centrale (fig. 14).

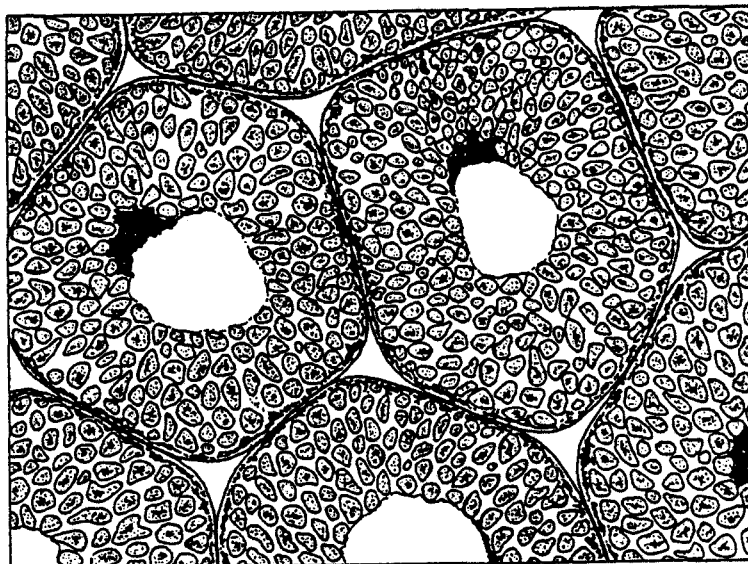


Figure 14 - Schéma représentant quelques cellules de la zone bactérienne du nodule (type Pois) avec, dans chacune d'elles, les quelques centaines de bactéroïdes entourant la vacuole centrale, d'après BLONDEAU (1981).

Ces bactéroïdes deviennent les organismes fixateurs d'azote atmosphérique par dérégulation des gènes *nif* et formation d'un complexe enzymatique métalloprotéique : la nitrogénase qui réduit l'azote moléculaire en ammoniac, en absence d'oxygène. Les ions ammonium sont pris en charge par un système enzymatique qui procure ainsi du glutamate à la plante (BLONDEAU, 1980).

La différenciation symbiotique et la maintenance des bactéroïdes de *R. meliloti* dans les nodules de Luzerne exigent une activité succinate déshydrogénase (GARDIOL et al., 1987). L'importance des acides

dicarboxyliques comme source d'énergie pour la fixation d'azote a encore été démontrée par HORNEZ et al. (1989) grâce à l'obtention d'un mutant de *R. meliloti* M5N1 déficient dans le transport du succinate. Celui-ci ne peut former que des nodules inefficients, sans activité nitrogénasique. Un mutant équivalent chez *B. japonicum* retarde le développement du nodule (HUMBECK et WERNER, 1989).

Durant ces événements, la plante réagit par la dédifférenciation et la division de cellules du parenchyme cortical. Cette prolifération sur un côté de la racine engendre progressivement le nodule que le développement d'un système vasculaire connecte à la racine porteuse.

L'activité propre du méristème est responsable de la morphologie du nodule, caractéristique de la Légumineuse.

A maturité, le nodule allongé (type Pois, Trèfle, Luzerne) peut être divisé en quatre zones (MOSSE, 1964) (fig. 15).

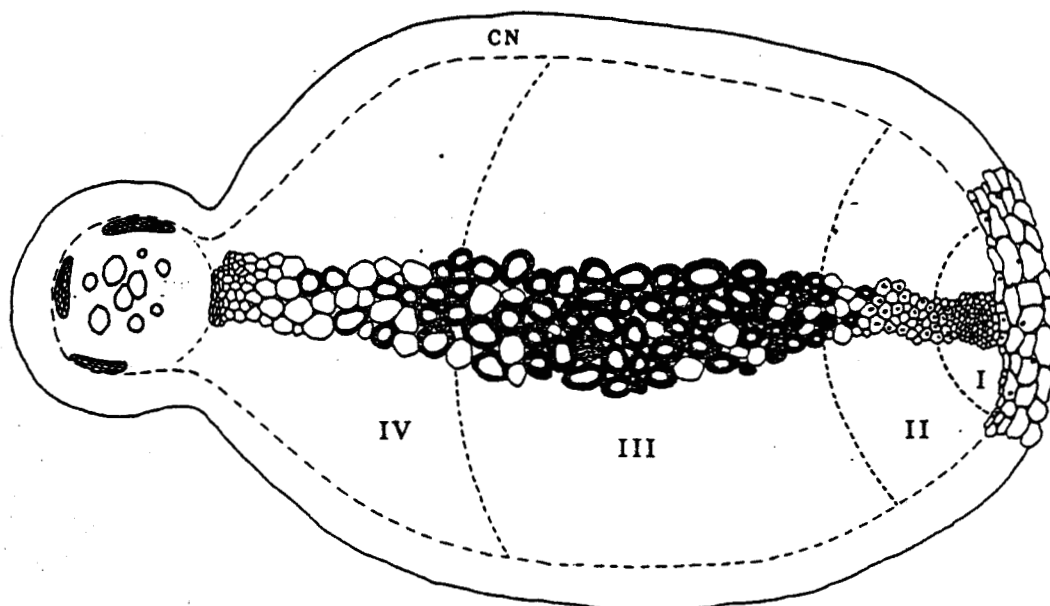


Figure 15 - Schéma d'une section longitudinale d'un nodule (type Pois), selon BLONDEAU (1981).

CN : cortex nodulaire ; I : zone méristématique ; II : zone d'accroissement cellulaire et d'invasion ; III : zone bactérienne fixatrice ; IV : zone de dégénérescence.

A l'apex, la zone I renferme un tissu méristématique dont les cellules se divisent jusqu'à ce que la croissance du nodule soit achevée. Dans la zone II d'accroissement cellulaire et d'invasion, les **Rhizobium** pénètrent dans la plupart des cellules-hôtes. La zone III est la zone rouge du nodule, par la présence de lég'hémoglobine, fixatrice d'azote. La zone IV correspond à une dégénérescence.

Ce schéma a été affiné par VASSE **et al.** (1990) qui remarquent une corrélation entre la différenciation bactérienne de **R. meliloti** et la morphogénèse du nodule de Luzerne. 5 types de bactéroïdes peuvent être observés de la zone II à la zone III :

- le type I, dans la partie distale de la zone II, correspond à des bactéries récemment sorties du cordon infectieux. Les bacilles sont en division, leur ADN est dense, l'espace périplasmique est large, les membranes sont ondulées ;
- le type II, dans la zone proximale de la zone II, est caractérisé par l'élongation des bactéroïdes ;
- le type III se trouve uniquement dans l'interzone II-III. Le cytoplasme des bactéroïdes est hétérogène.

Les types II et III remplissent la plus grande partie des cellules-hôtes dont les organelles végétales sont confinées contre la paroi.

- le type IV est situé dans les cellules distales de la zone III. L'hétérogénéité cytoplasmique augmente avec des régions denses (polysomes) et translucides (fibrilles d'ADN) aux électrons. Seuls ces bactéroïdes fixent l'azote ;
- le type V, dans les cellules proximales de la zone III, perd progressivement l'hétérogénéité du cytoplasme.

Les zones II et III du nodule pourraient aussi être subdivisées en :

- une zone II, présymbiotique ;
- une interzone II-III ;

- une zone III, fixatrice d'azote (cellules distales) ;
- une zone III, inefficace (cellules proximales).

La nodulation n'est pas un phénomène anarchique puisque la plante ne permet la formation que d'un nombre restreint de nodules, certainement pas en rapport avec les potentialités représentées par la population tellurique de **Rhizobium**. L'hôte peut contrôler le degré de nodulation par un mécanisme interne préexistant, induit par un signal issu du **Rhizobium** homologue (SARGENT *et al.*, 1987). Les EPS de **R. meliloti** ne sont pas concernés par cette régulation (CAETANO-ANOLLES *et al.*, 1990). Par contre, l'azote exogène disponible pourrait intervenir (HALVERSON *et STACEY*, 1986).

Au cours du développement du nodule, des protéines spécifiques sont synthétisées. La légghémoglobine, localisée dans le cytoplasme végétal, fournit une concentration en oxygène suffisante pour l'activité métabolique des bactéroïdes, sans endommager le complexe nitrogénasique. La globine est apportée par la plante, le **Rhizobium** assurant la synthèse de l'hème dont les précurseurs sont des acides dicarboxyliques (HORNEZ *et al.*, 1989).

Les nodulines sont des protéines nodulaires codées par la plante, sans doute en réponse aux stimulations bactériennes. Quelques dizaines de nodulines ont été mises en évidence. Certaines seraient communes à tous les nodules, d'autres seraient spécifiques des espèces végétales. Beaucoup d'entre elles, de fonctions inconnues, sont localisées dans la membrane péribactéroïde (LONG, 1989).

Enfin, l'espace péribactéroïdien contient des composés aux rôles mal connus. Les bactéroïdes de **R. leguminosarum** synthétisent la majorité des protéines présentes. 30 % d'entre elles sont identiques aux protéines de l'espace périplasmique bactérien. Quelques polypeptides sont clairement identifiés comme spécifiques de la symbiose (KATINAKIS *et al.*, 1988).

Les nodules vont ainsi fonctionner durant quelques semaines s'ils ne sont pas consommés par des prédateurs comme la larve du Charançon **Sitona hispidulus** qui trouve sur les racines de Luzerne une excellente nourriture azotée (WOLFSON, 1987). Dans les nodosités sénescentes, le nombre de bactéroïdes augmente à l'intérieur des vacuoles de séquestration, par fusion des

membranes péribactéroïdiennes. Des protéases digèrent partiellement la paroi des microsymbiontes dont la lyse se trouverait facilitée par la disparition de la membrane qui les entoure (PLADYS et RIGAUD, 1988). Beaucoup d'auteurs considèrent que les débris que l'on peut voir dans les vacuoles sont les résidus des bactéroïdes (MELLOR, 1989).

L'aptitude à établir une association fixatrice d'azote est donc un génotype létal pour les *Rhizobium* qui se sont différenciés en bactéroïdes. De ce point de vue, l'association ressemble plutôt à un parasitisme imposé par la plante qu'à une symbiose. Toutefois, si l'on considère que chaque nodosité dérive de l'infection d'une cellule végétale par une souche bactérienne, on peut postuler que le nodule contient un clone dans lequel certains individus se sont spécialisés dans la fixation d'azote tandis que d'autres survivent au stade végétatif indifférencié. Tous sont cependant fix⁺, sinon le nodule aurait avorté ou serait mort prématurément. Il y a donc une sélection de bactéries efficaces.

La libération de ces cellules végétatives, lors de la désintégration des nodosités, vient enrichir la rhizosphère en allèles fix⁺ qui vont recommencer le cycle la saison suivante. La différenciation en bactéroïdes d'une partie de la population de *Rhizobium* colonisant le nodule serait donc strictement requise pour la maintenance de la population. Ce modèle altruiste de l'association *Rhizobium*-Légumineuse (JIMENEZ et CASADESUS, 1989), primitivement appliqué aux plantes annuelles, peut aussi s'étendre aux Légumineuses pérennes chez lesquelles des nodules actifs et sénescents coexistent. Ces derniers pourraient être la source de bactéries pour la formation de nodules au début du cycle saisonnier suivant. L'inoculation au champ de *Rhizobium* est aussi une stratégie analogue à celle que nous venons de décrire.

B. - Organisation des nodules de Luzerne

Les nodules de Luzerne (*Medicago sativa*) ont été examinés en microscopie électronique à balayage (Annexe I, Planche III). Ils sont en général de forme allongée et de surface verruqueuse (Photo A). Parfois, un dysfonctionnement du méristème apical donne un nodule ramifié (Photo B). Les cellules végétales des zones II et III sont envahies par des centaines de *Rhizobium* massés autour

d'une vacuole qui a laissé une empreinte creuse (Photos C et D). Les bactéroïdes de *R. meliloti* ont fréquemment subi des déformations importantes (Photos E et F).

HORNEZ *et al.* (1974) ont utilisé la microscopie électronique à transmission pour suivre la différenciation des bactéries (Annexe I, Planche IV).

La zone nodulaire II correspond à la zone d'infection des cellules végétales par les bactéroïdes. Dans cette région, on rencontre :

- **photo A** : des cordons infectieux qui cheminent dans le tissu nodulaire et qui assurent la dissémination des cellules bactériennes dans le cytoplasme de la plante. Ici, la position du cordon est centrale. Il traverse le cytoplasme cellulaire de part en part, enveloppé par une membrane d'origine végétale. Il apparaît formé de mucilage dans lequel sont noyées les bactéries. Leur structure est difficile à préciser, car les images de cette région sont délicates à interpréter en raison de l'accumulation du mucilage qui gêne l'observation. Il semble cependant qu'elles contiennent, comme les cellules en culture libre, de nombreux granules d'acide β -polyhydroxybutyrique ;
- **photo B** : des bactéries entourées après leur libération dans le cytoplasme végétal, d'une cytomembrane de séquestration. Quelques cellules semblent encore se diviser, mais la plupart d'entre elles s'élargissent et passent de la forme coccoïde ou bacillaire courte (1 μ) à des formes plus allongées. Les grains d'acide β -polyhydroxybutyrique ont disparu, ce qui suppose des modifications importantes du métabolisme. L'ADN, très localisé en un à trois nucléoïdes, se disperse dans certaines cellules ; le cytoplasme reste très riches en ribosomes ;
- **photo C** : des formes bactériennes anormales dont la taille est très supérieure à celle des cellules en culture libre (5 à 6 μ de long). Elles ont un aspect boursoufflé et recroquevillé. La coupe longitudinale donne des images très tourmentées avec présence de replis internes. Il apparaît alors des corps granuleux dont nous n'avons pu définir la nature et que nous supposons être des amas ribosomaux.

Dans la zone III (Photo D), on observe les cellules bactériennes totalement transformées en bactéroïdes. On y constate la présence de membranes internes. Ces structures se développent parallèlement à la membrane cytoplasmique bactérienne avec laquelle elles ne semblent pas avoir de contact. Elles peuvent se dédoubler plusieurs fois. Elles restent toujours à la périphérie de la cellule et en formations parallèles.

Il est intéressant de noter que ce même type de formations a été observé chez d'autres microorganismes unicellulaires très différents mais possédant en commun la propriété d'utiliser les gaz (HORNEZ et al., 1974).

II. - ROLE DES STRUCTURES BACTERIENNES DE SURFACE

Les mécanismes de base, qui permettent l'identification réciproque des deux symbiontes puis la progression séquentielle des différenciations cellulaires végétales et microbiennes, s'apparentent à des réactions du type "clé-serrure".

La première hypothèse, expérimentalement vérifiée par BOHLOOL et SCHMIDT (1974), propose l'interaction spécifique entre une lectine de la plante-hôte et les polysaccharides de surface des *Rhizobium* compatibles. Poursuivant dans cette voie, DAZZO et HUBBEL (1975) démontrent une forte corrélation entre la réaction avec une lectine et l'infectivité dans la symbiose *R. leguminosarum* bv. *trifolii*-Trèfle. Ils proposent un modèle de reconnaissance (fig. 16) reposant sur l'existence de molécules à la surface des deux symbiontes, les "C.R.A." (Cross Reactive Antigens), présentant une affinité pour une lectine identifiée ultérieurement et nommée trifoline A (DAZZO et al., 1978). Celle-ci se lie spécifiquement avec les LPS et CPS de la bactérie (DAZZO et al., 1976). Cette première étape est suivie d'une phase d'adhésion où interviennent des microfibrilles cellulosiques (DAZZO et al., 1984).

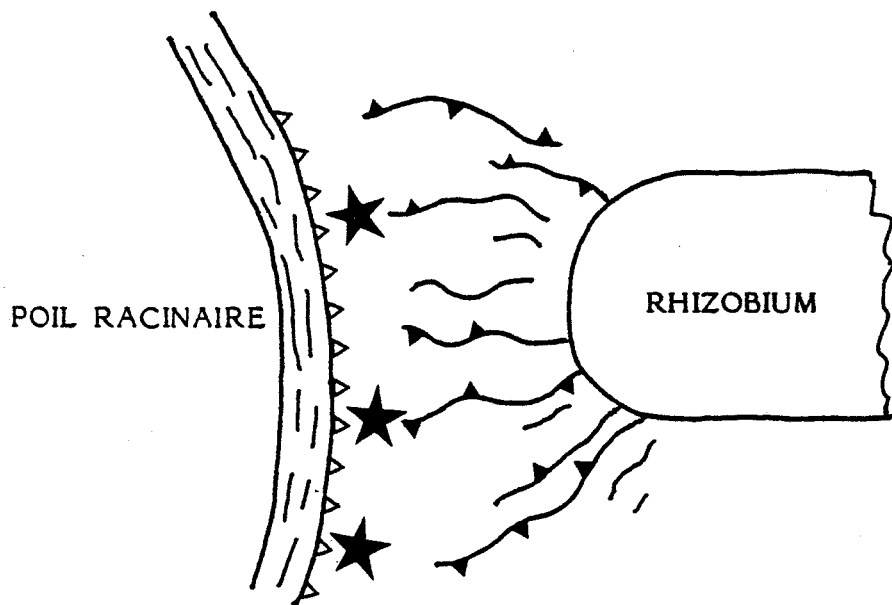


Figure 16 - Modèle de reconnaissance Rhizobium-Trèfle, selon DAZZO et al. (1975).

- ▲ ▲ : Cross Reactive Antigens
 ★ : Trifoliine A.

Des arguments viennent conforter et affiner cette hypothèse.

WOLPERT et ALBERSHEIM, en 1976, constatent l'interaction entre les LPS, et particulièrement l'antigène O, de *B. japonicum*, *R. leguminosarum*, etc... et les lectines isolées et purifiées des graines des Légumineuses homologues.

KAMBERGER, en 1979, met en évidence la spécificité entre LPS et lectines dans les symbioses *R. leguminosarum*-Pois et *R. meliloti*-Luzerne, tandis que la lectine de Pois agglutine tous les EPS des Rhizobium à croissance rapide et que la lectine de Soja ne précipite qu'avec l'EPS de *B. japonicum*.

HRABAK et al., en 1981, montrent que les LPS de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* réagissent mieux avec la trifoliine lorsqu'ils sont extraits au début de la phase stationnaire de croissance plutôt qu'en phase exponentielle.

De même, SHERWOOD et al., en 1984, précisent que l'aptitude des CPS à se lier avec la trifoliine dépend de leur âge. De plus, les cellules bactériennes de 3 ou 21 jours s'attachent exclusivement de façon polaire aux racines tandis

que les cellules de 5 jours s'attachent au hasard et en plus grand nombre. La quantité et la localisation des récepteurs de la lectine varient et sont reliées à l'attachement aux racines. Ainsi, DIAZ **et al.** (1986) localisent la lectine de Pois à l'extrémité des poils racinaires nouvellement formés ou en croissance et sur les cellules localisées juste derrière les jeunes poils. Ces lectines ne sont pas uniformément réparties mais plutôt concentrées en petits amas denses. Ces zones racinaires sont susceptibles à l'infection par le microsymbiote alors que celles dépourvues de lectine présentent très rarement des nodules.

Toutefois, des expériences contredisent l'hypothèse des lectines. HALVERSON et STACEY (1986) rappellent que plusieurs espèces de **Rhizobium** se lient à des lectines isolées de plantes qu'elles ne peuvent pas infecter et que des Légumineuses sont, par contre, infectées et nodulées par plus d'une espèce de **Rhizobium**, ce qui a toujours affaibli la définition classique des groupes d'inoculation croisée.

HANDELSMAN **et al.** (1984) montrent que des souches de **R. meliloti**, ayant une affinité moindre pour l'agglutinine de Luzerne, sont plus compétitives et donnent une nodulation plus précoce. Ils concluent à la possibilité que l'attachement de **R. meliloti** par la lectine ne joue pas un rôle dans la spécificité ou l'attachement de la bactérie à la racine. La lectine pourrait avoir une influence plus subtile dans l'écologie de **R. meliloti** et la baisse d'affinité aiderait la bactérie à survivre dans la rhizosphère de la Luzerne. Par ailleurs, l'attachement racinaire peut être assuré par d'autres processus qui pourtant n'excluent pas obligatoirement les lectines.

VESPER et BAUER (1986) démontrent l'implication d'une adhésine fimbriale dans l'attachement de **B. japonicum**. Dans ce dernier cas, le traitement des bactéries par un immunsérum anti-pili réduit l'attachement aux racines de Soja de 90 % et la nodulation de 80 %. Des mutants transposés de **B. japonicum**, produisant plus de cellules piliées que les parents, s'attachent mieux et sont responsables d'une meilleure nodulation (VESPER **et al.**, 1987).

SMIT **et al.** (1987) mettent en évidence le rôle des fibrilles de cellulose et d'une adhésine calcium-dépendante lors de l'attachement de **R. leguminosarum**

bv. *viciae* aux poils racinaires du Pois. Cette adhésine est identifiée comme une petite protéine localisée à la surface de la bactérie (SMIT et al., 1989a). Elle intervient au premier stade d'un processus d'attachement subdivisé en deux étapes, dépendant des conditions nutritionnelles (fig. 17) (SMIT et al., 1989b).

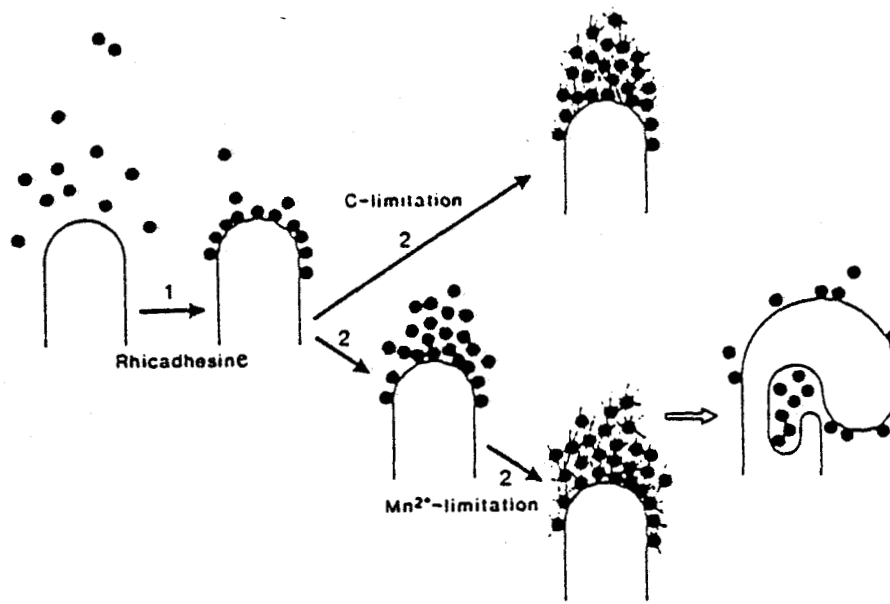


Figure 17 - Modèle pour l'attachement de *R. leguminosarum* bv. *viciae* aux poils racinaires de Pois, d'après SMIT et al. (1989b).

Dans le cas d'une limitation en source carbonée, l'accumulation bactérienne est due aux fibres de cellulose, sans intervention de lectines. Dans le cas d'une limitation en manganèse, lectines et fibres cellulosiques sont impliquées, assurant une meilleure infection des cellules racinaires (KIJNE et al., 1988 ; SMIT et al., 1989b). Ce cation apparaît comme un facteur limitant de la croissance de *R. leguminosarum*.

Cette adhésine calcium-dépendante, commune parmi les *Rhizobiaceae*, est désignée rhicadésine. Elle est capable d'inhiber l'attachement de *R. leguminosarum* 248 aux racines de diverses plantes, incluant des non-légumineuses et des monocotylédones, ce qui suggère l'existence chez les plantes d'un récepteur commun pour la rhicadhésine (SMIT et al., 1989b).

Il apparaît donc que le modèle de DAZZO et HUBBEL (1975) n'est pas suffisant à lui seul pour expliquer la spécificité de la reconnaissance entre les

symbiontes de n'importe quelle association. D'autres mécanismes viennent l'aider ou le suppléer en fonction des systèmes et des conditions environnementales. De plus, cette liaison physique doit être suivie d'interactions moléculaires entre les partenaires pour provoquer et contrôler la genèse des nodules et des bactéroïdes. En raison de leur localisation, il est concevable d'imaginer que les exostructures bactériennes sont aussi concernées par cet échange de signaux entre la plante et la bactérie.

Dans le cas du Trèfle, les EPS et CPS bactériens sont indispensables à la nodulation. Les mutants *nod*⁻ ont des EPS anormaux (CAVIEDES *et al.*, 1982). Mais les LPS de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 et des mutants *nod*⁻ sont identiques (CARLSON *et al.*, 1987a) ainsi que ceux de la souche AR5 et de ses dérivés formant des nodules abortifs (GLOWACKA *et al.*, 1986). Toutefois, RUSSA *et al.* (1981, 1983) montrent des différences entre les LPS de souches nodulantes et non nodulantes, en particulier dans la composition en sucres neutres.

Si les symbioses *R. leguminosarum* bv. *trifolii*-Trèfle et *R. leguminosarum* bv. *viceae*-Pois nécessitent des bactéries capables de synthétiser des EPS acides, il semble que l'association *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*-Haricot n'a pas cette exigence (DIEBOLD et NOEL, 1989). Par contre, les LPS de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* doivent être en quantité normale et avoir des structures complètes (CAVA *et al.*, 1989, 1990).

Chez *R. meliloti*, les mutants *exo*⁻ forment des nodules inefficients (LEIGH *et al.*, 1985) mais les LPS n'ont pas un rôle majeur car ils peuvent présenter un large degré d'altération sans affecter la symbiose (CLOVER *et al.*, 1989). En outre, GEREMIA *et al.* (1987) ont isolé des mutants qui ne synthétisent pas de β -1,2 glycannes et induisent la formation de pseudo-nodules inactifs.

La nodulation du Soja sera retardée (28 jours au lieu de 17) si l'inoculation est effectuée à l'aide de mutants de *B. japonicum* ayant des LPS altérés (STACEY *et al.*, 1982). De même, PUVANESARAJAH *et al.* (1987) trouvent de grosses variations dans la composition des LPS de *B. japonicum* USDA110 et d'un mutant non nodulant qui serait de type R. La composition osidique des EPS est identique.

Les mutants muc⁻ de *Rhizobium* NGR234, symbionte d'une Légumineuse tropicale *Leucaena leucocephala*, ne produisent pas de nodules. La co-inoculation avec *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU265, producteur d'EPS (muc⁺), aboutit à la formation de nodules efficaces dans lesquels on trouve les bactéries muc⁻ et muc⁺. La complémentarité s'est faite sans échange génétique détecté entre les deux souches. L'EPS est donc essentiel pour cette symbiose même s'il ne provient pas de la souche homologue (CHEN et ROLFE, 1987).

Par contre, il n'y a pas de corrélation entre la spécificité d'hôte et la composition des EPS et LPS des *Rhizobium* isolés de *Lotus* sp. et *Hedysarum coronarium* (BELLOGIN et al., 1984). KIM et al. (1989) puis KO et GAYDA (1990) ont également montré que ni les EPS ni les glucanes neutres ne sont requis pour l'induction de nodules efficaces pour *R. fredii*.

Si chaque type d'association symbiotique semble s'établir selon un mode qui lui est propre, la fonction associée à l'EPS paraît se situer au niveau de l'invasion du tissu racinaire (LEIGH et al., 1985) et de la stimulation de la formation du cordon infectieux (ABE et al., 1984 ; LEIGH et LEE, 1988).

Les EPS de *R. meliloti* induisent la production de polygalacturonase par les racines. Cette enzyme facilite la pénétration des bactéries par digestion de la pectine végétale (PALOMARES et al., 1978). Les mutants exo⁻ de *R. meliloti* SU47 forment des nodules atypiques ne contenant pas de bactéroïdes, initiés sans crosse de berger ni cordon infectieux. Si l'addition d'EPS homologues à des mutants exo⁻ de *Rhizobium* NGR234 et *R. leguminosarum* bv. *trifolii* restaure la symbiose (DJORDJEVIC et al., 1987b), il semble que la supplémentation avec l'EPS ne soit pas valable dans le système *R. meliloti*/Luzerne (MULLER et al., 1988). Le polysaccharide pourrait alors jouer un rôle étranger ou additionnel à la reconnaissance.

Les mécanismes d'action ne semblent pas impliquer la totalité de la macromolécule. Ainsi, les polysaccharides capsulaires de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* précipitent avec la trifoline tandis que les EPS natifs n'ont pas d'affinité.

Par contre, une dépolymérase phagique convertit les CPS et EPS en oligosaccharides capables de se lier à la lectine et de stimuler l'infection. L'affinité pour la lectine est également dépendante du degré de substitution par des acides organiques : pyruvique, acétique et 3-hydroxybutyrique (ABE et al., 1984 ; SHERWOOD et al., 1984). Un hybride recombinant de *R. leguminosarum* bv. *viceae*, contenant des gènes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, nodule le Trèfle et produit des EPS acides se liant avec la trifoliine tandis que la souche sauvage en est incapable. La différence entre les EPS réside dans une substitution en groupements acétyles et 3-hydroxybutyriques plus importante chez l'hybride. L'acylation de l'EPS contribue à la spécificité d'hôte de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

L'EPS de *R. meliloti*, un succinoglycane, est capable, grâce à ses liaisons β -1,3, de se lier au calcofluor obtenant ainsi, sous lumière de WOOD, une fluorescence qui permet de le mettre en évidence.

Des mutants *exoH* de *R. meliloti* Rm1021 synthétisent un EPS qui se lie au calcofluor mais les nodules produits sont ronds, sans lég'hémoglobine donc inefficients, contenant très peu de bactéries et aucun bactéroïde. Les mutants *exoH* permettent une courbure différée du poil racinaire (72 à 96 h au lieu de 24 h) mais les cordons infectieux sont anormaux ou absents. De plus, ils induisent la formation d'une seule noduline au lieu de 17.

Il s'avère que les EPS excrétés ont des oses et des liaisons osidiques identiques à ceux de la souche sauvage, mais ils ne sont pas succinylés (LEIGH et al., 1987).

S'appuyant sur d'autres travaux, les auteurs dégagent plusieurs possibilités quant aux mécanismes pouvant expliquer ces observations.

- Une structure particulière du polysaccharide serait requise pour fonctionner correctement lors du développement du nodule. L'altération du polysaccharide pourrait affecter la reconnaissance des poils racinaires infectibles. Cette déficience du mutant à reconnaître les zones susceptibles d'être envahies expliquerait le retard de courbure du poil. La fin précoce des cordons infectieux résulterait de l'incapacité de l'EPS non succinylé à servir de matrice adéquate dans le cordon.

La réduction des charges négatives, due à l'absence de succinylation, aboutirait à un déficit de la concentration locale en enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation de la paroi cellulaire de la plante. Enfin, le défaut d'induction des nodulines découlerait de l'inaptitude à fournir des oligosaccharides. En effet, il est possible qu'il soit nécessaire de dégrader le polysaccharide durant la nodulation, les produits de dégradation fonctionnant comme des signaux pour la plante. Les mutants exoH ne semblent pas capables d'effectuer cette opération, soit qu'ils ne possèdent pas d'endoglycosidase, soit que celle-ci est inactivée par la modification de son site réactionnel.

Ainsi, une ou plusieurs déficiences symbiotiques pourraient être le résultat de l'inaptitude à scinder le polysaccharide non succinylé en oligosaccharides appropriés ou encore de l'absence rédhitoire d'un radical succinyle sur un tel fragment, si la dégradation peut s'effectuer. L'importance de ces substituants non osidiques est confortée par l'observation de MÜLLER *et al.* (1988) selon laquelle des mutants de *R. meliloti*, induisant des pseudonodules sans cordons infectieux ni bactéroïdes, produisent en excès un EPS dépourvu de résidus pyruvate.

- Le second modèle reprend le précédent mais la succinylation cruciale commandée ou régulée par le gène exoH intéresserait d'autres molécules que les EPS comme, par exemple, une partie des β -1,2-glycannes cycliques.

- Selon la troisième hypothèse, le produit d'exoH jouerait un rôle dans la nodulation complètement indépendant de son rôle dans la succinylation, en fonctionnant par exemple comme un récepteur.

Si ce dernier modèle est moins considéré, les trois mécanismes ne s'excluent pas et les déficiences symbiotiques variées des mutants exoH pourraient les impliquer.

La découverte d'autres EPS synthétisés par *R. meliloti* permet de préciser ces spéculations. ZHAN *et al.* (1989) isolent une souche dérivée de *R. meliloti* SU47 qui sécrète un EPSb susceptible de remplacer le succinoglycane dans l'invasion du nodule, vraisemblablement par le même mécanisme.

Cet EPSb (fig. 18) contient du glucose, galactose, acétate et pyruvate mais il diffère du succinoglycane par la longueur de l'unité de répétition, les rapports molaires, les liaisons osidiques et l'absence de succinate.

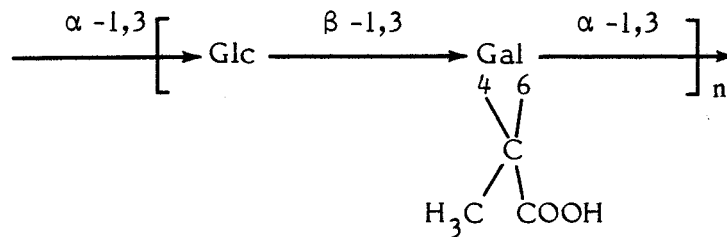


Figure 18 - EPSb de *R. meliloti* SU47.

Cette synthèse intervient dans des souches contenant une mutation par insertion du transposon Tn5 dans le locus désigné mucR. L'activité des gènes exoB et exoC est requise. Cette voie métabolique serait habituellement muette si mucR fonctionne comme répresseur de la synthèse d'EPSb et stimulateur de celle du succinoglycane.

GLAZEBROUK et WALKER (1989) mettent en évidence la capacité cryptique d'une souche de *R. meliloti* Rm1021 (dérivée de Su47) à produire un EPSII (fig. 19) qui peut supprimer les défauts symbiotiques des mutants déficients en EPSI. Cette correction n'est valable que pour l'infection de *Medicago sativa* mais pas pour d'autres plantes qui sont normalement les hôtes de *R. meliloti* 1021.

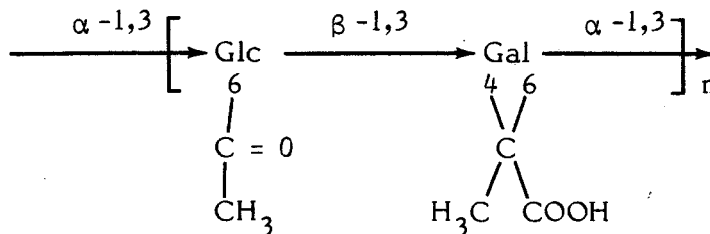


Figure 19 - EPSII de *R. meliloti* 1021.

La synthèse d'EPSII nécessite les produits d'au moins 7 gènes situés sur le second mégaplasmide symbiotique et induits par une mutation qui stimule la transcription de ces gènes. Il est possible que d'autres *Rhizobium* possèdent

aussi la faculté de produire les EPS redondants et symbiotiquement importants. Ceci pourrait aussi expliquer des conclusions contradictoires quant au rôle des EPS dans la nodulation.

Il est intéressant de noter que tous les EPS que nous venons de voir ont en commun un disaccharide glucose- β -1,3-galactose. On ne connaît pas toujours la localisation exacte des substituants acétyles et succinyles mais si l'on imagine qu'ils sont situés sur le glucose et le galactose, chaque polysaccharide aurait un élément commun constitué d'un 6-0-acétylglucose lié par une liaison β -1,3 à un galactose portant un groupement acyle. La présence d'une telle caractéristique structurale pourrait expliquer que deux EPS différents peuvent se substituer l'un à l'autre dans des processus qui semblent pourtant requérir une haute spécificité. Ceci est le cas de l'induction des nodulines par des EPS de faible poids moléculaire agissant comme signaux. Cependant, il n'est pas exclus que les EPS jouent aussi d'autres rôles beaucoup moins dépendants d'une configuration moléculaire aussi précise tels que servir de matrice dans le cordon infectieux ou de transporteurs d'enzymes extracellulaires.

Enfin, la précocité de l'action des EPS dans la nodulation semble caractéristique car les EPS sont parfois indésirables dans les étapes ultérieures. Chez *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, le gène *psi* (polysaccharide inhibition), porté par le plasmide symbiotique, est nécessaire à la fixation de l'azote mais inhibe la production d'EPS dans les bactéroïdes (BORTHAKHUR et al., 1985). De même, un mutant *muc*⁻ de *R. fredii* a une activité nitrogénasique plus élevée que la souche sauvage (BARBOUR et ELKAN, 1989).

Les LPS semblent également avoir une influence ubiquitaire au moment de l'établissement de la symbiose. Au stade de la reconnaissance, HRABAK et al. (1981) ont constaté que les LPS de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, en début de phase stationnaire, réagissent mieux avec la trifoliine que des LPS plus précoces. Ils ont un poids moléculaire et une teneur en quinovosamine plus élevés. L'influence de la phase de croissance pourrait refléter un mécanisme de régulation.

Dans un stade plus avancé de l'organogenèse du nodule, il apparaît que les variations structurales des LPS concernent surtout l'antigène O. Ainsi, des

souches anodulantes de *B. japonicum* n'ont pas d'antigènes O (MAIER et BRILL, 1978). Des mutants de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, ne possédant que le lipide A, induisent un cordon infectieux anormal et abortif (CARLSON et al., 1987). Des mutants *fix⁻* n'ont plus d'antigène O (CLOVER et al., 1989). De même, chez *R. leguminosarum* bv. *viceae*, ces mutants arrêtent le développement du nodule au stade de la libération des bactéries dans le cytosol végétal. DEMAAGD et al. (1989b) postulent que l'absence d'antigène O est reliée à l'augmentation de l'hydrophobicité et la variation du potentiel électrique de la surface. Or, l'endocytose des bactéries dépend d'interactions membranaires correctes. Plus que la structure chimique, il semble que ce soit la quantité de LPS qui importe. Par contre, dans les nodules, la membrane externe des bactéroïdes de *R. leguminosarum* contient moins de LPS que dans les bactéries (VAN BRUSSEL et al., 1977). En fait, il semble que les bactéroïdes possèdent le "core" polysaccharidique mais les antigènes O sont incomplets (BREWIN et al., 1986 ; DEMAAGD et al., 1989a).

Pourtant, VANDENBOSCH et al. (1989b), à l'aide d'anti-corps monoclonaux, ont mis en évidence, chez les bactéroïdes de *R. leguminosarum* bv. *viceae*, un antigène de surface induit par le nodule, associé aux LPS. Cette forme de LPS n'est pas exprimée par les *Rhizobium* du cordon infectieux ni par les bactéries récemment relâchées dans le cytoplasme de la cellule végétale. L'expression de cet antigène n'est pas en corrélation avec un stade particulier de l'invasion bactérienne mais plutôt associée avec les tissus nodulaires les plus matures dans lesquels on peut supposer une micro-aérobiose. A partir de ces considérations, KANNENBERG et BREWIN (1989) postulent que les LPS n'étant pas des structures invariables mais dépendantes des conditions physiologiques régulées par le nodule, l'antigénicité doit pouvoir être simulée en culture. Effectivement, l'induction est réalisée par une faible teneur en oxygène et un pH bas.

On sait qu'il existe une micro-aérobiose dans le nodule mais on connaît peu de choses sur le pH du compartiment pér bactéroïdien. Il est vraisemblable que l'activité de transport, nécessitant une énergisation de la membrane pér bactéroïde par un gradient de protons, tendrait à l'acidifier.

L'une des réponses des bactéroïdes au stress acide pourrait être un changement dans la structure des LPS résultant en une adaptation des charges superficielles. L'assimilation et le métabolisme d'acides dicarboxyliques ainsi que l'excrétion d'ammoniac comme résultat de la fixation d'azote, contribueraient également à remonter le pH.

En conclusion, il apparaît que le rôle des polysaccharides de surface est constant lors de la genèse du nodule. EPS et LPS agissent de façon concomitante et permanente lors de la reconnaissance et de l'attachement des bactéries sur les racines. Puis leur rôle semble alternativement dominant. Les oligosaccharides, dérivés de l'EPS, commandent l'invasion et la formation du cordon infectieux. Ils sont également les signaux inducteurs des réactions de la plante. Les LPS interviennent un peu plus tard, comme régulateurs des conditions physico-chimiques permettant la formation, la survie et le fonctionnement des bactéroïdes. Ce schéma ne saurait pourtant être généralisé sans précautions tant les exceptions et cas particuliers abondent.

Ainsi, les travaux de WILLIAMS *et al.* (1990) puis de PUTNOKY *et al.* (1990) suggèrent que les EPS et LPS de *R. meliloti* peuvent accomplir les mêmes fonctions dans le développement nodulaire.

En fait, la symbiose étant obligatoire, tout se passe comme si les symbiontes savent adapter leurs potentialités pour réussir l'association en fonction des circonstances et conditions écologiques. Les limites de l'adaptabilité semblent plus aisées à cerner chez les *Rhizobium* que pour les *Bradyrhizobium* qui ont une spécificité d'association avec les hôtes végétaux beaucoup moins nette.

Par ailleurs, l'information transportée par un polysaccharide de surface n'est pas exclusive d'un autre type de molécule. D'autres composants peuvent avoir une fonction d'information équivalente, tel l'oligosaccharide NodRmI qui provoque spécifiquement la déformation du poil racinaire de *R. meliloti* (LEROUGE *et al.*, 1990). Il est constitué de 4-N-acétylglucosamines, liées en β -1,4, dont une est sulfatée et une autre N-acylée avec l'acide 2,9-hexadécadiénoïque.

CHAPITRE III

LES BACTERIOPHAGES DES RHIZOBIACEAE

I. - PROPRIETES GENERALES DES BACTERIOPHAGES

A. - Taxonomie

Les virus sont les entités les plus simples capables de se reproduire grâce à un mécanisme unique en Biologie. En effet, en devenant fonctionnel dans la cellule qu'il infecte, l'acide nucléique viral provoque la multiplication des virions.

Il s'agit donc du parasitisme le plus absolu.

Découverts presque simultanément par TWORT (1915) et d'HERELLE (1917), les bactériophages ou phages sont des virus bactériens. Ils possèdent un acide nucléique, ADN ou ARN mono ou bicaténaire, enfermé dans une coque protéique ou capsid. L'ensemble, ou nucléocapsid, peut posséder une symétrie cubique, hélicoïdale ou mixte. D'autres éléments : fibres, spicules, enveloppes peuvent s'y adjoindre (fig. 20).

Après quelques tentatives taxonomiques, la classification de BRADLEY (1965), renfermant 6 groupes morphologiques, est largement admise. Elle décrit des phages à queue longue, contractile ou non, à queue courte, des phages cubiques à ADN ou ARN et des phages filamenteux (fig. 21). En 1974, ACKERMAN et EISENSTARK étendent le schéma à 18 morphotypes en incluant notamment des phages pléiomorphes (groupe G) (fig. 22). A présent, l'International Committee on Taxonomy of Viruses (I.C.T.V.) reconnaît dix familles et huit genres de phages, en relation avec les types morphologiques (tab. 3). Récemment, ACKERMAN (1987) a proposé d'adjoindre le groupe F_3 constitué d'un phage filamenteux, enveloppé, à ADN bicaténaire dont l'hôte est une archaebactérie : **Thermoproteus tenax**. Les bactériophages représentent le groupe viral le plus important. ACKERMAN et DUBOW, en 1987, ont recensé 2857 descriptions morphologiques mais elles sont certainement plus nombreuses car ils sont abondants dans la nature. N'importe quel environnement contenant des bactéries recèle des quantités importantes de phages. Ainsi, ont ils été isolés à partir d'une grande diversité de milieux : air, eaux douces ou salées, égouts, sols, plantes, produits alimentaires, animaux sains ou malades et leurs déjections, etc....

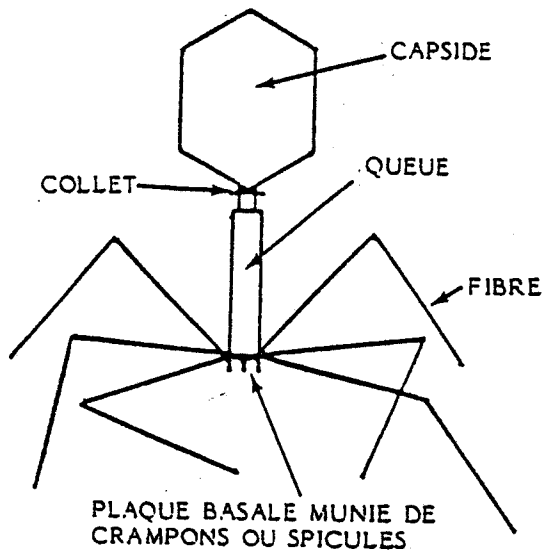


Figure 20 : Bactériophage T2 à symétrie mixte.

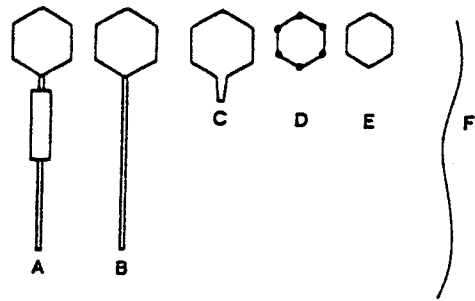


Figure 21 : Types morphologiques des phages (BRADLEY, 1965).

Morphotypes	Familles	Genres
A1, A2, A3	Myoviridae	-
B1, B2, B3	Siphoviridae	-
C1, C2, C3	Podoviridae	-
D1	Microviridae	Microvirus
D2	Non classé	-
D3	Corticoviridae	Corticovirus
D4	Tectiviridae	Tectivirus
E1	Leviviridae	Levivirus
E2	Cystoviridae	Cystovirus
F1	Inoviridae	Inovirus
F2		Plectrovirus
G	Plasmaviridae	Plasmavirus

Tableau 3 - Classification ICTV, 1982.

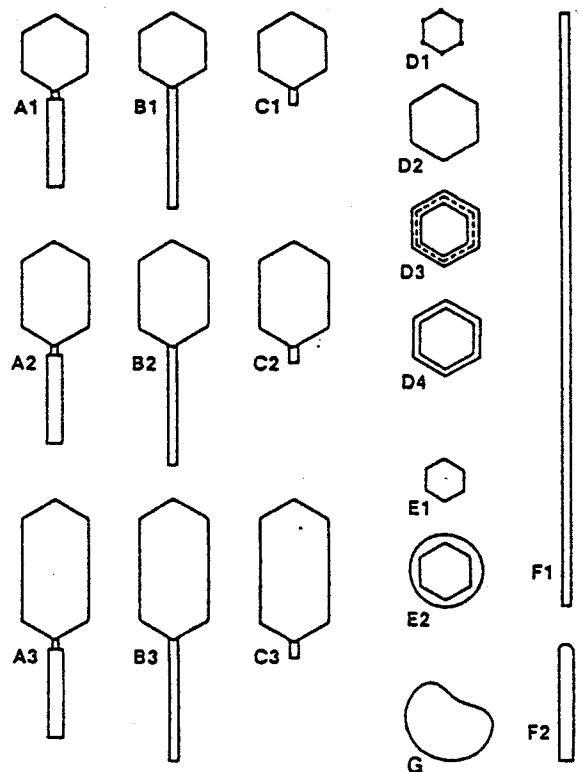


Figure 22 : Morphotypes phagiques (ACKERMAN et EISENSTARK, 1974).

B. - Nature de la relation phage-bactérie

L'interaction phage-bactérie constitue une relation hautement spécifique même à l'intérieur d'une espèce. A une souche ou un groupe de souches bactériennes donné correspond un phage ou un groupe de phages. Les relations intergénériques et même interspécifiques sont rares.

Il est commode de distinguer deux types de virus bactériens :

Les phages virulents qui ne peuvent se reproduire qu'en détruisant leur hôte. Nous en étudierons ultérieurement le cycle lytique.

Les phages tempérés qui sont en plus capables de se multiplier indéfiniment comme parasites intracellulaires, intégrés au chromosome, dans la même lignée de cellules bactériennes. Celles-ci sont dites lysogènes et le virus est un prophage qui a néanmoins gardé la capacité de redevenir virulent notamment sous l'action d'agents inducteurs. Sa présence apporte toutefois une immunité envers une surinfection par un phage identique ou étroitement apparenté. La lysogénisation peut provoquer chez l'hôte des synthèses nouvelles directement reliées à la présence du prophage. Cette conversion lysogénique intéresse essentiellement la production de toxines et d'antigènes O. Par ailleurs, certains phages peuvent transférer des gènes d'un hôte à l'autre. C'est le phénomène de transduction. Elle est dite généralisée lorsqu'elle s'effectue au hasard. Elle est spécialisée, lorsque réalisée uniquement par des phages tempérés, elle intéresse un ou plusieurs gènes déterminés.

Quelle est l'origine des phages et comment ont-ils évolué ?

Il semble admis que l'origine des phages est de nature chromosomique ou extrachromosomique bactérienne. Pourtant, leur abondance dans la nature et leur complexité structurale suggèrent qu'ils ont ensuite suivi une évolution propre (CAMPBELL, 1961). La lysogénisation et la transduction, par les recombinaisons génétiques qu'elles impliquent, peuvent réconcilier ces points de vue. En effet, un génome phagique est un épisode d'un type particulier. A l'état intégré, il se comporte comme un gène bactérien et le fait qu'un phage peut incorporer un gène bactérien revient à dire que chaque gène bactérien

peut devenir un phage. Toutefois, chaque phage contient un certain nombre de gènes intéressant des fonctions purement phagiques comme la lyse cellulaire, la production de protéines capsidaires, etc...

Il est inimaginable d'envisager qu'une combinaison fortuite de gènes dévolus à d'autres tâches puisse aboutir à ce résultat. C'est donc à ces gènes spécifiques que l'on doit attribuer une longue évolution commune acquise à la faveur de mutations ponctuelles, de réarrangements génomiques et de recombinaisons (REANNEY et ACKERMAN, 1982). Mais aussi, un gène bactérien accidentellement acquis peut apporter une fonction utile au cycle lytique tout comme des gènes phagiques, qui s'acquittent de fonctions non spécifiquement virales, peuvent être utiles à la bactérie-hôte en accroissant ses facultés d'adaptation. Chaque génome phagique peut donc être assimilé à une association symbiotique de "gènes phagiques" et de "gènes bactériens". Une sélection qui favorise exagérément la fonction virale donnera un phage virulent. A l'inverse, une évolution trop favorable aux "gènes bactériens" aboutirait à la disparition du virus par accumulation graduelle de prophages défectifs. La survie prolongée d'une espèce dépend de la présence, dans la population, d'individus qui combinent les deux fonctions (CAMPBELL, 1961).

Par ailleurs, l'évolution du phage nécessite la capacité d'établir les conditions pour maintenir longtemps une stabilité dans la taille et la composition de l'échantillon. Or, en raison de leur mode de reproduction, les populations virales et bactériennes sont interactives et la relation bactérie-bactériophage intervient dans les compétitions entre les microorganismes occupant une même niche écologique.

Le phage peut se comporter en simple prédateur. Lorsqu'il est en présence d'une bactérie homologue, leurs concentrations respectives atteignent bientôt une valeur d'équilibre. Si le phage se multiplie trop lentement, il s'éteindra, mais s'il croît trop rapidement, il maintiendra la population bactérienne à un niveau bas mais non nul. En absence de phages, l'espèce bactérienne ayant la croissance la plus rapide déplacera la plus lente. Le seul cas dans lequel la présence du phage a un net effet défavorable sur son hôte se situe lorsque les taux de croissance des souches en compétition sont rigoureusement égaux. Par contre, si l'hôte possède un avantage sélectif, même minime, l'autre compétiteur n'aura plus d'effet sur l'état d'équilibre avec le phage prédateur.

En fait, ce n'est pas si simple car les bactéries comme les phages présentent une variation continue par l'apparition d'abord de mutants bactériens résistants au phage. Cela n'aboutit pas forcément à l'élimination de ce dernier car il peut aussi muter vers une nouvelle forme à nouveau virulente. On peut ainsi envisager une série infinie d'infections d'hôtes antérieurement réfractaires suivies de l'émergence de nouveaux phénotypes bactériens. Toutefois, si l'on considère que les mutants résistants sont généralement moins bons compétiteurs que la souche parentale, ils n'altéreront pas les équilibres initiaux.

Enfin, il est évident que ces états peuvent être bouleversés par des mutations totalement indépendantes du phage, affectant l'un ou l'autre des compétiteurs.

Les phages tempérés offrent un autre cas de figure car la lysogénéisation est un moyen pour le phage de se perpétuer sans détruire son hôte. Mais on peut aussi supposer que la présence du prophage, métaboliquement inerte, rend la bactérie-hôte moins compétitive dans le sens qu'elle doit utiliser de l'énergie et des nutriments pour synthétiser un "poids mort". Par contre, elle peut acquérir un avantage sélectif incontestable si le résultat d'une conversion lysogénique ou d'une transduction permet la formation de recombinants mieux adaptés à l'environnement. Enfin, les phages tempérés peuvent engendrer des phages redevenus virulents capables de détruire les cellules lysogènes. Dans ces conditions, il va s'établir le même type d'équilibre que celui évoqué auparavant, intéressant en fait le phage tempéré et le mutant virulent, dépendant des propriétés de croissance de l'un et de l'autre et non de leur origine génétique commune.

C. - Application des bactériophages

Les phages accompagnent toujours les bactéries là où elles se multiplient. Leur présence est donc universelle et ces bactériophages sont impliqués dans un grand nombre de processus que l'on cherche à exploiter ou à éviter.

Dans le domaine médical, les phages sont utilisés pour certains diagnostics bactériologiques lorsque les méthodes d'identifications biochimiques classiques deviennent équivoques ou compliquées. La lysotypie, ou typage phagique, est

une extension de cette application. Principalement utilisée pour les bactéries pathogènes les plus importantes (**Salmonella, Pseudomonas, Staphylococcus**, etc...), elle permet des investigations épidémiologiques importantes et précises. Récemment, BLOCK *et al.* (1989) ont développé un système baptisé PHALISA (Phage linked immunoabsorbant assay) pour la détection immunologique d'antigènes immobilisés du virus **Herpes simplex** (HSV). Enfin, l'utilisation des bactériophages à des fins thérapeuthiques et prophylactiques de maladies infectieuses a été plus ou moins abandonnée avec l'ère des antibiotiques. Elle a pourtant des potentialités certaines vis-à-vis de souches bactériennes multirésistantes d'apparitions de plus en plus fréquentes. Un regain d'intérêt est survenu en France et surtout en Pologne où SLOPEK *et al.* (1987) font état de 92 % de résultats positifs sur des suppurations à Staphylocoques et à bactéries à Gram-négatif (**Klebsiella, Escherichia, Proteus, Pseudomonas**).

Dans le domaine des Biotechnologies, le Génie Génétique utilise certains phages (λ , M13, ...) comme vecteurs de clonage dans des souches bactériennes de gènes producteurs de molécules d'intérêt économique. Mais l'aspect négatif est la capacité des phages de se développer dans les cultures microbiennes industrielles. Aucune fermentation bactérienne n'est à l'abri de l'attaque des phages, les bactéries étant susceptibles d'être lysogènes et de libérer des virus infectieux. Ainsi, NEL *et al.* (1987) ont isolé des bactériophages de **Leuconostoc oenos** qui perturbent la fermentation malolactique du vin. D'autres arrêts de production ont été observés dans la fabrication du vinaigre d'alcool (TEUBER *et al.*, 1987 ; STAMM *et al.*, 1989 ; DEFIVES *et al.*, 1990) et de l'acide gluconique (WERQUIN *et al.*, 1984a). Toutefois, l'industrie laitière est la plus exposée et les problèmes posés par le rôle destructeur des phages sont sans commune mesure avec les autres industries de fermentation. Les ferments lactiques des starters indispensables à la fabrication sont des cibles privilégiées (MULLEN, 1986) et les phages seraient responsables de 98 % des avaries (MOSELEY *et* WINSLOW, 1959). La méthode la plus répandue pour réduire les problèmes phagiques, dans l'industrie d'aliments fermentés, est la rotation des souches, associée à une hygiène très stricte. On utilise chaque jour une souche différente insensible aux phages présents. Après environ 8 jours, les phages de la première souche ont presque disparu ; on peut donc la réutiliser et le cycle recommence. Toutefois, les stratégies modernes en industrie laitière visent à la construction de souches possédant

des mécanismes de défense au phage, le plus souvent codés par des plasmides (JARVIS *et al.*, 1989), associant la restriction-modification, le défaut d'adsorption du phage (KLAENHAMMER, 1987), l'infection abortive (GAUTIER *et* CHOPIN, 1987 ; HILL *et al.*, 1989).

Dans l'environnement, les phages sont susceptibles d'intervenir dans les cycles biologiques où sont impliqués leurs hôtes. Le rôle, difficile à cerner, est controversé. D'aucuns tendent à lui donner trop d'importance, d'autres à le minimiser radicalement. Signalons pourtant que OGATA *et al.* (1980) ont constaté une diminution du pouvoir purificateur des boues activées d'une station d'épuration en raison d'une perturbation de la flore bactérienne normale, probablement causée par une infection phagique abondante.

Enfin, les bactériophages peuvent être utilisés comme marqueurs biologiques permettant d'évaluer la pollution microbienne (WHEELER *et al.*, 1988), de suivre l'évolution hydrogéologique de nappes aquifères (SKILTON *et* WHEELER, 1988, 1989), d'apprécier l'efficacité du traitement des eaux sur les virus en postulant que la présence de coliphages reflète une contamination fécale et donc la présence possible de virus d'hépatites et de gastro-entérites difficiles à mettre en évidence. L'inactivation des phages est un indicateur valable de l'efficacité du traitement de l'eau (HAVELAAR, 1987).

Nous discuterons, ultérieurement, de l'influence des phages sur la rhizosphère des Légumineuses et la symbiose.

D. - Multiplication des phages : le cycle lytique

Le cycle lytique des bactériophages virulents peut se décomposer en trois phases : l'adsorption et infection, l'éclipse, la maturation et la libération des virions. En raison de la nature de nos travaux, nous envisagerons plus précisément la phase d'adsorption.

1 - Adsorption et infection

La rencontre entre les phages et les bactéries se fait au hasard, mais plus leurs concentrations respectives sont élevées, plus les chances de collisions

sont grandes. L'adsorption dépend aussi de cofacteurs variables selon les phages. Les cations, tels que le calcium et le magnésium, sont les plus fréquents. Cet attachement est hautement spécifique grâce à la concordance entre les sites bactériens et viraux. La fixation, d'abord réversible, devient rapidement définitive en raison de la modification structurale des structures réceptrices.

a) Les sites d'adsorption

α) Sur les phages

La grande majorité des phages caudés se fixent par l'intermédiaire de leurs fibres caudales et/ou des crampons de la plaque basale. Les phages sans queue s'adsorbent par leurs fibres apicales ou leur enveloppe.

β) Sur les bactéries

- Lipopolysaccharides

Ils sont souvent impliqués dans l'adsorption à la surface des bactéries à Gram-négatif.

Les phages de *K. pneumoniae* C3 (TOMAS et al., 1987 ; BENEDI et al., 1988) et le phage CP-T1 de *Vibrio cholerae* (GUDOLIN et MANNING, 1985) utilisent l'antigène O. Par contre, le coliphage ϕ X174 utilise le "core" (FEIGE et STIRM, 1976). De même, de nombreux phages de *P. aeruginosa* ont une large spécificité d'hôte et peu d'affinité avec l'antigène O, suggérant que leur site d'adsorption se situe dans le "core" (TEMPLE et al., 1986).

Les LPS peuvent assurer à eux seuls la fonction réceptrice. Toutefois, les phages les plus évolués d'*E. coli* exigent une association avec des protéines.

Ainsi, les LPS isolés d'*E. coli* B inactivent le phage T4 alors que ceux d'*E. coli* K12 ne peuvent le fixer qu'associés au polypeptide Ib de la membrane externe (MUTOH et al., 1978). On trouve encore une combinaison nécessaire avec la protéine Ompc pour adsorber le phage Tu1b mais la totalité de la molécule de LPS participe à l'accrochage (YU et al., 1981).

Les phages caudés d'Entérobactéries, trouvant leurs récepteurs dans l'antigène O, ont souvent une activité endolytique réalisée par des enzymes associées à la plaque basale. Le phage P22 de *S. typhimurium* possède une endorhamnosidase (ERIKSSON *et al.*, 1979) tandis que le $\Phi 1(40)$ de *S. johannesburg* a une endo 1,3-N-acétylgalactosaminidase (CHABY et GIRARD, 1980). Chez le phage c341 de *Salmonella*, il s'agit d'une estérase qui enlève les substituants O acétylés sans lesquels le phage ne peut s'adsorber. Cette déacétylase, localisée dans la plaque basale, est hautement spécifique de son substrat (IWASHITA et KANEGASAKI, 1976).

Dans tous les cas, la reconnaissance du site récepteur et l'adsorption se réaliseraient par la formation d'un complexe du type substrat-enzyme.

- Polysaccharides capsulaires et extracellulaires

Ils inactivent les bactériophages mais le plus souvent ils ne constituent pas les véritables récepteurs. En effet, si les mutants ne produisant pas de polysaccharides sont résistants au phage, l'interaction *in vitro* phage-polysaccharide ne provoque pas l'éjection de l'ADN. Il y a donc un autre récepteur masqué par le polysaccharide. Pour l'atteindre, le phage a recours à une dépolymérase qui lui permet de se frayer une voie à travers la couche osidique. Auparavant, il a reconnu l'EPS et s'y est attaché par ses spicules caudales.

Les dépolymérases sont donc fréquentes chez les phages infectant des bactéries capsulées. Il s'agit d'endoglycannases existant communément sous deux formes indifférenciables : l'une liée au virus, l'autre soluble. Par contre, la dépolymérase de la capsule d'*Erwinia amylovora* est produite par la bactérie infectée par le phage ERA103 et n'est pas associée à la particule virale (VANDENBERG *et al.*, 1985).

Ces enzymes sont spécifiques d'un type de liaison. Aussi, une enzyme produite par un système phage/bactérie peut agir sur des substrats synthétisés par des bactéries d'espèces différentes, dans lesquelles le phage ne peut pas se multiplier, pourvu qu'elle trouve un site enzymatique convenable. Par exemple, l'enzyme du phage K2 de *K. aerogenes* clive les liaisons gal $\xrightarrow{\alpha-1,3}$

gal (YUREWICZ *et al.*, 1971), le coliphage 44 a une activité N-acétyl- β -D-galactosaminidase (DUTTON *et al.*, 1988) et les phages Φ 95 et Φ 1092 dégradent les capsules d'*E. coli* contenant du KDO (ALTMANN *et al.*, 1987).

Les oligosaccharides libérés sont constitués d'une ou plusieurs unités de répétition du polymère. Cette propriété est utilisée pour l'établissement de la séquence osidique (DUTTON et KARUNARATNE, 1985).

- Protéines

Le récepteur du phage λ est une protéine majeure de la membrane externe, LamB, impliquée dans le transport du maltose chez *E. coli* K12 (SZMELCMAN et HOFNUNG, 1975) mais la fonction réceptrice n'est complète que lorsque l'association des protéines avec les LPS confère une structure très ordonnée à la surface cellulaire (YAMADA *et al.*, 1981). La protéine mineure TonA, participant au transport du fer, est utilisée comme récepteur par les coliphages T2, T5 et Φ 80 (BRAUN *et al.*, 1973). Les protéines de la couche S de *Bacillus sphaericus* fonctionnent comme le site d'attachement de bactériophages (LEWIS et YOUSTEN, 1988).

Enfin, signalons le virus P1 de *Mycoplasma pulmonis* qui s'adsorbe sur l'antigène V-1 de surface (DYBVIK *et al.*, 1988).

- Peptidoglycane et molécules associées

La muréine pariétale est fréquemment utilisée dans l'adsorption sur les bactéries à Gram-positif. Ainsi, sa fraction osidique est étroitement reliée à cette fonction chez *Clostridium botulinum* type A190L (TAKUMI *et al.*, 1985). L'adsorption du phage 52A de *Staphylococcus aureus* exige la muréine et les acides téichoïques. La déacétylation de la N-acétyl-glucosamine interdit sa réception (SHAW et CHATTERJEE, 1971).

- Pili et flagelles

L'attachement sur un pilus ou un flagelle n'est qu'une étape intermédiaire avant l'adsorption finale sur un récepteur de la surface cellulaire. La

rétraction du pilus amène le phage au site d'infection (ACKERMANN et DUBOW, 1987). L'accrochage sur un flagelle est suivi d'une descente du phage jusqu'à la base. Ainsi, le bactériophage PBS1 de *B. subtilis* enroule ses fibres caudales autour d'un flagelle fonctionnel ou non. Cet attachement n'est pas spécifique et peut se produire sur d'autres espèces. La descente rapide du phage nécessite cependant le mouvement flagellaire (WILSON et TAKAHASHI, 1978).

b) L'infection

Le processus infectieux des bactériophages est mal connu. Les premières étapes qui précèdent l'injection de l'ADN du phage T4 dans la cellule d'*E. coli* sont pourtant bien caractérisées : les fibres de la queue du phage s'attachent aux récepteurs, la membrane externe est localement déstructurée par des enzymes phagiques, la queue se contracte, le tube interne traverse l'enveloppe bactérienne dans cette zone de moindre résistance et l'ADN est éjecté de la capsid. Chez les phages non caudés, des protéines apicales assurent l'adsorption et guident la pénétration de l'ADN.

La capsid reste à l'extérieur de la bactérie.

Mais comment une grosse molécule hydrophile comme l'ADN traverse-t-elle la membrane cytoplasmique ?

L'analyse des flux potassiques au début de l'infection soutient l'hypothèse d'un transport par un canal semblable à ceux utilisés pour le passage des ions. Le phage induit l'ouverture d'un pore, le flux d'ions dépolarise la membrane, permettant le passage de l'ADN. Cet état est transitoire, le pore se referme après l'introduction de l'acide nucléique (BOULANGER et LETELLIER, 1988). Ce modèle pourrait aussi s'adapter aux autres phages cubiques à queue non contractile dont les mécanismes d'infection sont obscurs.

Toutefois, le cystovirus $\phi 6$, à ARN bicaténaire, présente un cas particulier. Il s'accroche à un pilus de *P. syringae* dont la rétraction l'amène au contact de la membrane externe. Celle-ci fusionne avec l'enveloppe lipidique du phage (BAMFORD et al., 1987). Il semble ensuite que la nucléocapsid traverse la membrane cytoplasmique par une invagination et formation d'une vésicule

intracellulaire. La pénétration demande une énergisation de la membrane. La nucléocapside est enfin dégradée pour permettre la libération de l'ARN (ROMANTSCHUK *et al.*, 1988).

2 - Phase d'éclipse

Cette période, de durée variable selon les espèces bactériennes, est caractérisée par de nombreuses synthèses virales sans virions visibles. Après destruction du chromosome bactérien, les structures cellulaires restent fonctionnelles et sont utilisées pour la fabrication des éléments du phage. Dans le cas d'un phage à ADN, les premières molécules à apparaître sont des ARN messagers correspondant à des protéines précoces nécessaires à la réplication du génome viral en de multiples copies. Puis les protéines de structure sont synthétisées. Les constituants du phage s'accumulent séparément.

Dans le cas d'un phage à ARN, l'acide nucléique, dans un premier temps, sert de messenger pour la synthèse des enzymes qui produiront de nouvelles chaînes d'ARN, en utilisant le génome initial comme matrice, et les protéines de la capsid.

3 - Maturation et libération

La maturation correspond à la morphogénèse des virions. Celle des phages T-pairs d'*E. coli* est la plus connue. Ainsi, chez le phage T4, l'assemblage final se réalise à partir de sous-assemblages séquentiels intéressant les fibres caudales, la queue et la tête qui englobe l'ADN au cours de sa construction (LAEMMLI et FAVRE, 1973).

L'encapsidation de l'ADN bicaténaire ne se réalise pas de façon désordonnée sinon il ne pourrait pas être ensuite injecté à une bactérie sans se nouer. L'emballage par enroulement toroïdal (EARNSHAW et HARRISON, 1977) ou par pliage alternatif du chromosome (SERWER, 1986) ne sont pas des modèles totalement satisfaisants. Ainsi, LEPAULT *et al.* (1987), à partir d'observations microscopiques sur le phage λ , pensent qu'au fur et à mesure de son entrée, l'ADN subit un réarrangement continu pour aboutir à la formation de cristaux liquides nématiques orientés par les parois de la capsid.

Les têtes ainsi remplies ne sont pas stables. Chez le phage P22, l'adjonction de l'appareil d'injection stabilise les molécules. En son absence, les capsides peuvent perdre leur ADN (STRAUSS et KING, 1984).

Enfin, les phages sont libérés par lyse de la cellule-hôte chez les phages caudés et cubiques, par extrusion chez les phages filamenteux et par bourgeonnement chez les plasmovirus. Dans ces deux derniers cas, l'hôte survit à l'infection.

E. - Une alternative au cycle lytique : la restriction-modification

I - Définitions

L'étude de la relation bactérie-bactériophage a conduit à la découverte du phénomène de Restriction-Modification contrôlée par l'hôte (R.M.).

La R.M. a été décrite pour la première fois par LURIA et HUMAN (1952) pour les phages T-pairs et par BERTANI et WEIGLE (1953) pour les phages λ et P2.

Les critères ont été précisés par LURIA (1953). Ils sont schématisés dans la figure 23.

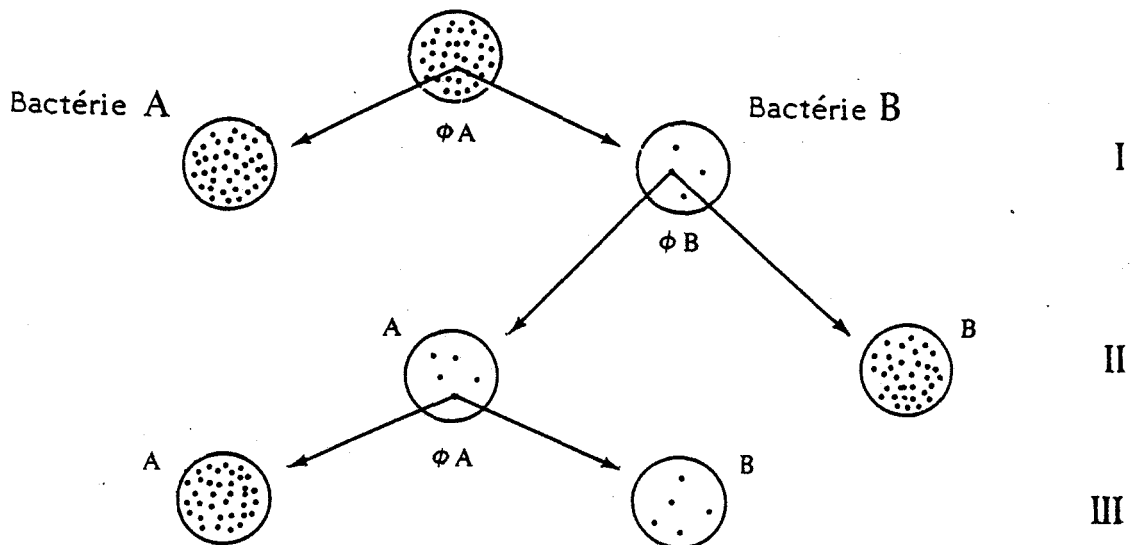


Figure 23 - Schéma de la démonstration de la R.M. d'un phage.

Si un lysat d'un bactériophage ΦA provenant d'une souche bactérienne A, est utilisé pour infecter une autre souche B de la même espèce, l'efficacité de la croissance sur cette seconde souche peut être très inférieure à ce qu'elle est sur la souche A. Ceci se concrétise par l'obtention de plages de lyse beaucoup moins nombreuses (fig. 23, I). Les phages survivants ΦB peuvent se multiplier abondamment sur la souche B tandis que leur croissance est cette fois restreinte par la bactérie A (fig. 23, II). Le cycle peut recommencer (fig. 23, III). La restriction de la croissance du phage dépend donc de son dernier hôte et elle disparaît après un cycle de croissance sur le nouvel hôte. Il ne s'agit pas d'un processus de nature génétique mais d'une altération de l'ADN du bactériophage comme il a été initialement démontré pour les phages T1 (CHRISTENSEN, 1961), λ (ARBER et DUSSOIX, 1962) ou encore ϵ^{15} de *S. anatum* (UETAKE et al., 1964).

La dégradation de l'ADN du virus infectant est l'oeuvre d'une endonucléase bactérienne spécifique (restriction). La modification, qui permet la survie d'un petit nombre de phages, résulte de l'action d'une méthylase qui protège les sites de restriction (BOYER, 1971).

Evidemment, ce phénomène n'affecte pas uniquement le génome phagique mais il concerne tout ADN étranger introduit dans une bactérie, par conjugaison ou transformation. Le système R.M. peut être considéré comme un mécanisme de défense et de reconnaissance du "soi", c'est-à-dire du patrimoine génétique de l'espèce.

2 - Distribution des systèmes R.M.

Les systèmes R.M. sont, jusqu'à maintenant, l'exclusivité des Procaryotes où ils sont d'ailleurs toujours naturellement présents. Ainsi, ils ont été mis en évidence non seulement chez de très nombreuses Eubactéries même d'identification récente telles que les *Legionellae* (CHEN et al., 1988) mais aussi chez des Archéobactéries comme *Methylophilus methylotrophus* (BOYD et al., 1986) et *Sulfolobus acidocaldarius* (PRANGISHVILI et al., 1985), des bactéries phototrophes telles que *Anabaena flos-aquae* (WHITEHEAD et BROWN, 1985) et *Spirulina platensis* (KAWAMURA et al., 1986), des mycoplasmes (SLADEK et al., 1986).

Une compilation complète des endonucléases et méthylases connues, réalisée en 1986 par KESSLER et HÖLTKE, regroupait 658 enzymes dont 82 méthylases. Mais plus de 500 nouvelles endonucléases ont été répertoriées, uniquement en 1989 et 90 (ROBERTS, 1989, 1990).

Les systèmes R.M. peuvent être détectés par les critères biologiques que nous venons d'évoquer mais aussi par des méthodes biochimiques de purification des enzymes de restriction (GREENE *et al.*, 1978), de digestions enzymatiques et d'électrophorèse en gel d'agarose (AAIJ et BORST, 1971).

L'information génétique des systèmes R.M. est portée par des gènes chromosomiques mais souvent aussi par des épisomes tels que les facteurs R des *Enterobacteriaceae* (WATANABE *et al.*, 1966) et de *Pseudomonas* (JACOBY et SUTTON, 1977, 1982), les plasmides des Streptocoques lactiques (KLAENHAMMER, 1987) ou des virus tempérés comme le coliphage P1 (LEDERBERG, 1957) et le rhizobiophage Φ M11 (SAHIM, 1983). Une bactérie peut donc posséder plusieurs systèmes dont les effets sont additifs.

3 - Les enzymes

a) Généralités

Les enzymes de restriction sont des endodéoxyribonucléases qui coupent des ADN bicaténaires après reconnaissance de séquences nucléotidiques spécifiques. La coupure se fait par rupture d'une liaison phosphodiester à l'intérieur de chaque brin d'ADN. La première endonucléase de restriction a été isolée par MESELSON et YUAN (1968) chez *E. coli* K mais rapidement de nombreuses enzymes ont été caractérisées appartenant à d'autres souches d'*E. coli* (ESKIN et LINN, 1972 ; CHEN KAN *et al.*, 1979) et d'*Haemophilus* (SMITH et WILLCOX, 1970 ; BRZEZINSKI et PIEKAROWICZ, 1982).

Les enzymes de modification sont des méthyl-transférases qui agissent sur des bases nucléiques incluses dans la séquence de reconnaissance de l'endonucléase. Les bases communément méthylées sont l'adénine qui forme la N-méthyladénine (6-MAP) ou la cytosine qui forme la 5-méthylcytosine (5-MC). Ces enzymes produisent deux résidus méthylés par site. Dans tous les

cas, la S-adenosylméthionine (SAM ou AdoMet) fournit les radicaux méthylés (NATHANS et SMITH, 1974).

Par immunomicroscopie électronique, les endonucléases ont été localisées dans l'espace périplasmique et les méthylases dans le cytoplasme d'*E. coli* (KOHRING et al., 1985, 1987).

b) Nomenclature

En raison de la multitude de microorganismes possesseurs de ces enzymes, il a vite paru nécessaire d'établir des règles générales d'identification des systèmes R.M.

En 1973, SMITH et NATHANS ont proposé les bases d'une nomenclature universellement adoptée :

- la première lettre du genre, en majuscule, et les deux premières lettres de l'espèce, en italiques, identifient la bactérie. L'indication de la souche suit cette abréviation :

ex. : *E. coli* K : EcoK
H. influenzae d : Hind

- si le système est génétiquement relié à un phage ou un plasmide, le nom abrégé de celui-ci suit les trois lettres :

ex. : EcoRI pour le plasmide RI
EcoPI pour le phage PI

- si la souche contient plusieurs systèmes R.M., ils sont identifiés par des chiffres romains :

ex. HindI, HindII, HindIII

- toutes les enzymes de restriction ont pour appellation générale : endonucléaseR, et les enzymes de modification : méthylaseM ; additionnés du nom du système :

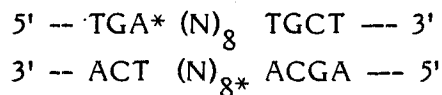
ex. endonucléase R.EcoB, en abrégé, endo R.EcoB
 méthylase M.EcoB, en abrégé, méth M.EcoB

On distingue actuellement trois groupes d'enzymes de R.M., en fonction de leurs propriétés.

c) Enzymes de type I

Historiquement, ce sont les premiers systèmes qui ont été caractérisés. Les enzymes de type I forment un complexe multifonctionnel combinant le clivage de l'ADN, l'hydrolyse de l'ATP, la méthylation de l'ADN et des activités topoisomérasiques. Elles exigent des cofacteurs : ATP, magnésium, SAM (YUAN, 1981). Le site reconnu n'a pas de symétrie apparente, il est discontinu, formé par deux séquences spécifiques de 3-4 paires de bases (p.b.) séparées par une région non spécifique de 6-8 p.b. :

Ex. EcoB :



* bases méthylables

Après avoir reconnu le site spécifique, le complexe de type I coupe l'ADN à une distance de 400 à 7 000 p.b. Pour une même enzyme, le lieu de la coupure est donc aléatoire. Il semble qu'il se forme une boucle d'ADN, ce qui expliquerait que le clivage s'effectue loin du site de fixation (BICKLE, 1982).

Les systèmes de type I sont codés par trois gènes : hsdS, hsdR, hsdM. HsdS est responsable de la reconnaissance du site, hsdM et hsdS sont nécessaires pour la modification, les trois gènes sont nécessaires pour la restriction. Sur des critères génétiques et immunologiques, ils ont été divisés en deux familles distinctes, type IA et type IB. Plus récemment, une troisième famille, type IC, codée par le plasmide R124 et son dérivé R124/3 a été mise en évidence chez *E. coli* (PRICE et al., 1987).

d) Enzymes de type II

Ces enzymes sont largement employées en Génie Génétique pour construire des ADN hybrides car elles coupent l'ADN bicaténaire, non modifié, à des positions déterminées.

Le seul cofacteur exigé est le magnésium. La majorité de ces enzymes reconnaissent des sites caractérisés par une symétrie rotationnelle. Ce sont des palindromes de 4 à 6 p.b. le plus souvent mais aussi de 8 p.b. pour des enzymes découvertes récemment :

ex. : EcoRI : 5'-CTT | AAG
 3'-GAT | TCC

BsuR : 5'-CC | GG
 3'-GG | CC

NotI : 5'-GCGG CCGC
 3'-CGCC GGCG

Toute séquence tétranucléotidique se produit, au hasard, une fois pour 256 p.b. et une séquence hexanucléotidique, une fois pour 4096 p.b.

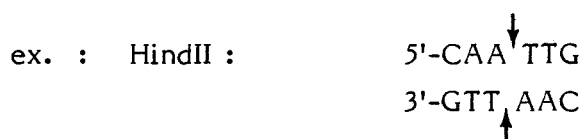
Un certain nombre de séquences comportent des zones ambiguës où quelques bases ne sont pas exactement définies.

Enfin, certaines enzymes reconnaissent des palindromes interrompus par 1 à 6 nucléotides quelconques, où encore des séquences non palindromiques :

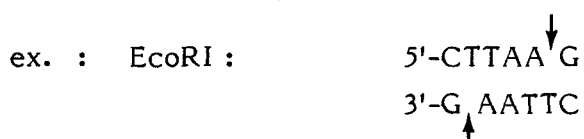
ex. : BglI : 5'-GCC(N)₅GGc
 3'-EGG(N)₅CCG

BsmI : 5'-GAATGC
 3'-CTTACG

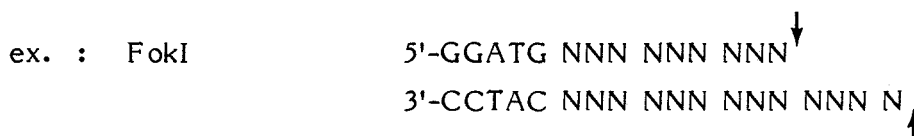
Le site de clivage est situé dans la séquence de reconnaissance ou immédiatement à côté. Les coupures peuvent s'effectuer au même niveau sur les deux brins, au centre de la séquence, donnant des extrémités franches :



Lorsque les coupures sont décalées dans les deux brins, par rapport à l'axe de symétrie, on obtient des extrémités dites cohésives car chaque fragment possède une courte séquence monocaténaire qui peut facilement s'apparier avec une séquence complémentaire, les liaisons covalentes étant rétablies par l'action d'une ligase :



Toutefois, les enzymes de la classe IIS sont un peu différentes car elles coupent les ADN à une distance précise de la séquence de reconnaissance. Le nombre de nucléotides n'est pas obligatoirement identique sur chaque brin, créant ainsi des extrémités cohésives :



Une nouvelle classe, IIQ, comporte deux enzymes de *Bacillus* clivant à l'intérieur de séquences non-palindromiques (DEGTYAREV *et al.*, 1990).

Certaines enzymes sont des isoschizomères. Provenant d'espèces bactériennes différentes, elles ont le même site de reconnaissance mais ne produisent pas les mêmes coupures ou bien ont des sensibilités variables à la méthylation.

D'autres enzymes reconnaissent des sites différents mais engendrent des extrémités cohésives identiques. On peut ainsi les classer en familles.

Le déterminisme génétique des systèmes R.M. de type II est relativement simple puisque deux gènes codent pour deux protéines : l'endonucléase et la méthylase.

e) Enzymes de type III

On ne connaît actuellement que trois enzymes de type III codées par le prophage P1 d'*E. coli* (HABERMAN, 1974), le plasmide P15 d'*E. coli* (YUAN et REISER, 1978) et le chromosome d'*H. influenzae* Rf (BRZEZINSKI et PIEKAROWICZ, 1982).

Comme les enzymes de type I, ce sont des protéines multifonctionnelles pouvant catalyser à la fois le clivage de l'ADN et la méthylation. Elles requièrent l'ATP et le magnésium, la SAM a un rôle d'effecteur allostérique.

Ces enzymes de type III reconnaissent une séquence de 5 à 6 p.b. et coupent l'ADN 25 à 27 p.b. plus loin vers l'extrémité 3' du site.

f) Antirestriction

Les bactériophages ont su développer des stratégies de défense contre la restriction de l'hôte (KRÜGER et BICKLE, 1983). Des mécanismes d'antirestriction ont été trouvés chez pratiquement chaque phage étudié.

Toutefois, les plus connus, utilisés par les phages d'*E. coli* et *B. subtilis*, sont les suivants :

- inhibition des enzymes de restriction par des protéines virales ;
- le phage produit une enzyme de modification ;
- le phage stimule la modification contrôlée par l'hôte ;
- l'ADN phagique contient des bases inhabituelles ;
- le phage co-injecte son ADN et des protéines d'antirestriction ;
- le phage injecte son ADN en deux temps.

Par ailleurs, une évolution moléculaire du bactériophage tend à effectuer une sélection contre les sites de reconnaissance des enzymes de restriction de l'hôte (SHARP, 1986).

II. - LES PHAGES DE RHIZOBIACEAE

A. - Caractérisation

En 1987, ACKERMANN et DUBOW ont recensé 101 phages de **Rhizobiaceae**. Tous sont caudés, appartenant aux groupes A, B, C de BRADLEY. Ils contiennent un ADN bicaténaire. Il en est de même des phages décrits ensuite, parasites des microsymbiontes du Pois chiche (DHAR et RAMAKRISHNA, 1987), du Soja (WERQUIN *et al.*, 1987) et de Légumineuses à croissance rapide (DHAR *et al.*, 1987 ; STANIEWSKI, 1987).

Les propriétés générales de ces phages, adsorption, résistance aux agents physico-chimiques, etc..., ne présentent pas de singularités essentielles. Pour ce qui concerne **R. meliloti**, KRSMANOVIC-SIMIC et WERQUIN, en 1973, ont isolé 8 phages telluriques, répartis en quatre morphotypes. Simultanément, MARANTZ *et al.* (1973) décrivent 17 phages dont 11 proviennent de cultures bactériennes lysogènes. En 1988, WERQUIN *et al.* étudient 32 bactériophages de **R. meliloti**. 21 sont isolés de champs de Luzerne du Nord de la France, les 12 autres sont obtenus par induction aux rayons ultra-violetts ou à la mitomycine C de 46 souches bactériennes. Les cinq morphotypes distingués appartiennent aux **Myoviridae**, **Siphoviridae** et **Podoviridae**.

Les profils de restriction et l'hybridation ADN-ADN montrent que les génomes des trois genres ne sont pas apparentés.

Le type NM1 (**Siphoviridae**) présente une morphologie inhabituelle par la présence de barres transversales sur la queue non contractile, tandis que le phage Φ M11S (**Siphoviridae**) ne correspond à aucun autre phage de **Rhizobium** décrit et représente une nouvelle espèce.

Il est remarquable de constater que tous les phages du sol possèdent une queue contractile et une large spécificité d'hôte, tandis que la plupart des tempérés ont une longue queue non contractile et une spécificité relativement étroite.

Enfin, cinq autres phages apparentés à NM1 ont été étudiés ultérieurement (WERQUIN *et al.*, 1989).

B. - Adsorption et activités enzymatiques associées

Les récepteurs usuels à la surface des bactéries à Gram négatif sont utilisés par les rhizobiophages, en fonction des espèces.

Chez *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, ATKINS et HAYES (1972) ont constaté des altérations dans les LPS et les lipoprotéines des souches sur lesquelles les phages s'adsorbent peu. ZAJAC *et al.* (1975) ont montré que les LPS de la souche 24SM constituent les récepteurs du phage IP. Les macromolécules doivent être intactes, la fraction polysaccharidique et le lipide A séparés sont inactifs (ZAJAC, 1987). Par ailleurs, les groupements O-acétylés sont indispensables et le phage IP déacétyle le récepteur durant son action (ZAJAC et LORKIEWICZ, 1983). Les EPS bactériens n'inactivent pas le phage (ZAJAC, 1988). GLOWACKA *et al.* (1989) ont également mis en évidence des mutants "rough" de la souche AR182, résistants aux phages.

Chez *R. meliloti*, UGALDE *et al.* (1986) ont observé que la sensibilité au phage ϕ 16B est associée à un polysaccharide antigénique contenant du galactose et de l'acide galacturonique.

Le phage ϕ 16-12-1 de *B. sp.* (*lupini*) est pilus-dépendant. Après l'attachement, le pilus se rétracte, amenant le phage vers un récepteur spécifique (LOTZ et PFISTER, 1975). Quant au phage ϕ 7-7-1, il réalise une adsorption spécifique mais réversible sur un flagelle puis il descend le long de celui-ci jusqu'à un récepteur final situé près du site d'insertion flagellaire (LOTZ *et al.*, 1977).

B. japonicum D211 et son phage M1 s'attachent par l'intermédiaire des exopolysaccharides. Une dépolymérase, composante du phage, semble impliquée dans l'interaction avec le récepteur (DANDEKAR et MODI, 1978). Par contre, STACEY *et al.* (1984) ne constatent aucune inactivation du phage TN1 par les CPS de *B. japonicum* 3 I 1b 110. Leurs résultats suggèrent que les récepteurs sont localisés dans les LPS.

Même s'ils ne constituent pas de véritables récepteurs, les EPS de *Rhizobium* peuvent aussi participer à la relation phage-bactérie. Ainsi, des enzymes associées aux bactériophages CT3 et NT1 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

peuvent dépolymériser les EPS de la majorité des souches de cette espèce mais, en général, elles ne peuvent pas attaquer les EPS de **R. meliloti** et de **Bradyrhizobium**. Le calcium et le magnésium sont indispensables à l'activité enzymatique. La dépolymérisation de l'EPS semble nécessaire mais pas suffisante pour le processus d'infection (BARNET et HUMPHREY, 1975). La dépolymérase du phage 4S de **R. leguminosarum** bv. **trifolii** est induite dans la cellule bactérienne à la suite de l'infection par le phage virulent. Elle ne peut pas hydrolyser les EPS de **Rhizobiaceae** qui ne contiennent pas d'acide glucuronique. La réaction est inhibée par l'EDTA mais cet effet est abrogé par le calcium ou le magnésium. Il est donc raisonnable de considérer que cette enzyme, PDI, appartient au groupe des métalloenzymes. Elle a un poids moléculaire de 440 000, un pH optimum à 6,8 (HIGASHI et ABE, 1978).

Une seconde enzyme, PDII, a été mise en évidence dans le lysat du phage BY15. Ses caractéristiques sont voisines de la précédente mais elle a un poids moléculaire un peu plus élevé (540 000) et un pH optimum de 5,4. Elle est inhibée réversiblement par le magnésium et l'EDTA.

Les deux enzymes sont des lyases qui agissent par β -élimination d'un résidu d'acide uronique avec perte concomitante de l'ose substituant le carbone 4. PDI peut dépolymériser complètement les EPS et CPS de **R. leguminosarum** bv. **trifolii** mais PDII ne peut dégrader complètement que des substrats déacétylés. Par ailleurs, l'analyse des produits de dépolymérisation montre que PDI clive le substrat en des sites proches des extrémités de la chaîne tandis que PDII réalise des coupures internes au hasard (HOLLINGSWORTH et al., 1984).

Les oligosaccharides produits par ces dépolymérases sont plus aisés à utiliser que les macromolécules pour l'analyse structurale (AMENURA et al., 1983) mais ils ont aussi une activité biologique liée à la symbiose (SHERWOOD et al., 1981 ; ABE et al., 1984).

C. - Rôles des rhizobiophages

1 - Transduction

Réalisée pour la première fois chez *R. meliloti* par KOWALSKI (1967), la transduction a surtout été utilisée pour l'analyse génétique de cette espèce. Elle a permis le transfert de gènes d'auxotrophie et de caractères de résistance (KOWALSKI, 1970 ; HASSANI, 1983 ; FINAN *et al.*, 1984 ; MARTIN *et* LONG, 1984). La cotransduction de la capacité de fixer l'azote n'a été réussie qu'une fois, en 1972, par KOWALSKI *et* DENARIE.

Du point de vue de l'étude et du transfert des gènes symbiotiques, la méthode semble infructueuse. Un cas de transduction spécifique du marqueur Cys, à l'aide du phage 16-3 a été mentionné (SVAB *et al.*, 1978). Chez d'autres *Rhizobiaceae*, la transduction a été utilisée pour l'établissement de la carte génétique de *R. leguminosarum* (BUCHANAN-WOLLASTON, 1979) et le transfert de résistance aux antibiotiques chez *B. japonicum* D211 (SHAH *et al.*, 1981) dans le but d'une étude génomique.

Toutefois, la transduction pourrait être utilisée en Génie Génétique. DORGAI *et al.* (1981, 1986) ont étudié le génome du phage tempéré 16-3 de *R. meliloti* pour obtenir un vecteur de clonage. Par ailleurs, WERQUIN (1989) a constaté que certains phages tempérés de *R. meliloti* possèdent des ADN de 30-50 Kb (PM : $20-35 \cdot 10^6$ daltons). Ces valeurs sont proches de celles des phages transducteurs connus et permettent d'espérer l'utilisation de ces virus comme vecteurs de segments d'ADN.

2 - Lysogénie

La lysogénisation de 25 souches de *R. meliloti* a modifié la sensibilité aux phages des bactéries-hôtes. Ces variations ne sont pas dues au phage lysogénisant mais au mode de simple ou double infection (STANIEWSKI *et* KOWALSKI, 1965). BARNET *et* VINCENT (1970) ont aussi démontré qu'une conversion lysogénique intéresse l'aptitude à adsorber les phages chez *R. leguminosarum* bv. *trifolii* SU297. La modification d'un antigène somatique ne permet plus l'accrochage. Enfin, une souche de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

est devenue anodulante, par perte de son plasmide symbiotique lors de la lysogénéisation (UCHIUMI *et al.*, 1989). Le mécanisme moléculaire du curage plasmidique n'est pas complètement élucidé. Il pourrait s'agir d'une incompatibilité entre les deux ADN.

3 - Lysotypie

La lysotypie a été utilisée depuis longtemps pour tenter de distinguer les bactéries infectant les différentes Légumineuses (STANIEWSKI, 1980) mais également pour séparer les biotypes et mutants divers au sein d'une même espèce, en particulier après réisolement à partir de nodosités racinaires, principalement chez *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (STANIEWSKI *et al.*, 1973) et *R. meliloti* (LESLEY, 1982). Ces systèmes de typage peuvent s'avérer utiles dans les contrôles expérimentaux de souches indigènes ou sélectionnées pour la nodulation des plantes (BROMFIELD *et al.*, 1987).

4 - Les phages et la symbiose

La détection des rhizobiophages dans le sol et leur rôle dans la symbiose sont l'objet de résultats contradictoires et donc d'interprétation controversée.

GOLEBIEWSKA *et al.* (1976) indiquent que les phages de *R. meliloti* ne se trouvent que dans la rhizosphère de la Luzerne tandis qu'ils sont absents de la rhizosphère d'autres plantes. Par contre, DHAR *et al.* (1979) détectent des rhizobiophages dans 30 sols indiens étudiés, même dans les rizières. Apparemment, le maintien d'un phage spécifique n'est pas en relation avec la persistance de la Légumineuse mais ces auteurs pensent que cette discordance peut s'expliquer par des conditions climatiques. Les pluies violentes puis les tempêtes de poussière, en Inde, facilitent la dispersion des *Rhizobium* et de leurs phages. Les températures leur permettent de survivre longtemps, en absence de la plante-hôte.

Il est fréquemment rapporté que le nombre de phages dans le sol présente des fluctuations saisonnières marquées. En Inde, les titres des populations phagiques spécifiques de *R. leguminosarum* sont peu élevés au cours des mois secs et chauds (mai-juillet) et relativement hauts à partir d'octobre, pour

atteindre leur apogée en décembre-janvier. Les phages isolés l'hiver sont plus thermosensibles que ceux isolés l'été (DHAR *et al.*, 1980). Les mêmes évolutions ont été constatées dans la rhizosphère du Pois chiche (DHAR et RAMKRISHNA, 1987). Dans une luzernière expérimentale du Nord de la France, le titre des phages virulents pour *R. meliloti* est dix fois plus faible au printemps qu'à la fin de l'automne. Après l'hiver, un nouveau semis de graines de Luzerne accompagné d'une inoculation bactérienne augmente les titres phagiques qui, ensuite, restent stables durant l'été. Aucun phage n'a été détecté dans des champs incultes, mais ceci peut être dû également aux conditions climatiques (DEFIVES et WERQUIN, 1984). La structure du sol peut également intervenir. Ainsi, en Australie, LAWSON *et al.* (1987) notent une réduction du nombre de phages, virulents pour *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, dans un sol argileux par rapport à un sol sableux.

La présence des bactériophages dans les sols suggère évidemment qu'ils exercent une influence réductrice sélective sur la population bactérienne mais aussi qu'ils se comportent comme vecteurs d'échanges d'informations génétiques. Ceci ne serait pas sans effet sur la nodulation et la fixation de l'azote.

Si DEMOLON et DUNEZ (1935) attribuent aux phages la fatigue des luzernières, DHAR *et al.* (1979) ne trouvent aucune corrélation entre la présence de phages et la qualité et l'importance de la culture de Légumineuses diverses.

In vitro, les expériences montrent que les phages peuvent influencer la taille et la nature de la population de leur(s) hôte(s). Ainsi, la présence d'un bactériophage virulent dans la zone racinaire de plantules de Trèfle réduit la densité de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* et favorise l'apparition de variants résistants au phage mais aux propriétés symbiotiques très altérées (EVANS *et al.*, 1979a).

L'effet est identique sur la souche sensible lorsque le phage est additionné à une population mixte comportant en outre une souche résistante jouant le rôle de compétiteur.

Cependant, le nombre de nodules et les poids secs végétaux ne sont pas ou peu modifiés car il est probable que la densité de bactéries efficaces est suffisante au début de l'expérience pour entraîner la formation d'une quantité convenable de nodules fixateurs d'azote (EVANS *et al.*, 1979b ; BARNET, 1980).

En revanche, la nodulation, le poids des tiges de Soja ainsi que la réduction de l'acétylène par les bactéroïdes de *B. japonicum* USDA117 sont sérieusement affectés par la présence d'un phage virulent. Ces effets sont abrogés si l'on inocule les plantes avec une combinaison de souches susceptibles et résistantes. L'occupation des nodules sera essentiellement réalisée par les bactéries insensibles au phage (HASHIM *et al.*, 1986 ; HASHIM *et* ANGLE, 1988).

Les phages ne semblent donc pas en mesure d'influencer notablement le rendement d'une culture de Légumineuses mais ils peuvent modifier la balance écologique des souches en compétition.

L'inoculation de phages dans le sol pourrait offrir un moyen pour réduire la nodulation par une souche indésirable et la remplacer par une souche concurrente plus efficace mais moins compétitive.

MATERIEL ET METHODES

I. - ORIGINE ET CULTURE DES SOUCHES BACTERIENNES

A. - Origine

Les souches utilisées et leur origine sont répertoriées dans le tableau 4.

Souches	Origines
Rhizobium meliloti	
M2S, M3S, M9S, M11S, M12S, M13S, M14S, M18S, M19S, M5N1	Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois Laboratoire de Microbiologie
Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli	
P15S	"
Bradyrhizobium japonicum	
J5	Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique)
Klebsiella pneumoniae 01K2	NCTC 5055

Tableau 4 - Souches bactériennes utilisées et leur origine.

Pour ce qui concerne les souches de notre Laboratoire, la nomenclature suivante a été adoptée : M pour **meliloti**, P pour **phaseoli**, S pour phénotype sauvage. La souche M5N1 correspond à un clone non muqueux de la souche M5S lorsqu'il est cultivé sur milieu RC glucosé à 1 %.

Toutes ces souches, ainsi que **B. japonicum** J5, sont capables d'assimiler l'azote atmosphérique en symbiose avec des plantules de leur légumineuse-hôte, en culture hydroponique aseptique.

B. - Conditions de culture et de conservation des bactéries

En milieu liquide, les bactéries sont cultivées en aérobiose, sous agitation. Les conditions usuelles sont résumées dans le tableau 5.

Bactérie	Milieu	Température d'incubation
Rhizobium	RC fructosé (1 %) ou RHB1 fructosé (1 %)	30°C
Bradyrhizobium	Y.E.M.	30°C
Klebsiella	Bouillon nutritif ordinaire	37°C

Tableau 5 - Milieux liquides et températures d'incubation usuels.

Les géloses correspondantes sont utilisées pour les cultures sur milieu solide.

Les souches sont conservées dans leur milieu de culture liquide additionné de glycérol (10 % final) et congelé à - 20°C.

II. - ORIGINE ET OBTENTION DES BACTERIOPHAGES

A. - Origine

Tous les bactériophages de Rhizobiaceae, étudiés dans ce travail, ont été isolés du sol de champs de Luzerne ou de Soja du Nord de la France par M. WERQUIN. Ils font partie de la collection du Laboratoire mais certains d'entre eux sont répertoriés au Centre de Référence pour Virus Bactériens "Félix d'Hérelle" créé par H.W. ACKERMAN à l'Université Laval de Québec (Canada). Le phage 2 de *K. pneumoniae* provient de notre collection.

Le tableau 6 présente les phages utilisés et leurs souches bactériennes propagatrices.

Souches propagatrices	Phages
R. meliloti	
M9S	NM2, NM6, NM7
M11S	NM8, NM3, NM4, NM9, CM2, CM6
M12S	CM3, CM1, CM20, CM21
M13S	CM9, CM4
M14S	CM8
M18S	CM5
B. japonicum	
J5	J5-1
K. pneumoniae	
	Φ2

Tableau 6 - Les bactériophages et leurs souches propagatrices.

NM : phages de *R. meliloti* à queue non contractile.
 CM : phages de *R. meliloti* à queue contractile.

B. - Obtention des bactériophages

1 - Réalisation d'un stock de phages (ADAMS, 1959)

0,3 ml d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance sont infectés par 0,1 ml d'une suspension phagique pure. Le mélange est laissé à la température ambiante, sans agitation pour permettre aux phages de s'adsorber convenablement sur les bactéries. On ajoute 3 ml de gélose bactériophage maintenue liquide à 45°C et l'ensemble est coulé à la surface de la gélose nutritive adéquate, en boîte de Petri.

Un témoin sans phages est réalisé dans les mêmes conditions. Après incubation à 30°C, pendant une nuit, l'observation du témoin montre un tapis

bactérien continu tandis que les autres boîtes montrent généralement une lyse confluyente se traduisant par l'absence totale de bactéries. La double couche, contenant les phages, est prélevée, portée dans un tube, homogénéisée et centrifugée. Le surnageant, débarrassé des débris bactériens par filtration sur membrane MILLIPORE de porosité 0,22 μm , constitue le stock de phages.

2 - Dénombrement des phages (ADAMS, 1959)

La suspension phagique (stock de phages, etc...) est diluée jusqu'à 10^{-8} . Des aliquots de 0,1 ml des dilutions appropriées sont mis en contact avec 0,3 ml de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. L'ensemble est traité comme précédemment. Les plages de lyse, qui correspondent, à l'origine, à un seul phage, sont comptées. Le titre de la suspension est exprimé en nombre de particules phagiques infectieuses par millilitre, encore appelées unités formant plages ou UFP.

3 - Conservation des bactériophages

Les stocks de phages destinés à être utilisés fréquemment sont conservés à + 4°C.

Pour une conservation plus longue, en soucier, les stocks sont conservés à - 20°C sous forme de lysats filtrés, glycérolés à 50 % (v/v). Ainsi, la suspension phagique ne se solidifie pas, ce qui évite l'éclatement des phages.

III. - MILIEUX DE CULTURE ET SOLUTIONS

A. - Milieu RC (Rhizobium complet) de LAIRD (1932) modifié par DELATTRE (1971)

-	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2	g
-	K ₂ HPO ₄	1	g
-	Extrait de levure	1	g
-	Eau distillée - q.s.p.	1	l
-	pH	7,2 à 7,5	
-	Stérilisation	121°C, 20 min	

Ce milieu est complété extemporanément par une source de carbone. Le fructose, en concentration finale de 1 %, a été choisi car sa dégradation métabolique par *R. meliloti* ne provoque pas, contrairement au glucose, d'acidification du milieu préjudiciable à la croissance bactérienne (HORNEZ et al., 1976). Il peut être solidifié (RCG) par adjonction de 15 g/l d'agar.

B. - Milieu Y.E.M. (Yeast Extract Mannitol) de FRED et al. (1932) modifié par BAL et al. (1978)

- K_2HPO_4	0,5	g
- $MgSO_4, 7H_2O$	0,2	g
- Extrait de levure	1	g
- NaCl	0,1	g
- Mannitol	10	g
- Eau distillée - q.s.p.	1	l
- pH	7,2	
- Stérilisation	121°C, 20 min	

Le milieu gélosé contient 15 g/l d'agar.

C. - Milieu R (Rhizobium) ou RHBI (DELATTRE, 1971)

Il s'agit d'un milieu minimum synthétique.

- $MgSO_4, 7H_2O$	0,2	g
- K_2HPO_4	1	g
- NH_4NO_3	1	g
- Eau distillée - q.s.p.	1	l
- pH	7,2	
- Stérilisation	121°C, 20 min	

Le milieu est additionné extemporanément de fructose (10 g/l), de biotine ou vitamine H (10 µg/l) et de thiamine ou vitamine B1 (500 µg/l).

D. - Bouillon et gélose nutritives ordinaires

Ces milieux sont reconstitués à partir de poudres déshydratées commercialisées par DIAGNOSTICS PASTEUR.

E. - Gélose bactériophage à 7,5 % d'agar

Elle est utilisée pour la confection des stocks et le dénombrement des phages (KRSMANOVIC-SIMIC et WERQUIN, 1973).

- Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	0,45	g
- Na ₂ SO ₄ , 10H ₂ O	0,06	g
- KNO ₃	0,06	g
- FeCl ₃	0,01	g
- CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,06	g
- MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,10	g
- Mannitol	10	g
- Agar Difco	7,5	g
- Eau distillée - q.s.p.	1	l
- pH	7,2	
- Stérilisation	105°C,	20 min

F. - TNP (Tampon de Non Prolifération) de COURTOIS (1984)

- K ₂ HPO ₄	1	g
- MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2	g
- Eau distillée - q.s.p.	1	l
- Stérilisation	120°C,	20 min

G. - Solutions

I - Fructose

Solution aqueuse à 40 % - Stérilisation 105°C, 20 min.

2 - Vitamines

Solutions aqueuses de biotine (10 mg/l) et de thiamine (500 mg/l) -
Stérilisation 105°C, 20 min.

3 - Bactopeptone DIFCO

Solution aqueuse à 10 % - Stérilisation 105°C, 20 min. On ajoute 0,1 ml de
chaque solution par flacon de 100 ml de milieu R.

4 - Cations

Solutions aqueuses de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 0,6 % et $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 1 % -
Stérilisation 105°C, 20 min. On ajoute 1 ml de chaque solution par flacon de
100 ml de milieu pour obtenir une concentration de $4 \cdot 10^{-4}$ M en CaCl_2 et
 $5 \cdot 10^{-4}$ M en MgCl_2 .

IV. - METHODES RELATIVES A L'ETUDE DES PHAGES

A. - Paramètres de lyse

Les expériences relatives à l'étude des paramètres de lyse ont été réalisées
en erlenmeyers de 300 ml, sous un volume de 50 ml de culture de **R. meliloti**
dont on connaît la concentration cellulaire grâce à la mesure de la densité
optique à 600 nm (DO_{600}) reportée sur une courbe de croissance standard. Les
bactéries sont infectées par des phages provenant de stocks titrés. L'ensemble
est placé en agitation rotative (85 périodes/min). La lyse est suivie par
mesure de la DO_{600} sur des prélèvements de 2 ml. Le cas échéant, des
dénombrements de phages sont effectués.

B. - Cinétiques de lyse

1 - En biophotomètre

Le biophotomètre de BONET, MAURY, JOUAN est équipé de cuves de 7 ml
dans lesquelles nous avons placé 5 ml de cultures de **R. meliloti** infectées ou

non par les bactériophages. L'agitation pendulaire (85 mouvements/min) est réalisée par un barreau aimanté. Les absorbances à DO_{600} des cultures sont mesurées et enregistrées en continu.

2 - En fermenteur (WERQUIN et al., 1984b)

L'appareil utilisé est un fermenteur F-7T de SETRIC GENIE INDUSTRIEL (Toulouse). La cuve de 4,5 l a un volume utile de 3 l. Elle est chargée de 2,7 l de milieu RC. Après stérilisation à 121°C, pendant 20 min, on ajoute :

- 80 ml d'une solution stérile de fructose à 40 %,
- 75 ml d'une solution stérile de bactopeptone (DIFCO) à 10 %,
- 30 ml d'une solution stérile de $MgCl_2, 6H_2O$ à 1 %,
- 30 ml d'une solution stérile de $CaCl_2, 2H_2O$ à 0,6 %,
- 300 ml de précultures bactériennes réalisées en milieu RC fructosé à 1 %, en agitation rotative à 30°C durant au moins 18 h.

Les paramètres de fermentation sont les suivants :

- température 30°C
- vitesse d'agitation 300 t/min
- débit d'air 1 l/min
- pourcentage d'oxygène dissous au départ de la fermentation . 90 %
- mesure de l'oxygène dissous enregistrée en continu
- mesure de la DO_{600} sur des échantillons prélevés

Le stock de phages injecté est de l'ordre de 120 ml titrant environ 10^9 UFP/ml.

Il n'est pas nécessaire d'utiliser la régulation de pH, celui-ci ne variant pratiquement pas. Les mousses n'apparaissant qu'en fin de fermentation, au moment de la lyse bactérienne, l'anti-mousse est également inutile.

C. - Multiplication en une seule étape

La technique utilisée a été mise au point par ELLIS et DELBRÜCK (1939). Elle a été adaptée à *R. meliloti* par ANDRIANTSIMIAVONIA (1981) de telle façon que :

- 80 % des phages sont adsorbés en 5 min ;
- les phages non adsorbés sont neutralisés à 90 % pour éviter leur adsorption ultérieure, par un immunsérum correspondant, en dilution adéquate ;
- la culture bactérienne contient 8.10^7 bactéries/ml ;
- la suspension phagique contient 8.10^7 phages/ml.

Le protocole de la manipulation est indiqué dans le tableau 7.

Temps en minutes	Tubes	Mode opératoire
0	n°1 (adsorption)	0,1 ml suspension de phages + 0,9 ml culture de bactéries
5	n°2 (sérum)	0,1 ml tube n°1 + 0,9 ml immunsérum dilué
10	n°3 (dilution)	0,1 ml tube n°2 + 0,9 ml RC
11	n°4 (FGT)	0,1 ml tube n°3 + 3,9 ml RC
12	n°5 (SGT)	0,1 ml tube n°4 + 9,9 ml RC

Tableau 7 - Protocole de la multiplication en une seule étape.

FGT : First Growth Tube.
SGT : Second Growth Tube.

Toutes les 20 min, on prélève alternativement dans les tubes FGT et SGT un échantillon de 0,1 ml dans lequel on dénombre les phages.

D. - Adsorption des phages - Mesure de l'adsorption sur les bactéries

1 - Cinétiques et constantes d'adsorption

Une culture de *R. meliloti*, en phase exponentielle de croissance, est diluée dans du RC fructosé, additionné de CaCl_2 et MgCl_2 , pour obtenir une DO_{600} correspondant à une concentration cellulaire donnée.

En fonction de son titre, la suspension phagique est ajoutée sous un volume qui procure une multiplicité d'infection proche de 1. Immédiatement après le contact, après 5 min et ensuite toutes les 10 min, on prélève 0,1 ml du mélange que l'on porte dans un tube contenant 9,5 ml de RC additionnés de 0,4 ml de chloroforme et maintenu à + 4°C. Le chloroforme tue toutes les bactéries y compris celles sur lesquelles les phages sont adsorbés irréversiblement mais épargne les phages libres. Le tube est centrifugé à 12 000 g pendant 10 min. Le culot contient les bactéries tuées et les phages adsorbés. Les phages libres sont dénombrés dans le surnageant.

Le calcul du pourcentage de phages adsorbés est le suivant :

$$\% \text{ phages adsorbés} = \frac{P_0 - P_t}{P_0} \times 100$$

P_0 = nombre de phages/ml mis en présence des bactéries au temps 0.

P_t = nombre de phages libres/ml au temps t.

La constante d'adsorption est représentée par la formule :

$$k = \frac{2,3}{Bt} \log \frac{P_0}{P_t}$$

k = constante d'adsorption en ml/min.

B = nombre de bactéries/ml.

t = temps en minutes.

Po = nombre de phages/ml au temps 0.

Pt = nombre de phages non adsorbés/ml au temps t.

2 - Quantité de phages pouvant s'adsorber sur une bactérie

Le culot, lavé par du TNP, d'une culture de *R. meliloti* M11S est remis en suspension dans du RC fructosé additionné de CaCl₂ et MgCl₂, de façon à obtenir une concentration de 10⁷ bactéries/ml. Dans différents tubes, on mélange les bactéries (0,1 ml) et les phages (0,1 ml) de telle sorte que l'on obtienne une gamme de multiplicité d'infection. Si nécessaire, on utilise des dilutions. Après 20 min de contact, l'adsorption est arrêtée, par dilution, en complétant le volume de réaction à 1 ml. Après centrifugation à 12 000 g pendant 15 min, les phages non adsorbés sont dosés dans le surnageant.

3 - Inhibition par les lectines

Les lectines utilisées sont récapitulées dans le tableau 8.

Abréviation	Affinités	Origine
ConA	α -D-Man > α -D-Glc > α -D-GlcNac	<i>Canavalia ensiformis</i>
RCA	β -D-Gal-(1→4)-D-GlcNac	<i>Ricinus communis</i>
SBA	Gal > GalNac	<i>Glycine max</i>
LPA	ANAN	<i>Limulus polyphemus</i>

Tableau 8 - Les lectines utilisées.

Les bactéries, cultivées sur RC fructosé, sont récupérées en phase exponentielle de croissance, lavées par centrifugation avec du TNP et remises en suspension dans ce tampon (DO₆₀₀ = 1 soit 3.10⁹ bactéries/ml). Les solutions de lectines dans le TNP sont additionnées aux suspensions

bactériennes de façon à obtenir des concentrations finales de 5 - 2 - 1 - 0,5 et 0,25 mg de lectine/ml.

On laisse en incubation à 37°C, 5 min, puis les phages sont ajoutés à raison de 10^5 UFP/ml, ainsi que les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Après 20 min de contact, on centrifuge à 12 000 g pendant 10 min et on dose les phages libres dans le surnageant.

4 - Inhibition par les oses

Les oses utilisés pour tenter de saturer les sites d'adsorption situés sur les phages sont : glucose, galactose, mannose, glucosamine, N-acétylglucosamine, ANAN, KDO. Ils sont employés à la concentration finale de 2,5 mg/ml. Ainsi, on mélange 0,1 ml de la suspension de Φ NM8.M11S titrant 10^5 UFP/ml et 0,1 ml de solution d'oses à 5 mg/ml dans du TNP. Après une incubation de 30 min à 30°C, on ajoute 0,1 ml d'une culture de **R. meliloti** M11S en phase exponentielle de croissance, complétée en cations. On laisse en contact 30 min à température ambiante et on complète le volume à 1 ml avec du RC. Les phages non adsorbés sont dosés dans le surnageant de centrifugation (12 000 g, 10 min).

5 - Rôle des EPS

Les phages NM8.M11S sont additionnés aux échantillons de culture de **R. meliloti** M11S en RC fructosé (m.o.i. \approx 1) et laissés en contact durant 1 h. Puis l'ensemble est centrifugé à 12 000 g, 15 min. En raison de la viscosité due aux EPS, il peut être nécessaire de diluer au préalable. Les phages libres sont dosés dans le surnageant.

6 - Rôle des LPS

Généralement, les LPS, ou les fractions dérivées, sont utilisés à la concentration de 5 mg/ml et les phages à raison de 10^5 UFP/ml. On mélange 0,1 ml de chaque suspension, on ajoute les cations et on laisse en contact 1 h. On complète à 1 ml avec du RC pour arrêter l'adsorption par dilution. Après centrifugation, les phages non adsorbés sont dosés dans le surnageant.

a) Action du déoxycholate de sodium (DOC)

On mélange 0,5 ml d'une solution de DOC 10 mM et 0,5 ml d'une solution de LPS à 10 mg/ml. Après 5 min, on ajoute 0,1 ml de la suspension de Φ NM8.M11S à 10^6 UFP/ml ainsi que 10 μ l des solutions de CaCl_2 et MgCl_2 pour obtenir les concentrations finales respectives de 0,4 mM et 0,5 mM. On laisse en contact 1 h et on dose les phages libres.

On effectue la même mesure d'adsorption sur un échantillon LPS + DOC dialysé contre de l'eau distillée pendant 12 h à 4°C.

b) Action de l'EDTA

On mélange 0,5 ml de la solution de LPS à 10 mg/ml et 0,5 ml d'une solution d'EDTA 10 mM. Deux autres échantillons sont en outre additionnés de 10 μ l de CaCl_2 ou MgCl_2 pour obtenir une concentration finale de 2 mM. Après 5 min, on introduit les phages (10^5 UFP/ml). On laisse en contact 1 h et on dose les phages libres.

E. - Restriction - Modification

1 - Calcul des coefficients d'efficacité d'étalement

On effectue des dénombrements du bactériophage étudié en utilisant d'une part la souche indicatrice A sur laquelle le phage vient de se multiplier avec une activité lytique maximale et, d'autre part, la souche B chez laquelle on recherche une activité de restriction de la croissance du virus. Le coefficient d'efficacité d'étalement est donné par le rapport :

$$\text{C.E.E.} = \frac{\text{titre du stock de phages sur la souche B}}{\text{titre du stock de phages sur la souche A}}$$

Le titre obtenu sur la souche indicatrice correspond à C.E.E. = 1.

2 - Facteurs influençant la Restriction-Modification

a) Milieu de culture et temps de croissance

R. meliloti M5N1 est cultivé sur RC fructosé et RHBI fructosé, en agitation à 30°C. La croissance est suivie par mesure de la DO_{600} . Des parties aliquotes des cultures sont prélevées à différents temps et infectées par les phages Φ NM8.M11S. Après 10 min de contact, les phages sont titrés en utilisant la souche M5N1. Le coefficient d'efficacité d'étalement est calculé par rapport au titre du stock de phages Φ NM8.M11S mesuré sur **R. meliloti** M11S.

b) Chloramphénicol

2 ml de culture de **R. meliloti** M5N1 en phase exponentielle de croissance en milieu RC fructosé (10^8 bactéries/ml) sont additionnés de chloramphénicol (50 μ g/ml). Après 15 min, le chloramphénicol est éliminé par centrifugation. Le culot cellulaire, remis en suspension dans 2 ml de RC fructosé, est infecté par Φ NM8.M11S, à des temps différents après le traitement. Les coefficients d'efficacité d'étalement sont calculés comme précédemment.

c) Température

Les cellules de **R. meliloti** M5N1, cultivées en milieu RC fructosé (10^8 bactéries/ml), sont chauffées au bain-marie à 45°C pendant 1, 2, 3 min, refroidies à 30°C et infectées par Φ NM8.M11S. Les coefficients d'efficacité d'étalement sont déterminés.

3 - Détection des nucléotides libres dans le lysat

Des cultures de **R. meliloti** M11S et M5N1, en milieu RHBI fructosé + Ca^{2+} + Mg^{2+} , sont infectées à l'aide des phages Φ NM8.M11S et incubées à 30°C en agitation douce. Toutes les 5 min, des échantillons de 2 ml sont prélevés et centrifugés à 12 000 g pendant 15 min. Les surnageants sont dialysés contre l'eau distillée à 4°C pendant 1 nuit et on mesure l'absorbance à 260 nm sur la fraction dialysable. Des témoins, constitués de cultures bactériennes non infectées, sont traités de façon identique.

V. - METHODES DE DOSAGE

A. - Protéines totales

Elles sont dosées selon la méthode de LOWRY *et al.* (1951).

B. - Oses totaux

La méthode au phénol sulfurique de DUBOIS *et al.* (1956) est utilisée.

C. - Acides sialiques libres

La technique d'AMINOFF (1961), utilisant l'acide thiobarbiturique, a permis le dosage des acides sialiques libres.

D. - Acides nucléiques

La quantité d'acides nucléiques contenus dans les LPS a été déterminée par mesure de la densité optique à 260 nm. Une DO_{260} égale à 1 correspond à 50 µg d'acides nucléiques.

VI. - ETUDE DES EXOPOLYSACCHARIDES

A. - Production

1 - Croissance non régulée

Les EPS s'accumulent dans les cultures de *R. meliloti* en RC fructosé à 30°C en agitation rotative. Après 4 à 5 jours, le milieu devient visqueux.

2 - Croissance en fermenteur

Nous avons utilisé un fermenteur "NEW BRUNSWICK", d'une capacité utile de 10 l, pour obtenir des EPS en quantités importantes dans des conditions bien définies, en particulier de K_{La} . Il s'agit d'un coefficient d'absorption volumique de l'oxygène qui traduit la capacité d'oxygénation du milieu dans le

fermenteur. Il s'exprime en mM d'O₂/l/h mais, par simplification, on l'utilise en h⁻¹.

Nos paramètres de fermentation sont les suivants :

- Volume de culture : 5 l de RC fructosé 1 %.
- Température : 30°C.
- Au démarrage de la fermentation
 - . débit d'air : 3 l/min.
 - . agitation : 180 t/min.
 - . K_{la} : 40 h⁻¹.
- Inoculation à : 1 % avec une préculture de 16 h en RC fructosé.
- Durée de fermentation : 72 à 96 h.

B. - Extraction des EPS

La culture est diluée par l'eau distillée pour en diminuer la viscosité de telle façon que l'on puisse obtenir un surnageant limpide après centrifugation à 10 000 g, 15 min. On y ajoute du NaCl à la concentration molaire par rapport au volume final et de l'éthanol absolu v/v (concentration finale de 50 %). Le précipité qui se forme est récupéré à l'aide d'une baguette de verre. Il peut être lavé dans des bains d'éthanol, en concentrations croissantes, avant séchage à l'étuve à 40°C.

C. - Mesures viscosimétriques

On prépare des échantillons de 10 ml de solution d'EPS à 1,5 mg/ml en tampon tris-maléate contenant de l'azide de sodium à 0,02 %. On ajoute 1,2 ml de lysat de phages titrant de 10⁹ à 10¹⁰ UFP/ml et CaCl₂ 1,3 mM. Les témoins sont réalisés en remplaçant le lysat par 1,2 ml de RC.

On mesure les temps d'écoulement d'un volume connu de ces solutions à l'aide d'un viscosimètre à tube capillaire type OSTWALD (PROLABO). Les mesures ont été effectuées à température ambiante car nous n'avons pas besoin de valeurs précises de viscosité qui, elles, sont très sensibles aux écarts, mêmes faibles, de température. Nos résultats sont exprimés en viscosité relative :

$$V_R = \frac{\text{temps d'écoulement au temps } t}{\text{temps d'écoulement au temps } 0}$$

Nous avons ainsi étudié l'effet de modifications du tampon tris-maléate sur l'activité dépolymérasique du lysat phagique :

- rôle du pH : 5 à 8
- rôle de la concentration molaire : 0,025 M à 0,2 M
- rôle de l'EDTA : 0,1 mM à 10 mM

D. - Analyse des produits de dépolymérisation

1 - Préparation des échantillons

Nous avons préparé 500 ou 1 000 ml de solution d'EPS à 1,5 mg/ml en tampon tris-maléate 0,1 M, pH 6, contenant 0,02 % d'azide de sodium. On ajoute 10 % de lysat phagique titrant 10^9 UFP/ml. On laisse à température ambiante jusqu'à obtention d'une viscosité relative inférieure à 50 %.

2 - Ultrafiltration

On effectue, par précaution, une préfiltration sur une membrane MILLIPORE (porosité 0,5 μ m) avant l'ultrafiltration sur membrane AMICON XM100.

3 - Analyse de la fraction retenue (P1)

a) Hydrolyse sulfurique

Les EPS sont hydrolysés par H_2SO_4 pendant 4 h à 100°C. L'hydrolysate, neutralisé par du bicarbonate de sodium, est filtré sur buchner et concentré par évaporation sous vide à 40°C. Le résidu, repris dans 0,5 ml d'eau distillée, est filtré sur membrane MILLIPORE (porosité 0,45 μ m).

b) Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

Le filtrat est introduit par un injecteur universel U6K dans un système CLHP composé d'appareils WATERS couplés à un détecteur réfractométrique R401.

La fraction est éluée sur une colonne métallique "sugar pak WATERS" sous forme Ca^{++} . Les profils d'éluion correspondent aux oses neutres.

c) RMN¹H

Les détections sur les échantillons, avant et après l'action du phage, sont réalisées sur un appareil BRUCKER WP100 équipé d'un calculateur ASPET 2000 de 8 k mémoires.

Les résultats sont obtenus par analyse de 100 passages consécutifs. Les dosages des substituants ont été réalisés à la température de 358°K.

4 - Analyse de la fraction non retenue (P2)

a) Biogel P4

La colonne a été éluée par une solution saline de nitrate de sodium 5.10^{-2} M. La détection du matériel glucidique se fait en continu par réfractométrie.

VII. - ETUDE DES LIPOPOLYSACCHARIDES

A. - Extraction par la technique de WESTPHAL ET JANN (1965)

Les bactéries sont cultivées dans une fiole à toxine contenant 1 l de milieu RC fructosé à 1 %, sous agitation à 30°C pendant 18 h. Le culot de centrifugation est lavé dans du TNP puis remis en suspension dans 5 ml d'eau distillée auxquels on ajoute 5 ml d'eau phénolée (90 ml de phénol + 10 ml d'eau distillée). Le tout est porté au bain-marie à 70°C pendant 30 min.

Après centrifugation, on récupère la phase aqueuse et on réalise une deuxième extraction sur la phase insoluble (résidu).

Une nouvelle centrifugation rassemble les différentes fractions et on laisse décanter une dizaine d'heures à + 4°C (phase phénolique - phase aqueuse et le résidu).

Pour éliminer les acides nucléiques et les exopolysaccharides (EPS), la phase aqueuse est additionnée de 2 volumes d'éthanol, puis centrifugée à 5 000 g pendant 15 min. Le surnageant est additionné de 4 volumes d'éthanol et de 6 ml d'éthanol saturé en acétate de sodium, les LPS sont récupérés par centrifugation. Le culot (LPS) est remis en suspension dans 2 ml d'eau distillée.

La fraction phénolique, le résidu et les LPS sont dialysés contre l'eau distillée à + 4°C pendant 24 h puis lyophilisés.

B. - Purification des lipopolysaccharides

1 - Traitement à la DNase, RNase et pronase (OKUDA et al., 1975)

a) Traitement à la DNase

Les LPS sont dissous dans le tampon phosphate 0,01 M (pH = 7) contenant $MgCl_2$ 0,01 M auquel on ajoute la DNase à la concentration finale de 10 µg/ml. Le mélange est laissé à 37°C pendant 1 h. La solution est centrifugée à 3 500 g pendant 5 min. Le surnageant est dialysé contre 20 volumes d'EDTA 2 mM pendant une nuit.

b) Traitement à la RNase

Le dialysat est mis dans le tampon acétate 0,04 M (pH 5) (v/v), la RNase est additionnée à une concentration finale de 10 µg/ml. Le tout est laissé à 37°C pendant 3 h. Le mélange est centrifugé à 78 000 g pendant 4 h.

c) Digestion par la pronase

Le culot obtenu à l'étape précédente est remis en suspension dans le tampon tris (hydroxyméthyl) aminométhane-HCl 0,1 M (pH = 7,8) contenant la pronase E (0,5 mg/ml). Après incubation à 30°C, pendant 2 h, le mélange est centrifugé à 10 000 g pendant 5 min. On garde le surnageant.

d) Ultracentrifugations

Le surnageant ainsi récupéré est centrifugé à 78 000 g pendant 4 h. Le culot est remis en suspension dans l'eau distillée et centrifugé une deuxième fois dans les mêmes conditions. Le culot final est dissous dans l'eau distillée puis lyophilisé. Ces ultracentrifugations doivent être évitées dans le cas de LPS très hydrophiles, donc solubles, et qui ne sédimentent pas (ex. : *R. meliloti* M11S).

2 - Purification de l'extrait phénol/eau par chromatographie de gel filtration

L'extrait phénol/eau de *R. meliloti* M11S, traité à la DNase, RNase et pronase, est purifié sur Séphadex G50 (1,5 x 130 cm) ; éluant : eau distillée, débit : 10 ml/h, fractions de 2 ml/tube. Le matériel glucidique est repéré par le réactif au phénol sulfurique.

3 - Chromatographie Liquide de Haute Performance (CLHP) (KOL et al., 1987)

La chromatographie liquide de haute performance est réalisée à l'aide d'un chromatographe liquide de haute pression (SPECTRA PHYSIC APPARATUS) sur une colonne d'échange anionique (250 x 4,6 mm D.I) (BROWNLEE LABS Inc., Santa Clara, CA, USA).

La fraction contenant les LPS (2,5 mg), dissous dans 1 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 6,5, est injectée en CLHP.

La colonne est lavée avec le même tampon pendant 10 min puis un gradient linéaire de NaCl de 0 à 500 mM est appliqué pendant 15 min suivi d'une élution isocratique avec le même tampon pendant 20 min.

Le débit est de 1 ml/min.

C. - Caractérisation des lipopolysaccharides

1 - Test au lysat d'amœbocytes de Limule

Nous avons utilisé le coffret ACCU-GEL de M.A. BIOPRODUCTS, distribué par O.S.I. (Paris), comprenant :

- le lysat (LAL) lyophilisé d'amœbocytes circulants de **Limulus polyphemus** standardisé pour détecter 0,25 ng/ml d'endotoxine ;
- un contrôle positif constitué de LPS d'**E. coli** 0111:B4 contenant 3 % de sérum ;
- un contrôle d'inhibition, contenant le lysat LAL additionné d'1 mg/ml de LPS d'**E. coli** 0111:B4. On y ajoute la solution étudiée afin de vérifier qu'elle ne contient pas d'inhibiteur(s) de la coagulation ;
- l'eau apyrogène destinée à reconstituer les réactifs et la solution à 1 mg/ml de LPS lyophilisés de **R. meliloti** M11S.

Tout le matériel entrant en contact avec l'échantillon ou les réactifs est rendu apyrogène par un chauffage de 4 h à 180°C.

2 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide - dodécylsulfate de sodium (SDS - PAGE)

Pour la migration des LPS, nous nous sommes référé au système de LAEMMLI (1970). Les échantillons sont dissous dans un tampon contenant :

- | | |
|-------------------------------|----------|
| - eau distillée | : 4,7 ml |
| - tris HCl 0,5 M pH 6,8 | : 1,0 ml |
| - glycérol | : 1,0 ml |
| - dodecyl sulfate de Na (SDS) | : 1,0 ml |
| - 2-mercaptoéthanol | : 0,1 ml |
| - bleu de bromophénol | : 0,2 ml |

On dépose les échantillons à raison de 30 µg de LPS par puits creusé dans la plaque de polyacrylamide constituée de :

- un gel de concentration à 4 %,
- un gel de séparation à 12,5 %.

Le tampon tris/glycine, pH 8,3, additionné de SDS 0,1 %, est utilisé pour la migration sous une intensité de 35 mA jusqu'à ce que le témoin (bleu de bromophénol) atteigne le bas du gel (24 h).

La procédure de coloration du gel, utilisant l'oxydation périodique suivie d'un traitement au nitrate d'argent ammoniacal et d'une révélation par une solution d'acide citrique-formaldéhyde, est celle de TSAI et FRASCH (1982) adaptée par HITCHCOCK et BROWN (1983).

3 - Epreuve à l'acriflavine et au chlorure de sodium (KROPINSKI et CHADWICK, 1976)

Les cellules de *R. meliloti*, cultivées durant 18 h en milieu RC fructosé, sont récupérées par centrifugation (5 000 g, 15 min). Les culots sont remis en suspension dans une solution d'acriflavine 0,2 % ou de chlorure de sodium 4 %. Les souches bactériennes "ROUGH" agglutinent rapidement tandis que les "SMOOTH" n'agglutinent pas.

D. - Analyse des sucres et des acides gras du LPS de *R. meliloti* M11S

1 - Chromatographie de Partage en Phase Gazeuse (CPG) [méthode de ZANETTA et al. (1972)]

Un mélange de 1 mg de LPS de *R. meliloti* M11S et 1 ml d'une solution aqueuse de mésoinositol à 100 µg/ml (témoin interne) sont lyophilisés. Le lyophilisat subit ensuite les traitements suivants :

- addition de 1 ml de méthanol/HCl 0,5 N et passage au four à 80°C, 24 h ;
- extraction à l'heptane : on obtient une fraction méthanolique (monosaccharides) et une fraction heptanique (méthylesters d'acides gras) ;
- évaporation sous un courant d'azote des deux phases ainsi obtenues.

A la fraction méthanolique contenant les sucres :

on ajoute un mélange de dichlorométhane/anhydride trifluoroacétique (v/v) et on injecte en CPG sur une colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV210 à 5 %, sur Chromosorb W-HP 80 à 100 mesh. La température est programmée de 100 à 220°C (2°C/min). Le débit du gaz vecteur (hélium) est de 7,5 ml/min.

La détection s'effectue par ionisation de flamme.

A la fraction heptanique contenant les méthylesters d'acides gras :

on ajoute 200 µl d'heptane et 10 µg d'un méthylester d'acides gras en C19 (témoin) et on injecte en CPG sur une colonne à capillaire CP-SIL 5CB (25 m x 0,32 mm).

La température est programmée de 100 à 240°C (2°C/min).
Pression du gaz vecteur (hélium) : 0,4 bar.

Les méthylglycosides trifluoroacétylés et les méthylesters d'acides gras sont détectés par ionisation de flamme à la sortie de la colonne.

On exprime les résultats en rapports molaires. Pour les monosaccharides, ils sont obtenus en divisant le nombre de micromoles de chaque ose par le nombre de micromoles de glucose.

Concernant les acides gras, les rapports molaires sont calculés de la même façon en considérant la surface du pic et non sa hauteur. Le coefficient propre à chaque acide gras est égal à 1.

2 - Caractérisation des acides sialiques

a) Hydrolyse partielle de l'acide sialique par la méthode de VARKI et DIAZ (1984)

Les LPS sont soumis à une hydrolyse par l'acide acétique 2 M à 80°C pendant 3 h afin de libérer les acides sialiques. Les acides gras sont extraits par le chloroforme et la phase aqueuse est séchée sous azote.

b) Identification des acides sialiques en spectrométrie de masse

La phase aqueuse ainsi obtenue est triméthylsilylée par l'addition de pyridine et bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) (v/v).

Après 2 h à la température ambiante, le produit est analysé par couplage CPG-SM :

- sur une colonne à capillaire CP-SIL 5CB (50 m x 0,32 mm) à la température programmée de 150 à 280°C (5°C/min) ;
- sur un spectromètre de masse RIBER-MAG 10-10 : ionisation par impact électronique (IE) (potentiel d'ionisation 70 ev) et/ou par ionisation chimique (IC) à l'aide de l'ammoniaque.

L'ionisation électronique (IE) permet d'obtenir des fragments qui conduisent à l'identification de la molécule.

L'ionisation chimique (IC) permet d'obtenir préférentiellement l'ion moléculaire permettant de déterminer la masse moléculaire du produit analysé.

Les monosaccharides, libérés par méthanolyse, ont également été analysés après leur méthylsilylation (pyridine, BSTFA v/v) par couplage CPG-SM par ionisation chimique comme précédemment décrit.

c) Action de la neuraminidase

10 mg de neuraminidase type V de **Clostridium perfringens** (SIGMA) sont dissous dans 1 ml de tampon acétate pH 5 contenant en outre de la sérumalbumine bovine à 0,3 mg/ml, pour empêcher l'activité protéolytique associée de s'exercer contre l'enzyme, et un antiseptique, l'azide de sodium à 0,01 %, car les manipulations ne sont pas effectuées en milieu aseptique.

La solution finale contient 18 unités enzymatiques lorsque le substrat est le N-acétylneuraminyllactose (fiche technique SIGMA). On ajoute 0,5 ml de LPS

à 1 mg/ml en tampon acétate pH 5 et on incube à 37°C durant 72 h. Un témoin est réalisé en incubant également une partie aliquote de la solution de LPS à 1 mg/ml en tampon acétate pH 5 pour suivre l'hydrolyse spontanée éventuelle.

On effectue le dosage des acides sialiques libérés, selon AMINOFF (1961), dans les prélèvements aux temps 0, 24 et 72 h. Le produit final est fractionné par gel filtration sur Séphadex G50 comme décrit précédemment. Les LPS digérés sont repérés grâce à leurs osamines par spectrophotométrie en ultra-violet à 206 nm tandis que les protéines (neuraminidase) sont détectées à 280 nm. Les pics sont concentrés, lyophilisés et analysés en chromatographie en phase gazeuse selon la technique déjà décrite.

VIII. - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

A. - A transmission

1 - Sur coupes ultra-fines

a) Nodules de Luzerne

Les nodules sont sectionnés et fixés par l'acide osmique à 1 % puis l'acétate d'uranyle à 1 %, en tampon véronal-acétate pH 6, selon RYTER et KELLENBERGER (1958).

La déshydratation se fait à l'acétone et le matériel est inclus dans l'araldite selon les techniques habituelles (GLAUERT et GLAUERT, 1958). Les coupes sont réalisées sur "Porter Blum" et colorées sur grille par le citrate de plomb (REYNOLDS, 1963) ou l'acide périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent (THIERY, 1967). L'observation a été faite au microscope électronique HITACHI HU12, 75 kv.

b) Cellules bactériennes

Quelques millilitres de cultures bactériennes sont centrifugés, les cellules lavées avec du TNP. Le culot est traité selon LUFT (1971). Il est remis en suspension dans le fixateur constitué, à parts égales, de :

- tampon cacodylate : 0,2 M - pH 7,4
- glutaraldéhyde : 3,6 %
- rouge de ruthénium : 0,15 %

Après 5-6 h à + 4°C, le matériel est lavé par le liquide de rinçage : tampon cacodylate - rouge de ruthénium - eau (1:1:1). On effectue ensuite une post-fixation de 1 nuit à + 4°C dans un mélange à parts égales de :

- tampon cacodylate : 0,2 M - pH 7,4
- rouge de ruthénium : 3,6 %
- tétr oxyde d'osmium : 4,0 %

La déshydratation se fait dans l'éthanol puis l'oxyde de propylène et l'inclusion dans l'épon (LUFT, 1961).

Si la friabilité des culots gêne les opérations, il est possible de procéder à une inclusion préalable des cellules dans une gélose à 2 % d'agar. On traite ensuite des portions de 1 à 2 mm³ découpées après solidification de la gélose sur une lame de verre.

Les coupes contrastées sur grille par le citrate de plomb (REYNOLDS, 1963) sont observées au microscope électronique JEOL 120CX, 80 k.

2 - Après coloration négative

a) LPS

Une goutte d'une solution de LPS (1 mg/ml) est déposée sur une grille recouverte d'une membrane de parlodion carbonée. Après 2 min, le liquide est absorbé et remplacé par 1 goutte d'acétate d'uranyle 2 % durant 1 min. On élimine le colorant et on sèche à température ambiante.

L'observation est réalisée au microscope électronique JEOL 120CX, 80 kv.

b) Phages

La technique précédente est également adoptée. Les colorants sont l'acétate d'uranyle 2 % pH 4,5 ou le phosphotungstate de potassium 2 % pH 7,2, seuls ou additionnés de 50 µg/ml de bacitracine comme agent mouillant (GREGORY et PIRIE, 1973).

c) Cellules de R. meliloti productrices d'EPS

(Technique de MUTAFTSCHIEV et al., 1982)

On place une goutte de suspension bactérienne sur une grille recouverte d'une membrane de parlodion carbonée et on laisse sédimenter environ 2 min. On absorbe le liquide et on dépose la grille pendant 2 min, côté à observer, sur une goutte d'un mélange (v/v) :

- glutaraldéhyde 1 % en tampon cacodylate 0,2 M, pH 7 ;
- rouge de ruthénium 1 % dans l'eau distillée.

On absorbe l'excès de colorant puis la grille est posée sur une goutte d'acétate d'uranyle à 0,05 % durant 1 min. Après élimination de l'excès de colorant et séchage à température ambiante, on observe au microscope JEOL 120CX, 80 kv.

B. - A balayage

(Technique dérivée de SEN et al., 1986)

Les nodules entiers sont fixés par la glutaraldéhyde 3 % en tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 à 4°C durant 24 h. Après trois lavages dans le tampon, ils subissent une post-fixation par le tétroxyde d'osmium 2 % dans le même tampon phosphate, à 4°C, 1 nuit. On déshydrate les échantillons dans de l'éthanol en concentrations croissantes : 30 % - 50 % - 70 % - 100 % à raison de 30 min dans chaque bain. On effectue une seconde déshydratation dans des solutions d'acétate d'isoamyle à 30 % - 50 % - 70 % et 90 % dans l'éthanol avec des temps de passage de 30 min.

Les échantillons peuvent être gardés dans le bain à 90 % jusqu'au traitement de 2 x 30 min dans l'acétate d'isoamyle pur suivi du séchage par point critique en atmosphère de gaz carbonique.

Les nodules, entiers ou sectionnés, sont collés sur les pontets à l'aide de bandes collantes à double face et métallisés par une couche d'or-palladium (environ 40 nm d'épaisseur).

L'observation est réalisée au microscope électronique JEOL 120 CX, équipé du système ASID-4D.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I

DEVELOPPEMENT DES PHAGES DE RHIZOBIUM MELILOTI

I. - DESCRIPTION DES PHAGES ET CHOIX DES SOUCHES BACTERIENNES PROPAGATRICES

L'isolement et la caractérisation primaire des bactériophages ont été effectués à l'aide de milieux solides gélosés sur lesquels la multiplication des phages se traduit par l'apparition de plages de lyse dans un tapis bactérien. C'est ainsi que nous avons sélectionné le phage NM8 pour entreprendre nos premiers travaux car il se multiplie aisément en donnant des plages de lyse claires d'1 mm de diamètre (Annexe I, Planche 5, Photo G).

Ultérieurement, le phage CM1 a révélé des propriétés intéressantes et nous l'avons utilisé. En culture, il produit des plages de lyse plus petites (0,4-0,6 mm de diamètre), claires mais parfois aussi entourées de zones troubles irrégulières (Annexe I, Planche 5, Photo H).

Nous décrivons donc plus particulièrement les propriétés biologiques de ces bactériophages. Toutefois, nous avons été amené à utiliser un échantillonnage viral beaucoup plus important afin de déterminer des paramètres généraux de développement, adaptables au plus grand nombre. Aussi, a-t-on employé 17 phages appartenant à 3 types morphologiques décrits par WERQUIN (1989) (Annexe I, Planche 5, Photos A à F).

Le morphotype NM8 (Siphoviridae, groupe B de BRADLEY) est représenté par trois phages : NM8, NM4, NM9. Il est constitué de phages à queue rigide et effilée de 8 nm de diamètre, montrant 24 striations de 4 nm de périodicité. L'extrémité de la queue est pourvue de trois crampons de 17 x 2,5 nm. La tête est icosaédrique de 37 nm de côté et de 64 nm de diamètre.

Les phages NM2, NM3, NM6, NM7 appartiennent au morphotype NM1. Ils montrent une tête icosaédrique de 33 nm de côté et de 70 à 72 nm de diamètre selon la coloration. Les queues, d'un diamètre de 8 nm, présentent 12 à 13 barres transversales de dimension 14 x 3 nm, apparaissant avec une périodicité moyenne de 11 nm. L'extrémité de la queue est pourvue de 6 crampons de 14 x 8,5 nm.

Les phages du morphotype CM (Myoviridae, groupe A de BRADLEY) sont identiques. Ils possèdent une tête icosaédrique de 57 nm de côté et d'un diamètre de 98 nm ou 107 nm selon qu'il s'agit d'une coloration à l'acétate d'uranyle (AU) ou au phosphotungstate (PT). Tous les phages montrent une queue contractile pourvue d'un cou de 8 nm, d'un manchon de 102 x 18-25 nm présentant des striations, d'une plaque basale de 34 x 3 nm supportant 6 crampons en forme de massue mesurant 12 x 7 nm, et au moins deux fibres caudales de 64 x 2 nm parfois repliées le long de la queue.

Tous ces phages ont été isolés du sol. Lors de la constitution de la collection de virus, la souche bactérienne propagatrice est choisie en fonction de sa plus grande sensibilité au phage concerné, c'est-à-dire permettant l'obtention du plus grand nombre de plages de lyse.

Lorsqu'il est nécessaire de préciser l'identité du dernier hôte bactérien d'un phage, on utilise la nomenclature proposée par ARBER et LINN (1969). Ainsi, le phage NM8 venant d'être multiplié sur **R. meliloti** M11S sera noté Φ NM8.M11S.

Par ailleurs, l'emploi fréquent des souches de bactéries d'une collection engendre la nécessité de contrôles bactériologiques. La reconnaissance des Rhizobiaceae a entraîné l'adaptation des techniques culturales, immunologiques et moléculaires utilisées en identification bactérienne. Beaucoup de ces méthodes sont peu compatibles avec la nécessité temporaire de vérifier les souches utilisées au laboratoire. Il nous manquait une méthode d'identification présomptive simple et rapide du genre **Rhizobium** et, en particulier, de **R. meliloti**. Utilisant le principe de l'identification numérique des bactéries, les microgaleries API ont répondu à cette exigence.

Notre adaptation de la méthode est décrite en Annexe II.

II. - ETUDE GENERALE DU CYCLE LYTIQUE

A. - Paramètres de lyse

Une culture bactérienne en phase logarithmique de croissance est infectée avec des phages. Ordinairement, ceci conduit à la destruction des bactéries et à l'éclaircissement du milieu. Ces variations de turbidité peuvent être facilement mesurées avec un spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 600 nm.

Cette technique simple nous a permis d'étudier quelques facteurs influençant la lyse liquide effectuée par quelques bactériophages de *R. meliloti*. Une culture de phages en milieu liquide est appelée un lysat.

1 - Milieu de culture et cations divalents

Les co-facteurs les plus fréquemment requis pour une lyse phagique efficace sont les ions calcium et magnésium (ADAMS, 1959). WERQUIN *et al.* (1977) avaient déjà utilisé la dépendance en Ca^{2+} et Mg^{2+} pour classer les bactériophages de *R. meliloti* mais il était nécessaire de mieux connaître l'influence de ces ions.

Différents phages appartenant aux Myoviridae (type CM) et Siphoviridae (type NM) ont été ajoutés à une culture, en phase exponentielle, de leur souche bactérienne propagatrice.

Des concentrations en Ca^{2+} et Mg^{2+} , respectivement de 0 à 0,40 mM et de 0 à 0,50 mM, ont été étudiées et les densités optiques à 600 nm mesurées après 15 h d'incubation à 30°C. Cette durée a été choisie dans un souci d'uniformisation bien que nous ayons constaté, au cours d'essais préliminaires, que la lyse est souvent plus rapide. De plus, nous n'avons pas dissocié l'action du calcium et du magnésium car les rhizobiophages étudiés exigent soit les deux ions, soit plus particulièrement le calcium (WERQUIN *et al.*, 1977).

La figure 24 montre les courbes obtenues pour les phages NM8, NM3, CM1, CM2 lorsque la lyse est effectuée en milieu complet RC fructosé.

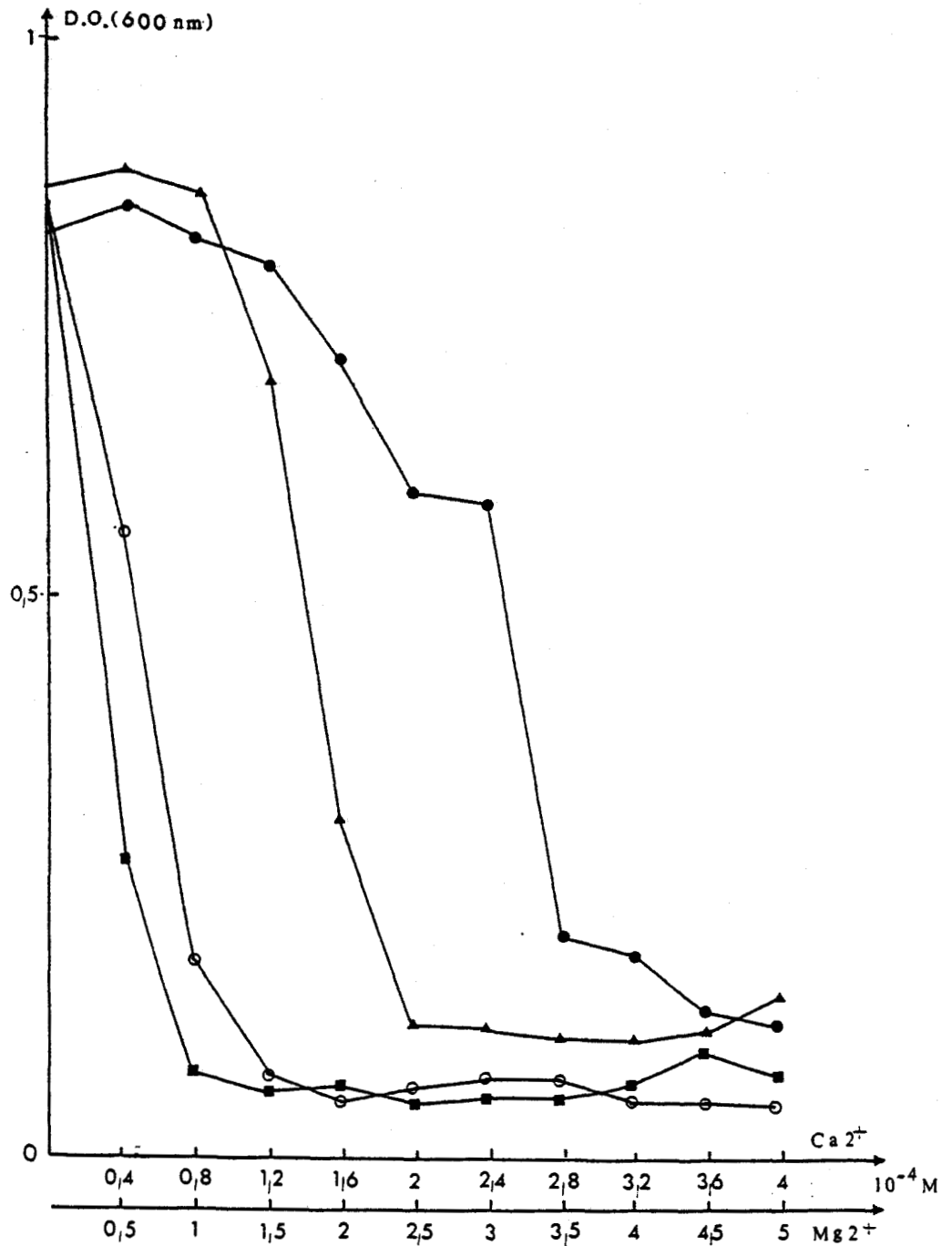


Figure 24 - Lyses de cultures de *R. meliloti* en milieu RC fructosé, par les phages NM8, NM3, CM1, CM2, en fonction de la concentration en Ca²⁺ et Mg²⁺, après 15 h d'incubation à 30°C.

- : NM8
- : NM3
- : CM1
- ▲ : CM2

Il s'avère que tous les phages lysent les bactéries mais que les concentrations en ions divalents, nécessaires à une lyse maximale, varient largement. Ainsi, NM3 et CMI demandent de faibles teneurs en cations tandis que CM2 et surtout NM8 sont plus exigeants. Afin de ne pas risquer de se trouver en dessous du seuil indispensable, nous avons décidé d'utiliser ultérieurement les concentrations finales de 0,40 mM en Ca^{2+} et 0,50 mM en Mg^{2+} .

Par ailleurs, pour les phages CM3 et CM4, l'utilisation d'un milieu de culture synthétique minimal donne des résultats proches de ceux obtenus avec le milieu complet (fig. 25).

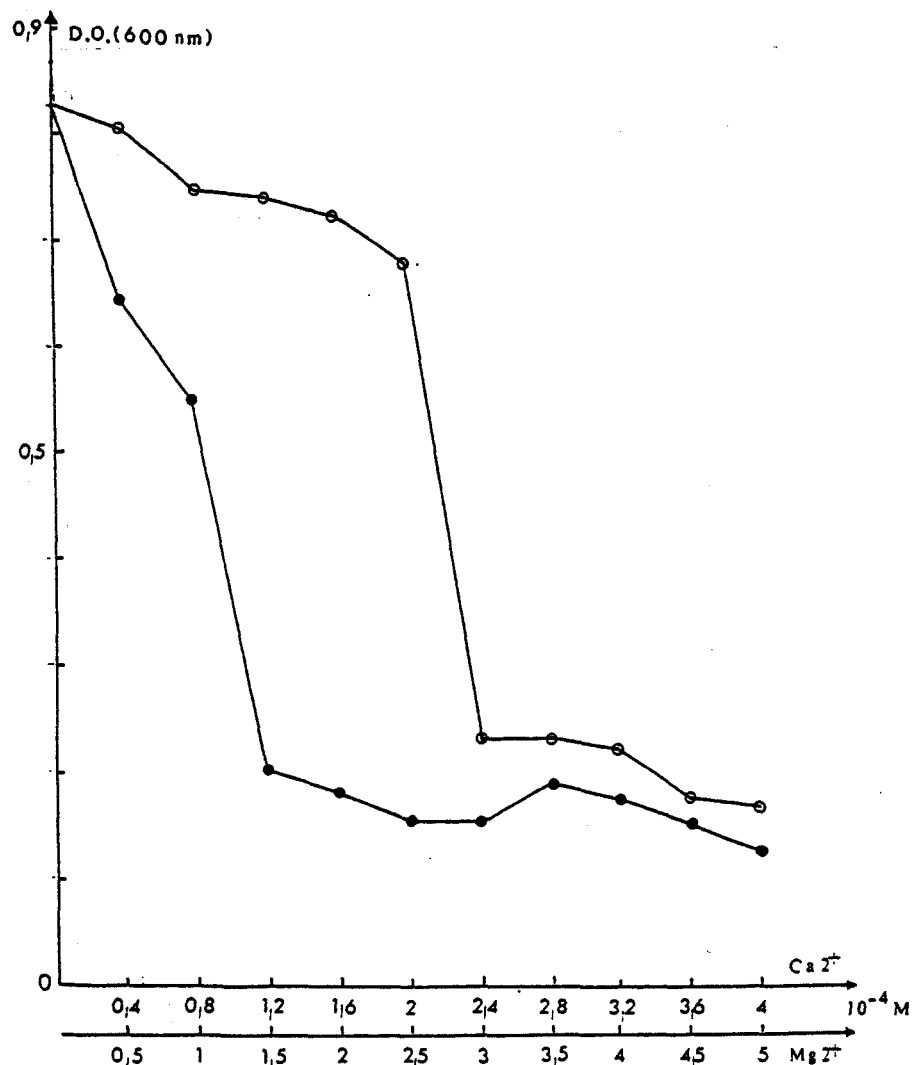


Figure 25 - Lyses de cultures de *R. meliloti* en milieu RHBI par les phages CM3 et CM4, en fonction de la concentration en Ca^{2+} et Mg^{2+} , après 15 h d'incubation à 30°C.

- : CM3
- : CM4

Or, le milieu complet RC présente l'inconvénient de contenir de l'extrait de levure, produit de composition complexe et plus ou moins constante. Il serait donc intéressant de pouvoir utiliser un milieu synthétique qui a pour avantage de rendre plus rigoureuse et plus aisée la reproductibilité des travaux. Mais, pour certains phages tels que CM1 et NM2, l'activité lytique est fortement diminuée. Ainsi, les courbes de la figure 26 montrent que la densité optique de la suspension bactérienne initiale n'est abaissée que de moitié en 15 h lorsque nous employons le milieu synthétique RHBI fructosé même si les concentrations en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sont respectées.

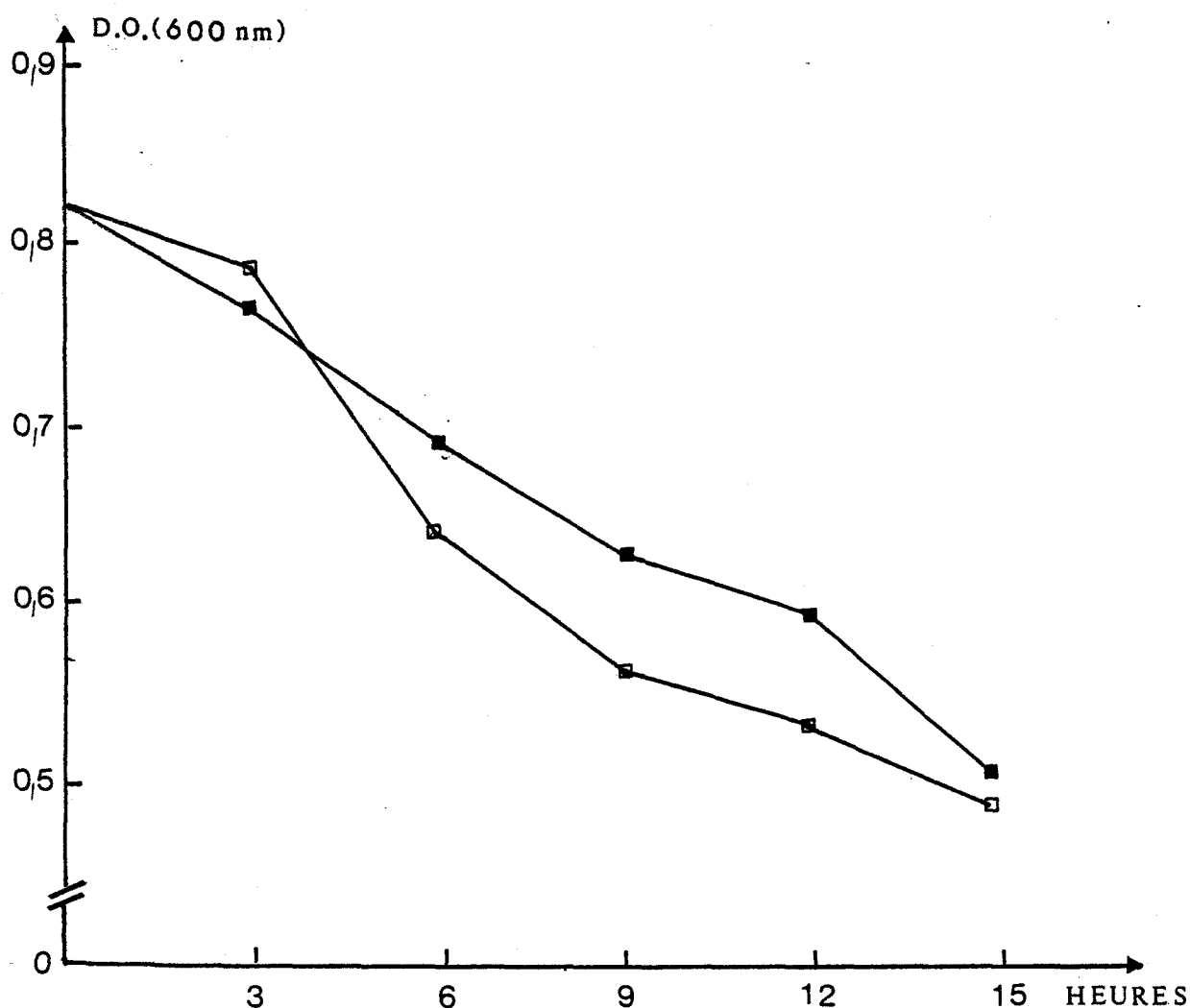


Figure 26 - Lyses de cultures de *R. meliloti*, en milieu RHBI, par les phages CM1 et NM2, après 15 h d'incubation à 30°C, en présence de Ca^{2+} (0,4 mM) et Mg^{2+} (0,5 mM).

□ : CM1
 ■ : NM2

Afin d'obtenir des lyses importantes et rapides, nous avons, en conclusion, préféré l'emploi du milieu complexe RC fructosé additionné d'ions Ca^{2+} et Mg^{2+} aux concentrations finales respectives de 0,40 mM et 0,50 mM.

2 - Multiplicité d'infection

La rencontre entre les phages et les bactéries relève du hasard. Néanmoins, la probabilité pour que cet événement se produise est évidemment influencée par le nombre de phages et de bactéries en présence, dans un volume donné. Le rapport phages/bactéries constitue la multiplicité d'infection. En principe, plus le rapport est élevé, plus il y a de bactéries infectées, mais cela ne signifie pas que la multiplication du virus sera aisée. En effet, si un grand nombre de phages s'attachent sur chaque bactérie, celle-ci peut être détruite avant la multiplication des virions. C'est le phénomène de lyse externe ou lyse par l'extérieur ("lysis from without") (DELBRUCK, 1940), du à des enzymes lytiques phagiques telle que la protéine gp5 du bactériophage T4, qui causerait des trous dans la paroi d'*E. coli* (KAO et McCLAIN, 1980).

Par ailleurs, HAAR *et al.* (1981) ont rapporté une inhibition du développement du phage T7, sans lyse des bactéries *E. coli* B, lorsque le phage est à forte concentration. BARBE *et al.* (1982) ont également observé la mort cellulaire, sans destruction, induite par des phages à haute multiplicité d'infection chez *S. typhimurium*. Ils attribuent ces faits à des altérations de la paroi et/ou de la membrane de telle façon que la réplication et la division cellulaire sont gravement perturbées.

Nous avons donc recherché la multiplicité d'infection la plus favorable pour un développement rapide et important de nos phages. Nous rapportons ici les résultats obtenus lors de l'infection de *R. meliloti* M11S par le phage NM8, en présence de Ca^{2+} (0,40 mM) et Mg^{2+} (0,50 mM).

La lyse est suivie par mesure de la densité optique à 600 nm durant 15 h. La figure 27 montre les courbes correspondantes aux six multiplicités d'infection choisies. Dans tous les cas, après l'infection au temps 0, les bactéries continuent à croître, la DO_{600} augmente puis, lorsque les phages se sont multipliés à l'intérieur des cellules, celles-ci éclatent et la DO_{600} chute. Enfin, la DO_{600} remonte à nouveau, mettant en évidence la culture de mutants naturels résistants au phage.

Le tableau 9 donne les résultats des dénombrements de phages effectués en fin d'expérience. Ils sont confrontés avec les concentrations phagiques initiales (temps 0). Le rapport établit un rendement qui peut être comparé puisque le nombre de bactéries infectées au temps 0 est identique (cf. courbes de la figure 27 - $DO_{600} = 0,35$ correspond à environ $4 \cdot 10^8$ bactéries/ml).

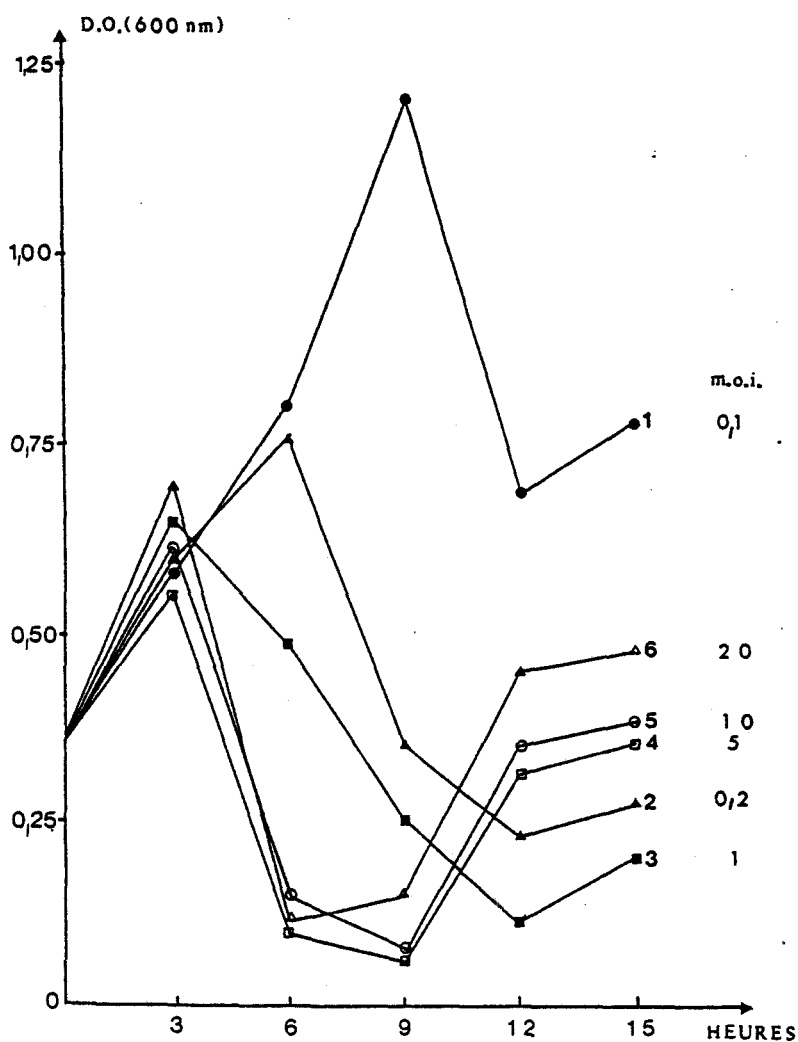


Figure 27 - Cinétiques de lyse d'une culture de *R. meliloti* M11S par le phage NM8 en fonction de la multiplicité d'infection.

Multiplicité d'infection m.o.i.	0,1	0,2	1	5	10	20
Nombre de phages/ml après 15 h de lyse	1.10^9	2.10^9	8.10^9	$2,5.10^{10}$	2.10^9	$8,5.10^8$
Nombre de phages/ml au temps $t = 0$	5.10^7	10^8	5.10^8	$2,5.10^9$	5.10^9	1.10^{10}
Rendement	20	20	16	10	0,4	0,085
Courbe de lyse correspondante (Fig. 27)	1	2	3	4	5	6

Tableau 9 - Concentrations phagiques obtenues après 15 h de lyse, en fonction de la multiplicité d'infection (*R. meliloti* M11S, Φ NM8).

Toutefois, il ne doit pas être confondu avec le rendement individuel de toute cellule infectée, celui-ci étant largement variable.

L'analyse de ces résultats indique que la multiplicité d'infection influence la lyse des bactéries et la concentration en phages obtenue.

Pour les multiplicités d'infection les plus basses (0,1 ; 0,2 ; 1), la lyse est plus lente et moins importante mais les rendements en phages sont les plus élevés.

A l'inverse, les multiplicités d'infection plus élevées (5, 10, 20) fournissent des rendements faibles en phages mais des lyses rapides et importantes. La chute de la DO_{600} semble indiquer une lyse due au développement du phage, peut-être accompagnée d'une lyse externe plus ou moins importante. Les phages libérés sont alors neutralisés par adsorption sur des débris bactériens, leur prolifération étant ainsi freinée.

Pour la suite de nos travaux, nous avons donc évité les multiplicités d'infection trop élevées ou trop faibles. Nous avons le plus souvent adopté un compromis entre l'efficacité de la lyse et le titre du stock de phages en choisissant des multiplicités d'infection entre 0,2 et 5 phages par bactérie.

B. - Cinétiques de lyse

1 - En biophotomètre

Nous avons appliqué les résultats précédents à une étude systématique, en biophotomètre, de la lyse liquide de 16 bactériophages de notre collection.

Les souches bactériennes propagatrices sont cultivées en milieu RC fructosé jusqu'à une $DO_{600} \approx 0,3$ ($4 \cdot 10^8$ bactéries/ml). Puis on ajoute, seul ou ensemble, les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} (0,4 mM et 0,5 mM en concentrations finales respectives) et on infecte par les phages avec une multiplicité d'infection égale à 3. Les témoins sont constitués par la culture de la souche propagatrice, avec et sans phages. L'évolution des cultures est suivie durant 10 h dans un biophotomètre.

La figure 28 donne les courbes obtenues pour les phages NM8 et CM1. La présence simultanée du calcium et du magnésium est indispensable à une lyse totale, rapide dans le cas de CM1, beaucoup plus lente (> 10 h) pour NM8. Le calcium seul autorise une lyse partielle tandis que le magnésium seul ou l'absence de cations rend l'infection phagique inopérante.

Le tableau 10 exprime les durées des phases de lyses pour les 16 phages, dans les différentes conditions expérimentales. La durée de la lyse dépend du phage. Elle s'étend de 3 h (phage CM4) à 10 h (phage NM9). La présence des ions Ca^{2+} est indispensable dans tous les cas. On constate même que pour certains phages (NM9, NM2, CM6, CM21), la seule présence du calcium permet une lyse aussi complète que lorsque les deux ions sont ajoutés ensemble. Toutefois, dans la majorité des exemples, la présence conjointe de Ca^{2+} et Mg^{2+} amène les lyses les plus importantes et les plus rapides. Le magnésium seul n'a permis qu'une lyse tardive par le phage CM4. D'ailleurs, les témoins "bactéries + phages" ne montrent pas de lyse bien qu'ils

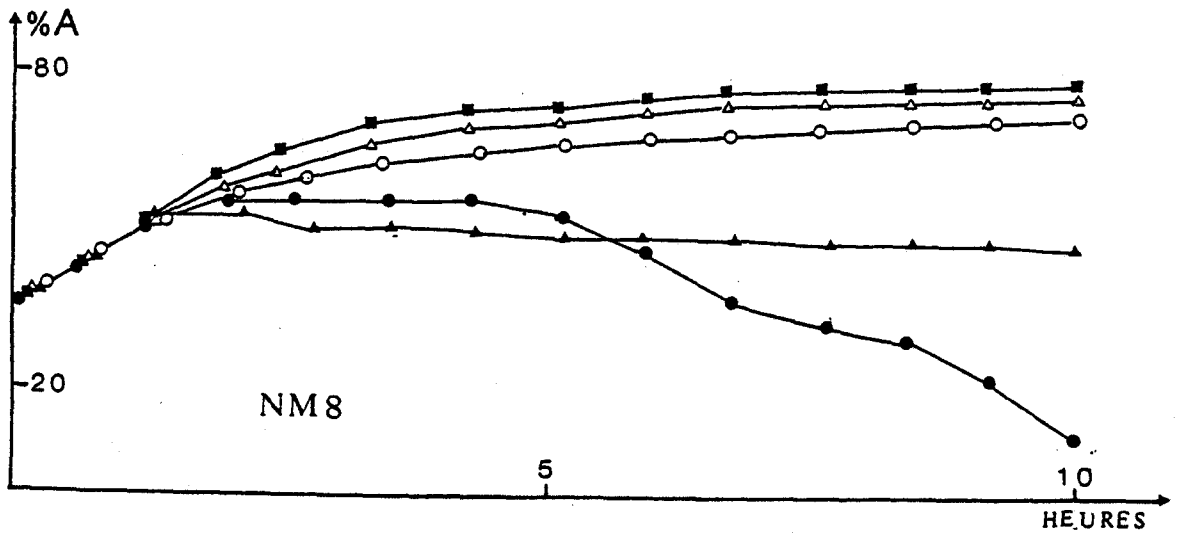
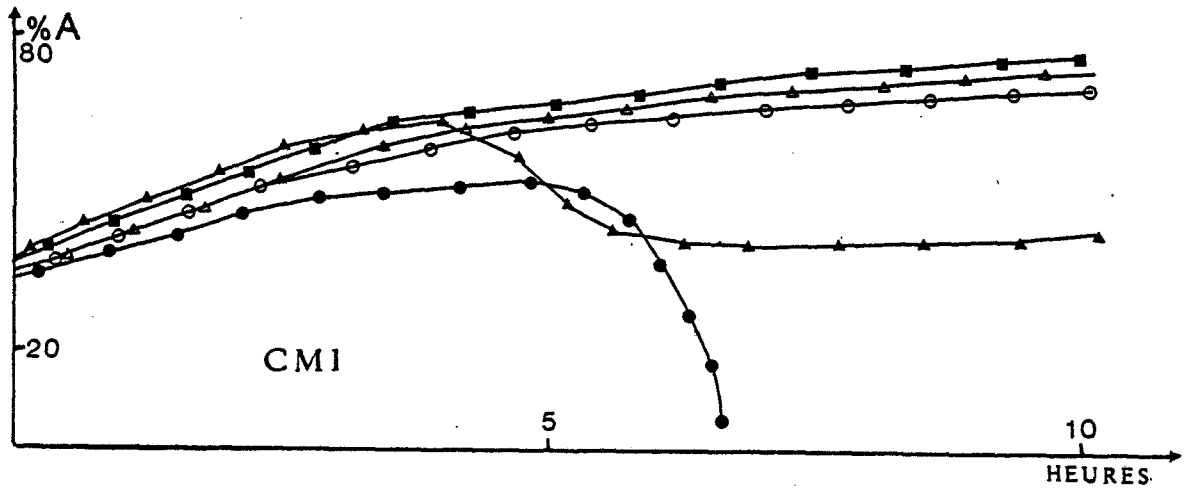


Figure 28 - Lyses de *R. meliloti* par les phages CMI et NM8, en fonction de la présence des ions Ca²⁺ et Mg²⁺.

- Témoïn : culture de la souche propagatrice.
- Phages + Bactéries + Ca²⁺ + Mg²⁺
- ▲ Phages + Bactéries + Ca²⁺
- Phages + Bactéries + Mg²⁺
- △ Phages + Bactéries

Phages	Témoin : culture de la souche propagatrice	Phages + bactéries + Ca ²⁺ + Mg ²⁺	Phages + bactéries + Ca ²⁺	Phages + bactéries + Mg ²⁺	Phages + bactéries
NM6	M9S	6,5	5,5	-	-
NM2	M9S	5,0	5,0	-	-
NM7	M9S	5,0	6,0	-	-
NM8	M11S	11,0	-	-	-
NM3	M11S	5,5	9,0	-	-
NM4	M11S	8,5	10,5	-	-
NM9	M11S	10,0	10,0	-	-
CM2	M11S	6,0	8,5	-	-
CM3	M12S	3,5	5,0	-	-
CM9	M13S	8,0	9,5	-	-
CM6	M11S	6,5	6,5	-	-
CM4	M13S	3,0	5,0	- ou 10	-
CM5	M18S	6,5	7,5	-	-
CM1	M12S	6,5	6,5	-	-
CM20	M12S	7,0	10,0	-	-
CM21	M12S	8,0	8,0	-	-

Tableau 10 - Durée de la phase de lyse (en heures) en fonction des ions Ca²⁺ et Mg²⁺.

- : pas de lyse.

contiennent du magnésium, provenant du milieu RC, mais en concentration trop faible (0,1 mM).

Il ressort de cette étude que si l'optimisation de la lyse demande des ions calcium et magnésium, ce qui confirme les résultats précédents, le calcium seul est presque toujours suffisant. Il est possible qu'il soit l'activateur majeur de la lyse phagique, le magnésium agissant surtout sur la physiologie bactérienne. Or, on sait que *R. meliloti* voit sa croissance favorisée par le magnésium (VINCENT, 1962) et que les phages se multiplient d'autant mieux que les bactéries sont en bon état physiologique.

2 - En fermenteur

Il est connu que la multiplication phagique est d'autant plus aisée que la croissance de la bactérie propagatrice est favorisée. Une croissance bactérienne rapide diminue les temps de latence et de lyse et permet un rendement maximal en virions. Or, les conditions de culture utilisées précédemment peuvent être améliorées par une meilleure aération du milieu. En effet, les appareils d'agitation de cultures liquides produisent une oxygénation faible qui ne permet pas une croissance optimale de bactéries aérobies telle que *R. meliloti*. Par contre, le transfert d'oxygène est beaucoup plus important en fermenteur. Nous avons donc réalisé des lysats par cette technique.

La lyse bactérienne est suivie par la mesure de l'oxygène dissous et la densité optique à 600 nm.

La figure 29 donne un exemple des résultats obtenus.

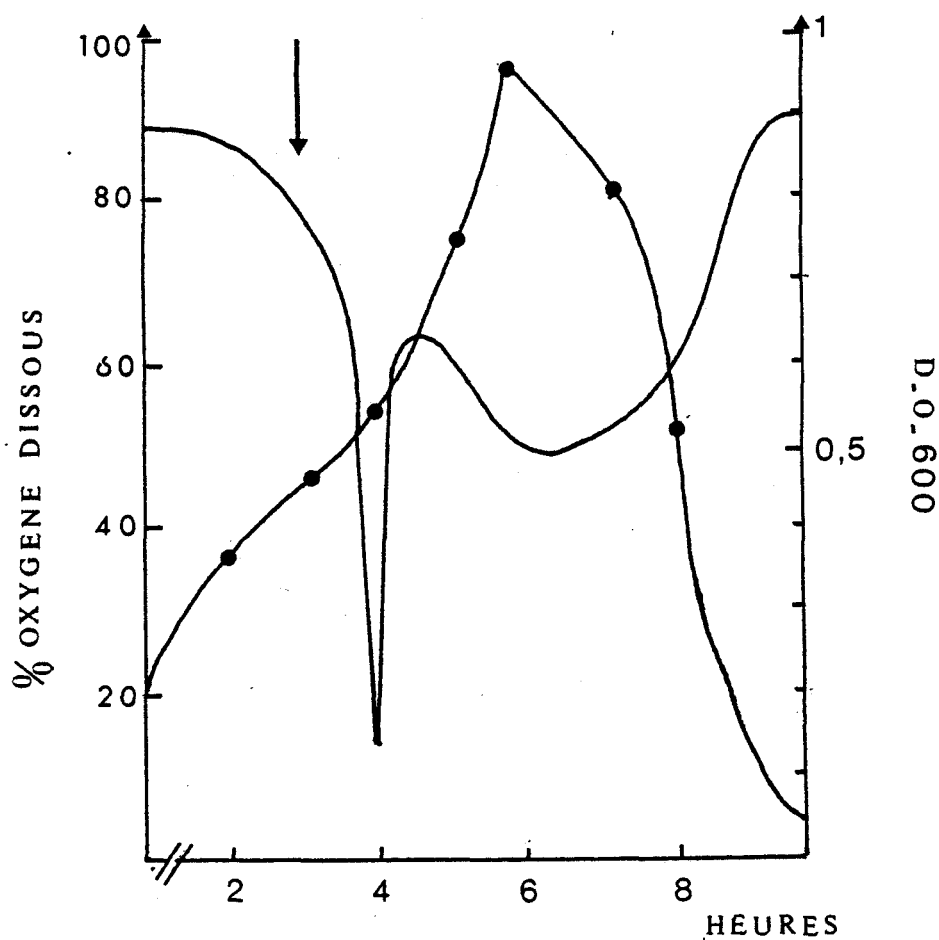


Figure 29 - Variations, en fonction du temps, du pourcentage d'oxygène dissous et de la densité optique lors de la production du phage NM8.M11S, en fermenteur.

↓ addition du phage.

La préculture de *R. meliloti* est placée dans le fermenteur pour obtenir une $DO_{600} = 0,2$ ($2 \cdot 10^8$ bactéries/ml). Le débit d'air, maintenu constant durant l'expérience, est tel qu'il fournit au temps 0 un pourcentage de 90 % d'oxygène dissous. Les bactéries proliférantes consomment de l'oxygène dissous dont le pourcentage diminue. La phase exponentielle de croissance est atteinte après environ 3 h de fermentation. La suspension de phages est ajoutée à ce moment (multiplicité d'infection = 0,2). Agitation et aération sont arrêtées durant 20 min pour permettre l'adsorption des phages. Le

métabolisme bactérien entraîne une diminution très importante de l'oxygène dissous dont la valeur du pourcentage, au moment de l'addition du phage, est approximativement restaurée lorsque l'aération et l'agitation sont rétablies. La consommation d'oxygène va se poursuivre durant environ 2 h accompagnant la multiplication des bactéries. Enfin, la lyse bactérienne se produit. Elle se traduit par la chute de la densité optique. A $DO_{600} = 0,05$, la lyse est complète et le milieu devient presque limpide. Durant ce temps, le pourcentage d'oxygène dissous remonte à sa valeur maximale puisqu'il n'y a plus assez de bactéries pour le consommer de manière significative.

Cette méthode présente l'avantage de fournir des volumes importants de suspensions virales contenant de 10^{12} à 10^{13} UFP/ml. Ces lysats peuvent aussi être concentrés en fin de culture (WERQUIN et al., 1984).

C. - Développement intracellulaire

1 - Adsorption

L'adsorption est la première étape du cycle infectieux. Elle peut être définie comme l'attachement des phages sur les surfaces bactériennes de telle façon qu'ils sédimenteront ensemble (ADAMS, 1959). Nous l'étudierons en détail dans le chapitre suivant.

2 - Production des virions

a) Multiplication en une seule étape

Le développement viral comprend plusieurs étapes jusqu'à la libération des phages produits dans la cellule infectée. Deux paramètres sont ici intéressants pour caractériser un système phage-bactérie :

- la période de latence qui est le temps entre l'infection de la bactérie et l'apparition des nouveaux phages libres. Elle dépend du phage, de l'état physiologique bactérien, du milieu mais surtout du temps de génération de l'hôte. En général, chez des bactéries à taux de croissance élevé, le temps de latence pourra être d'environ 20 min. Dans le cas contraire, il

peut être très long, 5 à 17 h, voire 30-40 h chez des Cyanophycées (FOX et al., 1976) ;

- le rendement individuel de toute cellule infectée ("burst size") dépend des mêmes paramètres sauf du temps de génération de l'hôte. Il est calculé pour des populations bactériennes mais en fait il varie entre de larges limites, d'une cellule à l'autre, sans raisons apparentes : de 20 à 1 000 pour le phage T1 (DELBRUCK, 1945), de 500 à 10 250 chez des phages à ARN (WATANABE et WATANABE, 1970).

Ces paramètres peuvent être mesurés par la même expérience dite de multiplication en une seule étape ("one step growth") dont nous rapportons deux exemples intéressant les rhizobiophages NM8.M11S et CM1.M12S (fig. 30).

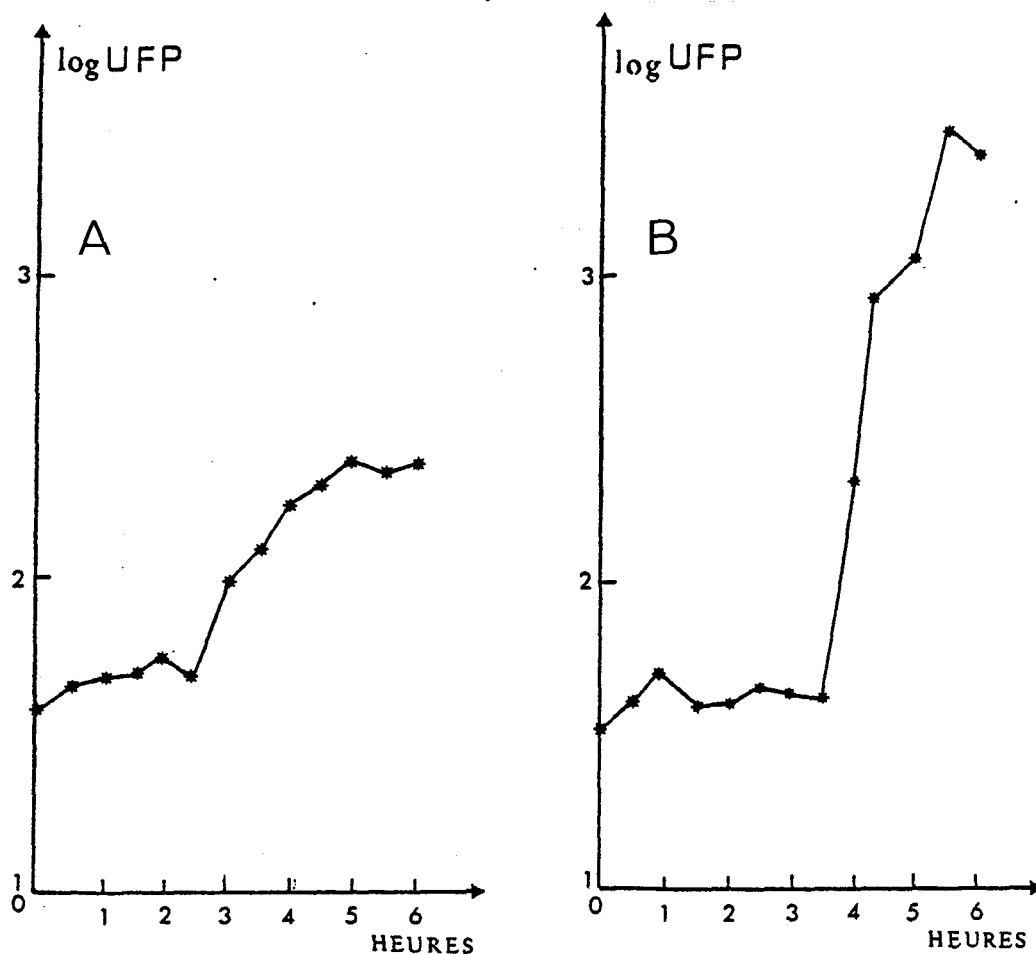


Figure 30 - Multiplication en une seule étape des phages NM8.M11S (A) et CM1.M12S (B).

Sur le tableau 11, nous avons reporté la durée de la phase de latence et le rendement individuel moyen pour quelques phages. Les résultats sont homogènes en ce qui concerne les phages à queue non contractile de type NM : le temps de latence est de l'ordre de 2h15 min, le nombre de phages produits par bactérie est faible dans tous les cas. Chez les phages à queue contractile CM1, CM20, CM21, le rendement moyen est nettement plus élevé et identique pour les trois phages. On observe des fluctuations dans la durée des phases de latence. Par contre, le phage CM3 a une phase de latence courte et le nombre de phages libérés est le double de celui observé chez les phages du même morphotype.

Phages et hôtes	Durée de la période de latence	Rendement individuel moyen
NM8.M11S	2h00 - 2h30	12
NM6.M9S	2h20 - 2h30	18
NM2.M9S	2h00 - 2h20	19
NM7.M9S	2h20 - 2h40	11
CM3.M12S	1h40 - 2h00	111
CM1.M12S	3h40 - 4h00	57
CM20.M12S	4h20 - 4h40	59
CM21.M12S	2h00 - 2h20	58

Tableau 11 - Temps de latence et rendement individuel moyen de quelques phages de *R. meliloti*.

b) Etude en microscopie électronique

La morphogénèse du phage Φ CM1.M12S a été observée en microscopie électronique à deux périodes du cycle lytique. La première se situe dans la phase de latence (1h45 après l'infection), la seconde au cours de la libération des phages néoformés (4h45 après l'infection). Les microphotographies sont consignées dans la planche 6 de l'Annexe I.

Au cours de la phase d'éclipse, les têtes du phage apparaissent en trois principales densité de coloration (photos A et B) :

- les structures blanches sont des capsides au début de leur biosynthèse ;
- les particules grises sont des têtes qui se remplissent. L'ADN s'y trouve à différentes concentrations, ce qui donne une gamme de gris, du plus clair au plus foncé ;
- les particules noires sont peu nombreuses. Il s'agit de capsides possédant déjà beaucoup d'ADN. Néanmoins, à ce stade, si des têtes peuvent être remplies, le phage n'est certainement pas terminé. On remarque également que le nucléoplasme des bactéries infectées semble plus ou moins désorganisé (photo C).

Après 4h45, la plupart des cellules sont lysées, des phages libres sont observés en grandes quantités ainsi que de nombreux débris cellulaires : membranes enroulées, ribosomes, résidus cytoplasmiques (photo D). Les phages sont libérés par éclatement de la bactérie, sous l'effet de l'accumulation des phages et probablement d'enzymes lytiques associées. Les structures externes bactériennes restent intactes jusqu'à la lyse, comme c'est généralement le cas chez les bactéries à Gram-négatif (BRADLEY, 1971 ; LICKFELD *et al.*, 1976). Les cellules intactes, bourrées de virions, ne montrent pas de distribution topographique particulière des phages (photo E). Les queues de phages sont rarement visibles, le plus souvent à la fin du cycle lytique (photo F).

D. - Restriction-Modification

1 - Mise en évidence

L'utilisation de plusieurs souches de *R. meliloti* et de rhizobiophages nous a rapidement mis en présence de variations de la spécificité d'hôte des virions. La nature phénotypique de ces modifications a déjà été observée chez six souches de *R. leguminosarum* (SCHWINGHAMER, 1965). Elles se concrétisent par des différences importantes dans les dénombrements des plages de lyse et

il s'agit, le plus souvent, de la manifestation de système de Restriction-Modification (R/M).

Le tableau 12 indique les efficacités d'étalement "E" obtenues pour le phage Φ NM8 multiplié sur différentes souches de *R. meliloti*. Ainsi, le phage Φ NM8.M11S voit son efficacité d'étalement réduite à 10^{-7} et 10^{-10} lorsque *R. meliloti* M5N1 et M19S sont respectivement utilisés comme hôtes, indiquant que ces souches restreignent la multiplication du phage. Cette restriction disparaît après un cycle de croissance sur ces bactéries où l'on obtient une concentration maximale en phages ($E = 1$) maintenant nommés Φ NM8.M5N1 et Φ NM8.M19S. Il s'agit donc bien d'un phénomène de R/M selon les critères définis par LURIA (1953).

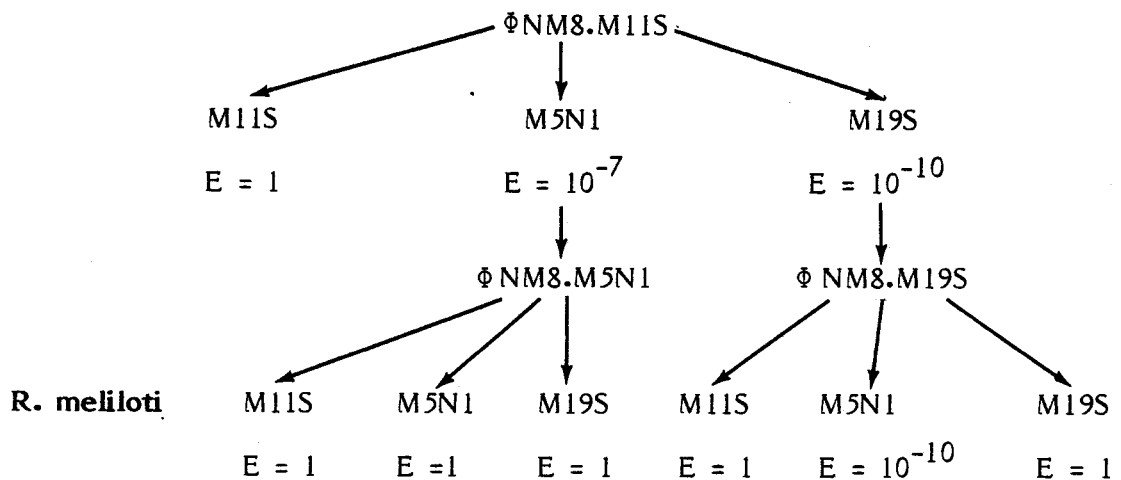


Tableau 12 - Efficacité d'étalement (E) du phage NM8 sur diverses souches de *R. meliloti* et en fonction de son dernier hôte.

De plus, ces différences d'efficacité d'étalement ne peuvent pas provenir d'un défaut d'adsorption puisque nous avons montré, par ailleurs, que, par exemple, le phage Φ NM8 s'adsorbe aussi bien sur *R. meliloti* M11S que sur M5N1 (cf. fig. 33, p. 158).

Si Φ NM8.M19S est à nouveau fortement restreint par *R. meliloti* M5N1, il s'exprime pleinement sur *R. meliloti* M11S ($E = 1$). Dans ce cas, il est possible que l'ADN de ce phage n'ait pas de séquences nucléotidiques reconnaissables par les enzymes de restriction de *R. meliloti* M11S ou encore que cette bactérie soit génétiquement déficiente vis-à-vis de la restriction. Mais il est

aussi envisageable que cet ADN phagique possède des modifications apportées par *R. meliloti* M19S, situées sur les sites d'action des enzymes de restriction de *R. meliloti* M11S. Dans ce cas, il existerait une similitude entre des systèmes R/M possédés par les bactéries M11S et M19S. Nous pouvons faire les mêmes remarques pour ce qui concerne ces bactéries et le phage Φ NM8.M5N1.

Il apparaît donc que plusieurs systèmes R/M pourraient rendre compte du comportement des bactéries vis-à-vis des phages. L'éventualité de la coexistence de quelques systèmes au sein d'une même souche peut d'ailleurs être envisagée. En effet, *R. meliloti* possède généralement des plasmides et parfois un phage lysogène susceptibles de contenir l'information génétique pour des systèmes R/M dont les effets s'additionneraient aux effets des systèmes R/M d'origine chromosomique.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier la répartition de systèmes R/M dans un échantillon de souches bactériennes.

2 - Répartition des systèmes R/M

L'étude de la répartition des systèmes R/M a été abordée de deux façons d'ailleurs complémentaires : la mesure directe de l'efficacité d'étalement et l'utilisation d'un modèle mathématique.

Pour un petit nombre de souches bactériennes et virales, l'exploitation des coefficients d'efficacité d'étalement (E) permet de proposer une répartition plausible de systèmes R/M communs ou différents au sein des bactéries. Prenons l'exemple rapporté dans le tableau 13.

R. meliloti	Phages		
	ϕ NM8.M11S	ϕ NM4.M5N1	ϕ CM8.M14S
M11S		1	$3,2 \cdot 10^{-5}$
M5N1	$1,8 \cdot 10^{-7}$		$3,8 \cdot 10^{-5}$
M14S	10^{-9}	1	

Tableau 13 - Coefficients d'efficacité d'étalement (E) des phages NM8, NM4 et CM8 sur **R. meliloti** M11S, M5N1 et M14S.

Si on considère **R. meliloti** M11S, il accepte la multiplication de phages dont l'ADN a été modifié par la souche M5N1 ($E = 1$) mais pas par M14S ($E = 3,2 \cdot 10^{-5}$). Par contre, les souches M5N1 et M14S appliquent une forte restriction sur l'ADN du phage NM8.M11S. Un tel phénomène peut s'expliquer si **R. meliloti** M11S et M5N1 possèdent un système R/M commun, que nous appelons A, et que chacune des souches M5N1 et M14S possèdent au moins un système, nommé B, différent du précédent. Cette répartition est schématisée dans le tableau 14.

R. meliloti	Systèmes R/M	
	A	B
M11S	●	
M5N1	●	●
M14S		●

Tableau 14 - Schéma de répartition de deux systèmes R/M dans les 3 souches de **R. meliloti** M11S, M5N1 et M14S.

Le système B, commun aux souches M14S et M5N1, permet au phage NM4.M5N1 d'avoir une efficacité totale sur *R. meliloti* M14S. De plus, le système A est celui qui provoque la restriction du phage CM8.M14S par *R. meliloti* M5N1 ($E = 1,8 \cdot 10^{-7}$). Ainsi, les deux systèmes A et B de R/M suffisent à expliquer les relations entre les trois souches bactériennes et leurs phages.

Une autre façon d'aborder le problème est d'appliquer une adaptation de la modélisation mathématique proposée par SOUROUILLE (1978) et BOUSSEMAER *et al.* (1980) pour étudier la distribution de multiples systèmes R/M chez les Streptocoques lactiques.

Pour cela, il faut que les coefficients d'efficacité d'étalement E, rapportés dans le tableau 13, expriment le fonctionnement des systèmes R/M, à l'exclusion de la non-adsorption des phages et de la lysogénie.

Nous avons donc pris la précaution d'utiliser les résultats d'expériences où il y a eu effectivement un développement de phages modifiés. La proportion de phages qui échappent à l'action simultanée de plusieurs systèmes de restriction est le produit des taux de restriction de ces systèmes. Par souci de simplification, nous admettrons, pour tous les systèmes, un taux de restriction (tp) constant dont l'ordre de grandeur moyen est 10^{-3} . Cette valeur signifie que l'ADN du phage a 999 chances sur 1 000 d'être détruit. Etant donné la concentration des suspensions virales utilisées, environ 10^{10} phages/ml, on ne peut pas mettre en évidence plus de trois systèmes R/M différents entre deux souches bactériennes.

Enfin, en raison de la nature des mesures du tableau 13, entachées d'incertitudes importantes, c'est le cologarithme décimal du coefficient d'efficacité d'étalement qui est le paramètre utilisé : de ce fait, les erreurs deviennent additives plutôt que multiplicatives.

Nous obtenons ainsi le tableau 15, dont chaque élément d_{ij} exprime la destruction du phage homologue de j par l'action additive des p systèmes R/M de la bactérie i et que ne possède pas j puisque, évidemment, des systèmes communs s'annulent. Etant donné que chaque système p a un coefficient de

restriction $C_p = \log_{10} \frac{1}{t_p}$, d_{ij} est la somme des coefficients de restriction C_p de telle façon que :

- la bactérie i possède le système R/M p ,
- la bactérie j ne possède pas le système R/M p ,

d'où :
$$d_{i,j} = \sum_{p=1}^{p=n} C_p x_{i,p} (1 - x_{j,p})$$

$$d_{i,j} = C_p [x_{i1}(1 - x_{j1}) + x_{i2}(1 - x_{j2}) + \dots + x_{in}(1 - x_{jn})]$$

n = nombre de systèmes R/M

C_p = coefficient de restriction du système p fixé ici à

$$C_p = \log_{10} \frac{1}{10^{-3}} = 3$$

x_{ip} = 1 ou 0 selon que la bactérie i possède ou ne possède pas le système p

x_{jp} = 1 ou 0 selon que la bactérie indicatrice du phage j possède ou ne possède pas le système p .

R. meliloti	Phages			
	NM8.M11S	NM4.M5N1	CM8.M14S	
M11S		0	4,5	$i = 1$
M5N1	6,7		4,4	$i = 2$
M14S	9	0		$i = 3$
	$j = 1$	$j = 2$	$j = 3$	

Tableau 15 - $d_{ij} = \log_{10} \frac{1}{E}$

E = coefficient d'efficacité d'étalement (tab. 13).

Il est maintenant possible de déterminer le nombre de systèmes R/M que possède la souche bactérienne i et que ne possède pas la souche homologue du phage j . On obtient le tableau 16 donnant les rapports $k_{ij} = d_{ij}/C_p$, arrondis aux valeurs entières :

$$k_{ij} = x_{i1} (1 - x_{j1}) + x_{i2} (1 - x_{j2}) + \dots + x_{in} (1 - x_{jn})$$

R. meliloti	Phages			
	NM8.M11S	NM4.M5N1	CM8.M14S	
M11S		0	1	$i = 1$
M5N1	2		1	$i = 2$
M14S	3	0		$i = 3$
	$j = 1$	$j = 2$	$j = 3$	

Tableau 16 - $k_{ij} = d_{ij}/C_p$.

C_p = coefficient de restriction = 3.

A partir des valeurs de k_{ij} , on obtient les coordonnées x_{ip} des bactéries en résolvant le système d'équations suivant :

1) $i = 1, j = 2$

$$0 = x_{11} (1 - x_{21}) + x_{12} (1 - x_{22}) + x_{13} (1 - x_{23})$$

2) $i = 1, j = 3$

$$1 = x_{11} (1 - x_{31}) + x_{12} (1 - x_{32}) + x_{13} (1 - x_{33})$$

3) $i = 2, j = 1$

$$2 = x_{21} (1 - x_{11}) + x_{22} (1 - x_{12}) + x_{23} (1 - x_{13})$$

4) $i = 2, j = 3$

$$1 = x_{21} (1 - x_{31}) + x_{22} (1 - x_{32}) + x_{23} (1 - x_{33})$$

5) $i = 3, j = 1$

$$3 = x_{31} (1 - x_{11}) + x_{32} (1 - x_{12}) + x_{33} (1 - x_{13})$$

6) $i = 3, j = 2$

$$0 = x_{31} (1 - x_{21}) + x_{32} (1 - x_{22}) + x_{33} (1 - x_{23})$$

Les valeurs des inconnues x_{ip} satisfaisant le mieux à ces équations permettent d'établir le tableau 17. Toutefois, on remarque que l'équation 5 n'est pas égale à 3 mais à 2. Comme les coefficients d'efficacité d'étalement sont obtenus de façon approximative, toutes les données qui en découlent sont elles aussi approximatives. Nous accepterons donc cette inexactitude.

	$i = 1$	$i = 2$	$i = 3$	
R. meliloti	M11S	M5N1	M14S	
(A)	$x_{11} = 1$	$x_{21} = 1$	$x_{31} = 0$	$p = 1$
	$x_{12} = 0$	$x_{22} = 1$	$x_{32} = 1$	(B) $p = 2$
	$x_{13} = 0$	$x_{23} = 1$	$x_{33} = 1$	$p = 3$

Tableau 17 - Ensemble des coordonnées x_{ip} des souches M11S, M5N1, M14S de **R. meliloti**

On constate dans ce tableau que deux sous-ensembles se dégagent, pouvant correspondre à deux systèmes R/M :

- A est commun aux souches M11S et M5N1,
- B est commun aux souches M14S et M5N1.

Notons que cette répartition est conforme à celle que nous avons proposée auparavant (tab. 14). Il faut aussi remarquer que nous ne distinguons que deux systèmes R/M au lieu de trois prévus ($p = 3$). Un tel résultat peut aussi être dû aux erreurs de dénombrements que nous avons ignorées et qui peuvent changer les valeurs de k_{ij} . De plus, la fixation arbitraire d'un coefficient de restriction (C_p), constant pour tous les systèmes R/M, crée une rigidité qui ne permet pas d'affiner leur identification.

A partir de ces premiers résultats, il nous a paru intéressant d'étendre cette étude basée sur une modélisation mathématique en ajoutant une quatrième bactérie et le phage homologue, aux trois couples précédemment étudiés.

Nous avons également tenu compte des imprécisions inhérentes aux dénombrements de phages et considéré qu'elles pouvaient faire varier les coefficients d'efficacité d'étalement (E) en les multipliant ou divisant par 2, ce qui entraîne différentes possibilités pour certaines valeurs de d_{ij} et k_{ij} . Toutes ces données sont regroupées dans le tableau 18.

Enfin, l'introduction d'une quatrième bactérie dans l'échantillon permet aussi de détecter un éventuel quatrième système R/M, soit $p = 4$.

Nous avons conservé les coordonnées x_{ip} des souches M11S, M5N1 et M14S pour déterminer celles de la souche M12S, mais l'extension de la série amène des opérations mathématiques fastidieuses et difficiles à réaliser manuellement. Nous avons donc utilisé un programme d'analyse informatisé "EUREKA" pour la mise en évidence des solutions possibles. Celle qui a été retenue est présentée dans le tableau 19.

R. meliloti	Phages			
	i = 1	i = 2	i = 3	i = 4
	NM8.M11S	NM4.M5N1	CM8.M14S	CM20.M12S
i = 1 M11S		E = 1 d = 0 k = 0	$1,6 \cdot 10^{-5} < E < 6,4 \cdot 10^{-5}$ 4,1 < d < 4,7 k = 1	$0,7 \cdot 10^{-6} < E < 3 \cdot 10^{-6}$ 5,5 < d < 6,1 k = 1 ou 2
i = 2 M5N1	$0,9 \cdot 10^{-7} < E < 3,6 \cdot 10^{-7}$ 6,4 < d < 7 k = 2	.	$1,9 \cdot 10^{-5} < E < 7,6 \cdot 10^{-5}$ 4,1 < d < 4,7 k = 1	$1,5 \cdot 10^{-7} < E < 6 \cdot 10^{-7}$ 6 < d < 7 k = 2
i = 3 M14S	$5 \cdot 10^{-10} < E < 2 \cdot 10^{-9}$ 8,6 < d < 9,3 k = 2 ou 3	E = 1 d = 0 k = 0		$10^{-6} < E < 4 \cdot 10^{-6}$ 5,3 < d < 6 k = 1 ou 2
i = 4 M12S	$5 \cdot 10^{-5} < E < 2 \cdot 10^{-4}$ 3,6 < d < 4,3 k = 1	$10^{-6} < E < 4 \cdot 10^{-6}$ 5,3 < d < 6 k = 1 ou 2	$1,5 \cdot 10^{-7} < E < 6 \cdot 10^{-7}$ 6 < d < 7 k = 2	

Tableau 18 - Valeurs des coefficients d'efficacité d'étalement E, d_{ij} et k_{ij} pour les phages NM8, NM4, CM8 et CM20 et les souches M11S, M5N1, M14S et M12S de **R. meliloti**.

On note que valeur expérimentale \approx E < valeur expérimentale x 2.

	i = 1	i = 2	i = 3	i = 4	
R. meliloti	M11S	M5N1	M14S	M12S	
(A)	$x_{11} = 1$	$x_{21} = 1$	$x_{31} = 0$	$x_{41} = 1$	(C) p = 1
	$x_{12} = 0$	$x_{22} = 1$	$x_{32} = 1$	$x_{42} = 0$	p = 2
	$x_{13} = 0$	$x_{23} = 1$	$x_{33} = 1$	$x_{43} = 0$	p = 3
	$x_{14} = 0$	$x_{24} = 0$	$x_{34} = 0$	$x_{44} = 1$	(D) p = 4

Tableau 19 - Ensemble des coordonnées x_{ip} des souches de **R. meliloti** M11S, M5N1, M14S, M12S.

Dans l'ensemble des coordonnées x_{ip} , on peut distinguer des sous-ensembles figurant 4 systèmes R/M caractéristiques, par analogie avec les critères biologiques. Ainsi, on retrouve les systèmes A et B déjà mis en évidence précédemment. Les systèmes C et D s'ajoutent pour rendre compte des propriétés de **R. meliloti** M12S. Cette représentation nous semble la plus proche de la réalité biologique représentée par les parentés et les différences entre les bactéries, vis-à-vis de la restriction.

Dans le cadre de cette étude, il ne nous a pas paru nécessaire de poursuivre l'exploitation de ce modèle mathématique, en particulier pour le calcul des valeurs des coefficients de restriction C_p de chacun des systèmes. Nos résultats suffisent à montrer que l'activité R/M est particulièrement efficace chez **R. meliloti** puisque dans de nombreux cas la protection contre les phages non spécifiques est particulièrement forte. Nous rejoignons les travaux de HEUMANN *et al.* (1984) mettant en évidence le rôle important des systèmes R/M dans le maintien de l'identité génétique de cinq classes de Rhizobiaceae. Par ailleurs, WILLIAMS *et al.* (1989) indiquent que **R. meliloti** Rm41 et SU47 ont des systèmes de restriction différents qui réduisent l'efficacité d'un phage transducteur. De même, la transformation est affectée (KISS et KALMAN, 1982). Si l'impact biologique est incontestable, il faut pourtant remarquer que seules trois endonucléases de restriction, de spécificité partiellement connue,

avaient été répertoriées dans le genre *Rhizobium* (ROBERTS, 1986), avant la caractérisation de RleA1, une enzyme de type IIS, provenant de *R. leguminosarum* (VESELY et al., 1990).

Il semble que des obstacles d'ordre biochimique, d'ailleurs signalés mais non précisés par HEUMAN et al. (1984), sont responsables de cette indigence. Ces difficultés, concernant l'extraction, la purification, la stabilité et l'activité de ces enzymes, ont également été rencontrées dans notre laboratoire. En 1985, OUAHAL a mis en évidence des propriétés montrant que *R. meliloti* pourrait posséder au moins une endonucléase de type III. Cependant, il n'a obtenu que des digestions complètes des ADN non modifiés, concluant que la présence simultanée de plusieurs endonucléases, éventuellement associées à une activité exonucléasique, pouvait provoquer la dégradation complète de l'ADN.

Il semble donc que les Rhizobiaceae possèdent des capacités de restriction-modification importantes, autorisant la survie et la préservation de l'identité génétique, en relation avec une écologie tellurique caractérisée par les compétitions entre les microorganismes indigènes.

3 - Aspects physiologiques de la restriction-modification

a) Apparition de nucléotides dans le lysat

La libération de nucléotides, provenant de la restriction de l'ADN du phage suivie d'une digestion nucléasique non spécifique, a été montrée en mesurant l'absorbance à 260 nm de la fraction dialysable d'une culture en milieu synthétique de *R. meliloti* M5N1 infectée par le phage Φ NM8.M11S. Un pic d'absorbance apparaît très vite puis décroît (fig. 31).

Il se produit une dégradation d'ADN et une excrétion de nucléotides dans les 15 min suivant l'infection. Puis, la baisse de l'absorbance est probablement due à l'incorporation des nucléotides par les bactéries. Quant à la culture témoin de *R. meliloti* M11S, infectée par le phage homologue Φ NM8.M11S, bien que n'ayant pas d'activité de restriction, elle montre une légère et tardive libération de nucléotides pour laquelle nous n'avons pas d'explication satisfaisante.

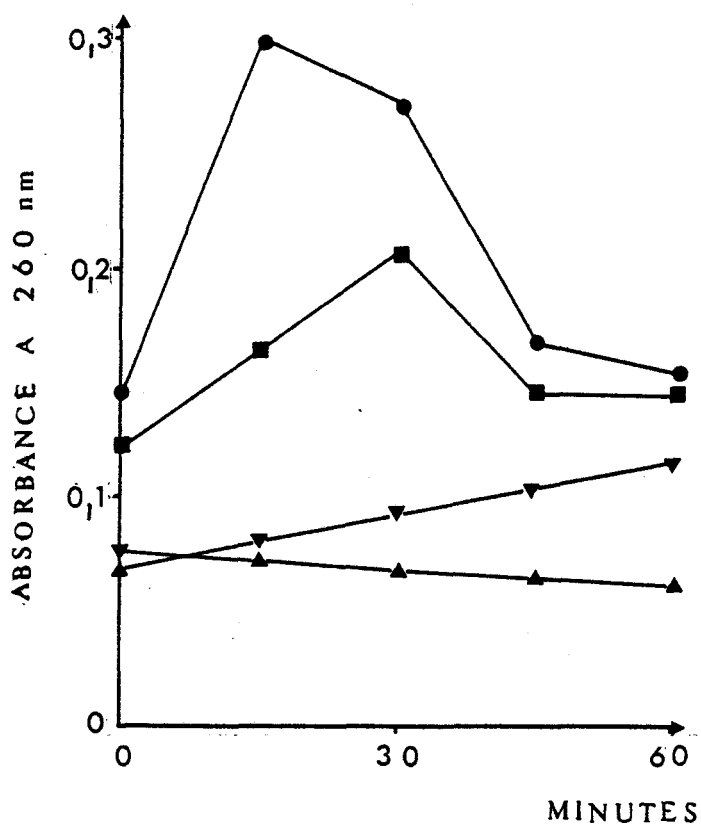


Figure 31 - Absorbance à 260 nm des fractions dialysables.

● *R. meliloti* M5N1 infecté par ϕ NM8.M11S ; ■ *R. meliloti* M11S infecté par ϕ NM8.M11S ; ▼ *R. meliloti* M5N1 ; ▲ *R. meliloti* M11S.

b) Effet de la croissance bactérienne et du milieu de culture

L'état physiologique bactérien est souvent important dans les interactions cellulaires. Il est d'abord dépendant de l'âge de la culture et de la nature du milieu. Nous avons donc étudié l'influence de ces deux paramètres sur la restriction d'un rhizobiophage (fig. 32).

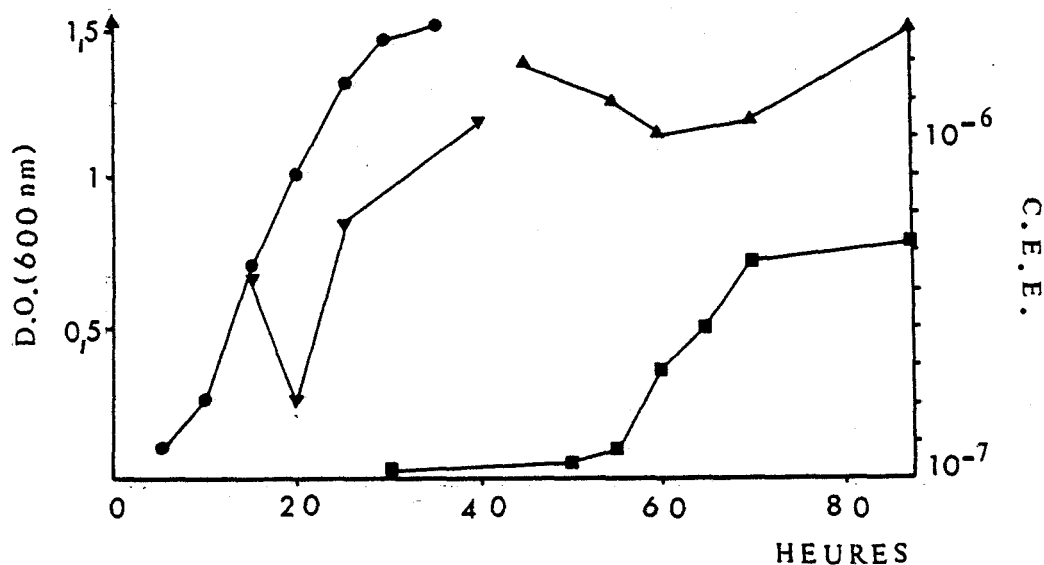


Figure 32 - Effet du milieu de culture et de la croissance de *R. meliloti* M5N1 sur la restriction.

● croissance de *R. meliloti* M5N1 sur milieu RC ; ▼ coefficient efficacité d'étalement de ϕ NM8.M11S sur ces cellules ; ■ croissance de *R. meliloti* M5N1 sur milieu R ; ▲ coefficient efficacité d'étalement de ϕ NM8.M11S sur ces cellules.

Le phage ϕ NM8.M11S subit une restriction plus importante de la part de *R. meliloti* M5N1 lorsque cette souche est en phase exponentielle de croissance dans un milieu complet (RC fructosé). Le coefficient d'efficacité d'étalement passe de $6 \cdot 10^{-7}$ à $2 \cdot 10^{-7}$ puis il remonte jusqu'à atteindre 10^{-6} quand la culture aborde la phase stationnaire. Un plus grand nombre de phages échappe à la restriction donc celle-ci est amoindrie. On obtient un résultat similaire avec des bactéries cultivées dans un milieu minimum synthétique mais, en outre, les coefficients d'efficacité d'étalement sont plus élevées ($3 \cdot 10^{-6}$ à 10^{-6}), ce qui indique une restriction moindre.

c) Effet de la température et du chloramphénicol

Dans le but d'obtenir des informations complémentaires sur les propriétés des facteurs responsables de la destruction de l'ADN des phages, nous avons étudié l'influence de la température et du chloramphénicol puis recherché la restauration de l'activité de restriction dégradée.

Dans un premier temps, nous avons choisi la température et le temps de chauffage capable d'agir sur la restriction mais sans tuer les bactéries. A la faveur d'essais préliminaires, nous avons sélectionné une température de 45°C et nous avons chauffé les cellules de *R. meliloti* M5N1 durant 1, 2 et 3 min avant d'éprouver la restriction sur le phage Φ NM8.M11S (tab. 20).

	Temps de chauffage à 45°C			Témoin non chauffé
	1 min	2 min	3 min	
Efficacité d'étalement	3.10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	4.10^{-7}

Tableau 20 - Efficacité d'étalement de Φ NM8.M11S sur les cellules chauffées de *R. meliloti* M5N1.

L'efficacité d'étalement augmente avec la durée du traitement. Trois minutes à 45°C suffisent pour diminuer la restriction d'environ 100 fois sans affecter notablement le nombre de bactéries vivantes.

De la même manière, nous avons vérifié qu'une concentration en chloramphénicol de 50 μ g/ml, appliquée durant 15 min, n'avait pas d'effet létal important sur *R. meliloti* mais abaissait fortement la restriction.

Si on retarde l'infection par les phages après le traitement thermique ou antibiotique, on constate que le pouvoir de restriction se restaure, jusqu'à retrouver la même intensité que chez les bactéries non traitées, au bout de 150 min (tab. 21). Ce qui représente, dans nos conditions expérimentales, un temps de génération de *R. meliloti*. UETAKE et al. (1964) ont rapporté des observations similaires chez *S. anatum*.

Intervalle de temps entre le traitement et le dénombrement du phage (min)	Efficacité d'étalement de Φ NM8.M11S sur les cellules de R. meliloti M5N1 traitées	
	45°C - 3 min	CAL 50 µg/ml - 15 min
0	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
5	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^{-5}$
20	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$
40	$2,7 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$
150	$3,0 \cdot 10^{-7}$	$3,0 \cdot 10^{-7}$
Cellules non traitées	$3,0 \cdot 10^{-7}$	

Tableau 21 - Restauration de la restriction chez des cellules de **R. meliloti** M5N1 après traitement au chloramphénicol ou chauffage.

En conclusion, la dégradation de l'ADN d'un phage non homologue par une souche de **R. meliloti** est donc un phénomène qui se produit rapidement après l'infection. Cette restriction sera d'autant plus importante que la bactérie est en bon état physiologique, c'est-à-dire en phase exponentielle de croissance d'une culture en milieu complet. L'activité est fortement réduite par la chaleur. Le chloramphénicol, inhibiteur de la synthèse des protéines, produit le même effet. Ces perturbations disparaissent après une génération bactérienne.

Ces résultats suggèrent que ce(s) système(s) de restriction sont thermosensibles et qu'ils sont restaurés, **de novo**, par une synthèse protéique.

CHAPITRE II

ADSORPTION DES PHAGES DE R. MELILOTI ET
INTERACTIONS AVEC LES STRUCTURES EXTERNES

I. - ETUDE GENERALE DE L'ADSORPTION

A. - Cinétiques d'adsorption

L'adsorption est habituellement mesurée en centrifugeant un mélange de bactéries et de phages et en dénombrant les phages libres dans le surnageant. Généralement, lorsqu'on utilise des concentrations de l'ordre de 10^8 bactéries/ml et 10^7 à 10^9 phages/ml, 90 % des phages sont adsorbés en quelques minutes.

Nous nous sommes placé dans ces conditions usuelles (multiplicité d'infection = 1) en respectant les exigences requises par nos systèmes expérimentaux pour étudier quelques cinétiques d'adsorption de phages de *R. meliloti*. Ainsi, dans le cas de Φ NM8.M11S (fig. 33), on remarque la rapidité de l'adsorption puisque le nombre de phages libres diminue très rapidement dès les premières minutes de contact avec les cellules de la souche indicatrice M11S. Par contre, l'accrochage est un peu moins rapide sur une autre souche, M5N1. L'adsorption varie donc avec l'hôte. On observe aussi d'autres modalités. L'adsorption peut être initialement rapide puis augmenter progressivement (fig. 34, A) ou être moins efficace et évoluer plus lentement (fig. 34, B).

Toutefois, la facilité avec laquelle les phages étudiés s'adsorbent sur les bactéries-hôtes suggère que les récepteurs sont aisément accessibles. A partir des cinétiques, le calcul des constantes d'adsorption s'avère donc utile pour vérifier cette hypothèse.

B. - Constantes d'adsorption

La constante d'adsorption, dans un système phage-bactérie, est proportionnelle aux concentrations bactériennes et virales. Elle dépend aussi d'autres facteurs (composition du milieu, pH, température, etc...) qu'il convient d'uniformiser dans les différents systèmes utilisés afin de calculer les constantes d'adsorption.

Les valeurs obtenues (tab. 22), de l'ordre de 10^{-9} ml/min, pour quelques rhizobiophages sont très proches de celles rapportées pour le phage RL4 de *R.*

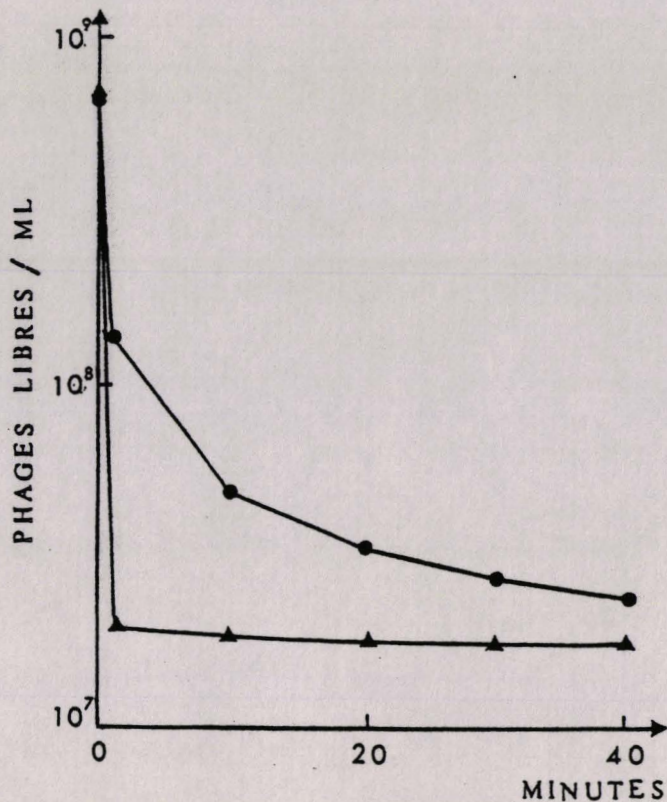


Figure 33 - Cinétiques d'adsorption de Φ NM8.M11S sur *R. meliloti* M11S (▲) et M5N1 (●).

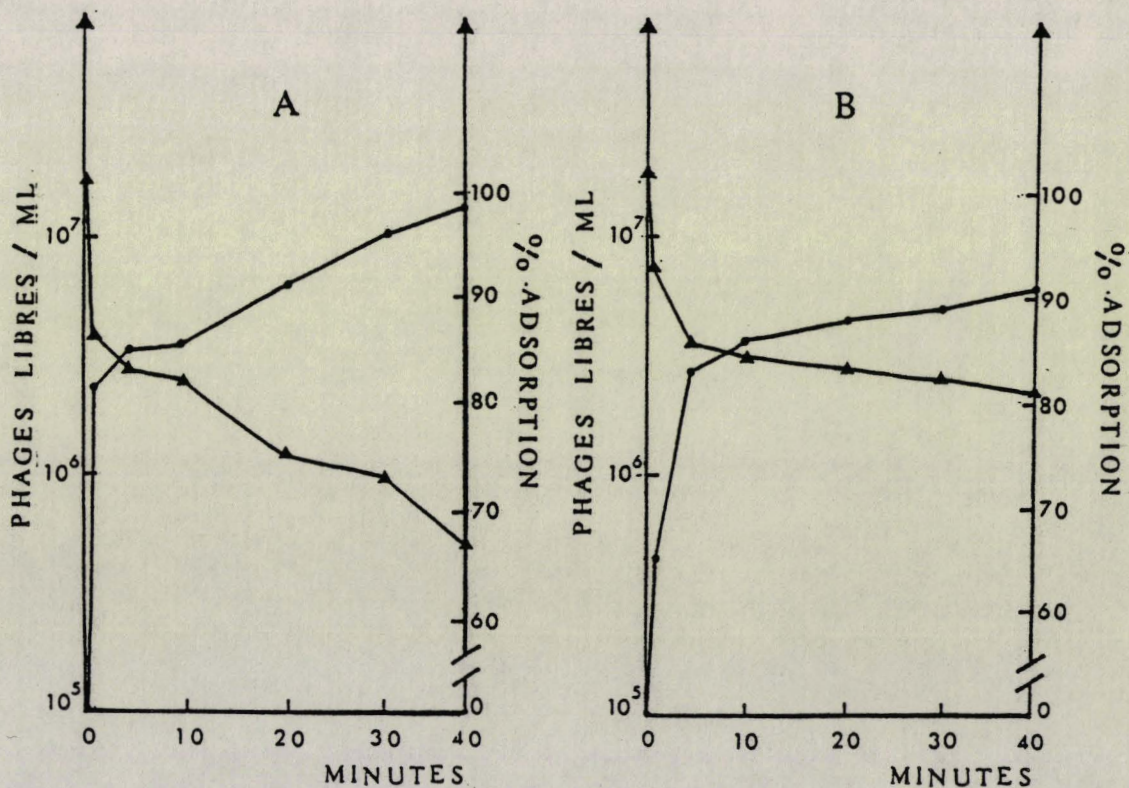


Figure 34 - Cinétiques et pourcentages d'adsorption des phages NM7.M9S (A) et NM6.M9S (B).

leguminosarum ($k : 0,54 \cdot 10^{-9}$ ml/min) (DHAR **et al.**, 1987) ou les phages spécifiques de *B. japonicum* USD117 ($k = 1,38 \cdot 10^{-9}$ ml/min et $3,99 \cdot 10^{-9}$ ml/min) (HASHEM **et al.**, 1986).

Phages	Constantes d'adsorption (10^{-9} ml/min)
Φ NM8.M11S	4,2
Φ CM1.M12S	3,0
Φ NM6.M9S	1,3
Φ NM7.M9S	2,7

Tableau 22 - Constantes d'adsorption de phages de *R. meliloti* à $t = 1$ min.

Les constantes sont en accord avec celles attribuées à de nombreux groupes phagiques, en particulier d'autres phages caudés (ACKERMAN et DUBOW, 1987). Il s'agit de constantes élevées, indiquant des sites d'adsorption faciles à atteindre. A contrario, les plus faibles valeurs ($k = 0,03 \cdot 10^{-9}$ ml/min) ont été constatées dans le genre *Inovirus*, ceci étant sans doute le fait de l'adsorption de ce phage à l'extrémité d'un pilus relativement inaccessible.

Il apparaît que l'adsorption de nos phages se réalise facilement. Ceci suggère des sites très accessibles et certainement nombreux. Nous avons ainsi recherché le nombre de phages susceptibles de se fixer sur une bactérie.

C. - Détermination du nombre de phages pouvant s'adsorber sur une bactérie

1 - Détermination théorique

Si on considère que :

- *R. meliloti* M11S est un bacille schématisé par un cylindre mesurant en moyenne 2μ de longueur et $0,6 \mu$ de largeur, muni de deux extrémités hémisphériques,

- le phage Φ NM8 possède une capsid qui s'inscrit dans une sphère de $d = 640 \text{ \AA}$ de diamètre et une queue de $l = 1100 \text{ \AA}$,

le nombre de phages pouvant s'adsorber à la surface de la bactérie est donné par le rapport entre la surface d'une enveloppe localisée à la distance $d/2 + l$ de la bactérie et la section de la sphère incluant la tête phagique (MENICHI et BUU, 1983) (fig. 35). On peut ainsi théoriquement placer environ 2 700 phages sur une cellule de *R. meliloti*.

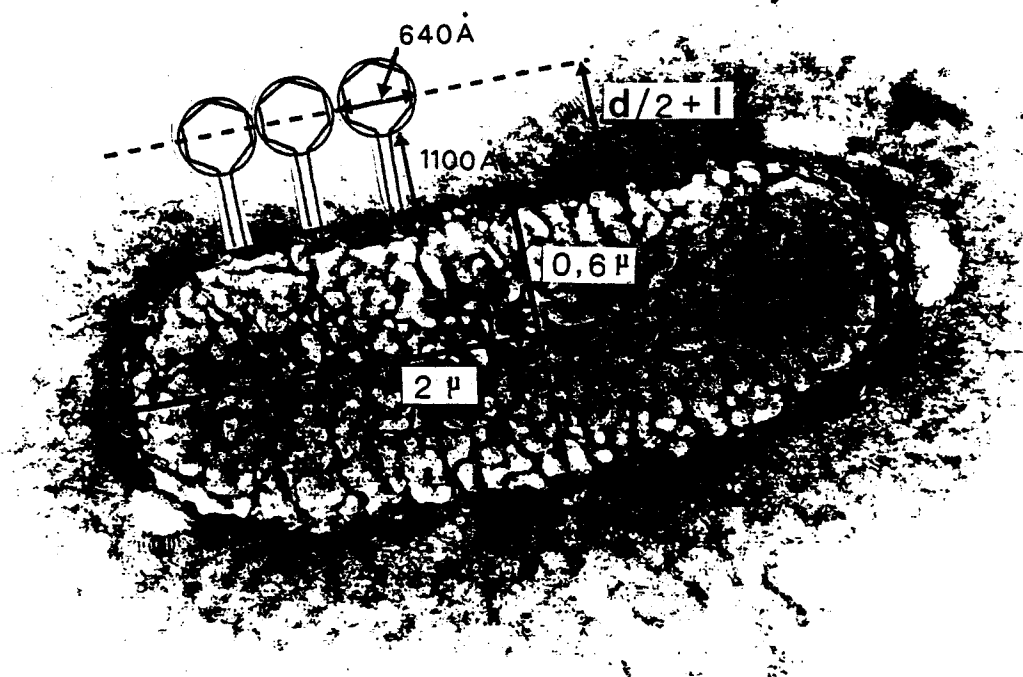


Figure 35 - Représentation schématique de l'adsorption des phages NM8 sur *R. meliloti* M11S.

2 - Détermination expérimentale

Afin de vérifier l'hypothèse précédente, nous avons mélangé des phages et des bactéries à différentes multiplicités d'infection et déterminé le pourcentage d'adsorption.

La figure 36 montre que lorsqu'on met de 10 à 2 000 phages par bactérie, tous les virions parviennent à s'adsorber (92 à 97 %). Puis quand la multiplicité d'infection s'élève, le taux d'adsorption diminue, ce qui pourrait signifier que nous avons atteint un seuil de saturation. Ainsi, un seul *R. meliloti* M11S serait susceptible de fixer de 2 000 à 3 000 phages. Etant donné que dans la réalité les phages ne se disposent pas de manière idéale à la surface de la bactérie, cette valeur est compatible avec celle de la détermination théorique.

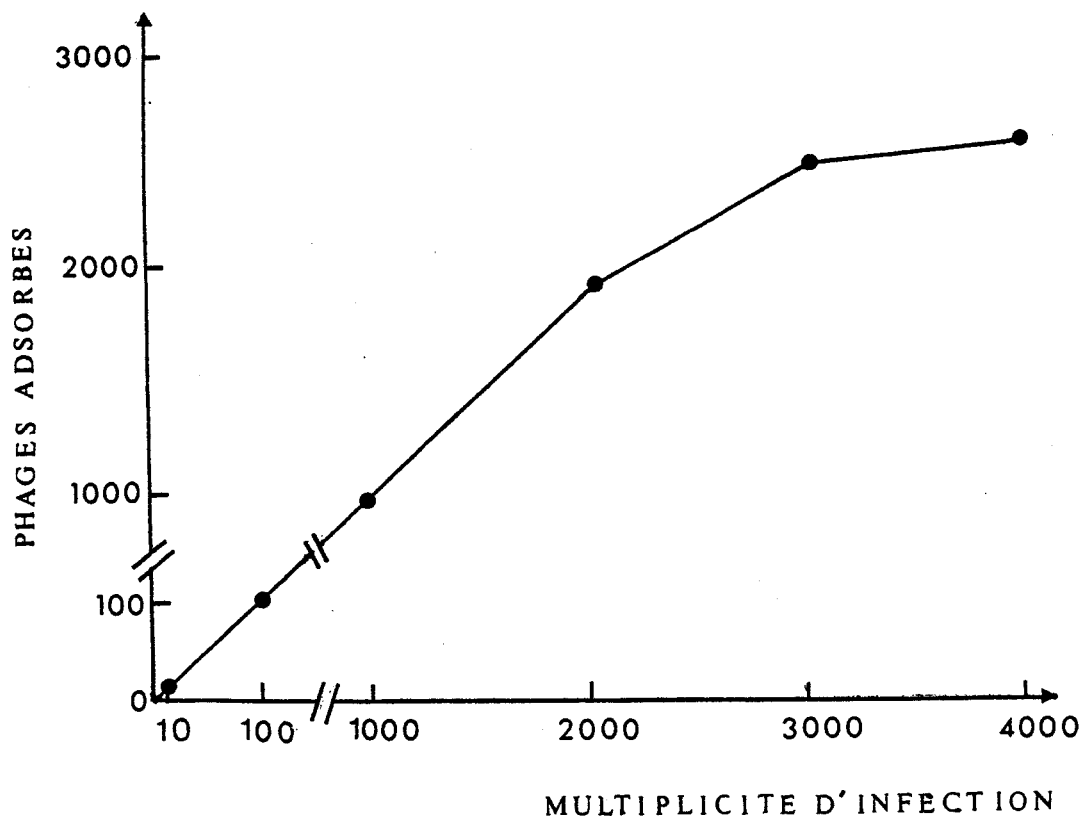


Figure 36 - Estimation expérimentale du nombre de phages NM8 pouvant s'adsorber sur *R. meliloti* M11S.

Ces arguments sont en faveur de l'existence de nombreux sites d'adsorption facilement accessibles aux phages. Parmi les structures externes de la bactérie, les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides donnent la réponse la plus favorable à ces critères. Nous avons donc envisagé leur rôle dans la relation phage-*R. meliloti*.

II. - INTERACTIONS ENTRE LES PHAGES ET LES EXOPOLYSACCHARIDES DE R. MELILOTI

A. - Synthèse d'EPS et inhibition de l'adsorption

Etant les plus externes, les EPS sont évidemment les premières structures rencontrées par les rhizobiophages. Nous avons donc étudié leurs interactions.

On observe que les EPS synthétisés par *R. meliloti* M11S s'accumulent dans le milieu complet RC fructosé et parallèlement, le pourcentage d'adsorption des phages ϕ NM8.M11S diminue au cours du temps. Il n'est plus que de 50 % au 6ème jour de culture, le milieu contenant moins de 1 mg/ml d'EPS.

Puis, dans nos conditions expérimentales, cette concentration augmente jusqu'à 4 mg/ml tandis que, au 12ème jour, les phages ne s'adsorbent plus.

Ce polysaccharide est soluble et peut être éliminé par centrifugations successives. Les cellules ainsi lavées retrouvent leur capacité d'adsorber les phages (fig. 37).

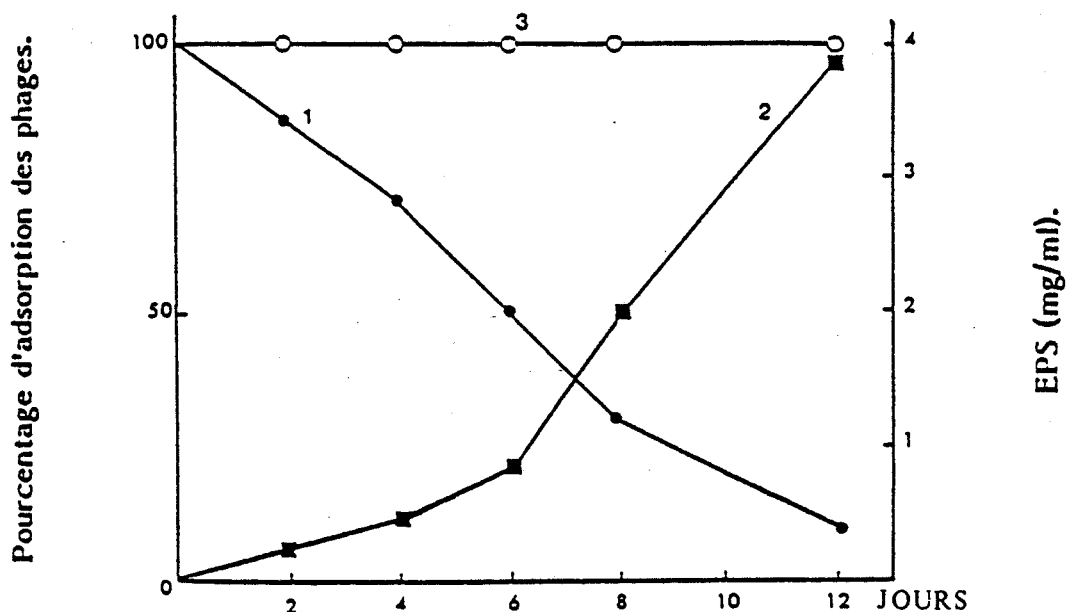


Figure 37 - ● (1) Pourcentage d'adsorption du phage ϕ NM8.M11S sur les cellules de *R. meliloti* M11S en fonction du temps.
 ■ (2) Synthèse d'exopolysaccharides par des bactéries de la souche M11S placées en condition de prolifération.
 ○ (3) Pourcentage d'adsorption du phage ϕ NM8.M11S sur les cellules de *R. meliloti* M11S lavées après des temps de culture différents.

L'examen des cultures de **R. meliloti** en microscopie électronique montre qu'au delà de 48 h d'incubation, les fibrilles polysaccharidiques qui s'entrecroisent forment un réseau de plus en plus dense où sont emprisonnées ces bactéries (Annexe I, Planche 2, Photos C, D, E).

Les EPS peuvent empêcher les phages de s'adsorber sur les récepteurs bactériens en réalisant un barrage mécanique. Par contre, après leur élimination par centrifugation, nous observons des cellules nues dont les structures pariétales ne sont plus masquées (Annexe I, Planche 2, Photo F). Ceci est en corrélation avec une adsorption du phage NM8 entièrement restaurée. Il s'avère donc que les EPS de **R. meliloti**, synthétisés en quantité importante, inhibent l'adsorption phagique. Cette constatation est contraire à ce qui est fréquemment observé lorsque des bactériophages infectent une bactérie produisant des polysaccharides capsulaires ou extracellulaires. Les macromolécules servent alors de sites de reconnaissance et de point d'ancrage pour les virus, par l'intermédiaire d'une dépolymérase. Nous avons recherché la présence d'une telle enzyme.

B. - Activités enzymatiques associées aux phages

Nous avons d'abord comparé l'activité de plusieurs lysats phagiques différents vis-à-vis d'EPS de Rhizobiaceae. La dépolymérisation de la macromolécule est mise en évidence par la variation en fonction du temps de la viscosité relative (V_R) de la solution d'EPS soumise à l'action du phage.

Une culture de **B. japonicum** J5, contenant 350 µg/ml d'EPS, voit sa viscosité relative diminuer de 50 % en 6 min sous l'influence du phage homologue Φ J5-1, en 270 min pour le phage NM8 de **R. meliloti** et 85 min pour le phage Φ 2 de **K. pneumoniae**, utilisé comme témoin. Par contre, aucun de ces phages ne montre d'activité sur une solution d'EPS de **R. meliloti** M11S (tab. 23).

Durée d'action (en min) du lysat phagique pour que la solution d'EPS atteigne une $V_R = 50\%$			
Lysats phagiques			
	Φ J5-1	Φ 2	Φ NM8
Culture de B. japonicum (350 $\mu\text{g/ml}$ d'EPS)	6	85	270
EPS de R. meliloti (5 mg/ml)	Pas de variation de V_R		

Tableau 23 - Variations de la viscosité relative (V_R) de solutions d'EPS de **B. japonicum** J5 et **R. meliloti** M11S sous l'influence de lysats phagiques.

L'insensibilité des EPS de **R. meliloti** peut s'expliquer par l'absence d'acides uroniques qui semblent indispensables à l'activité de nombreuses dépolymérase phagiques.

On peut alors s'interroger sur la présence, chez le phage NM8, d'une enzyme apparemment inutile puisque inactive sur les EPS de sa souche propagatrice. Ceci pourrait indiquer que la lignée cellulaire, à l'origine des Rhizobiaceae, synthétisait des EPS contenant des acides uroniques sur lesquels les phages agissaient à l'aide d'une dépolymérase. Puis, au cours de l'évolution sont apparues des bactéries dont les EPS sont dépourvus d'acides uroniques et des phages qui se sont adaptés à ces hôtes nouveaux, tout en conservant une activité enzymatique originelle pourtant devenue inopérante. Mais, il est légitime d'envisager également que d'autres enzymes ont aussi pu apparaître.

Nous avons donc recherché une éventuelle activité dépolymérasique chez une douzaine de phages de **R. meliloti** appartenant aux morphotypes CM et NM définis par WERQUIN (1989), et en utilisant une solution aqueuse d'EPS de **R. meliloti** M5N1. Ceux-ci ont été choisis car ils ont une structure identique aux

EPS de la souche M11S, mais leurs conditions de production en quantités relativement importantes sont bien déterminées (COURTOIS, 1984).

Dans ces conditions, seul le lysat du phage CM1.M12S s'est révélé capable d'abaisser la viscosité du polymère en solution.

Pour approfondir l'étude de ce phénomène, nous avons réalisé des essais, en adoptant, dans un premier temps, le tampon tris-maléate 0,2 M ; pH 6 utilisé par HIGASHI et ABE (1978). Les EPS sont dissous à raison de 1,5 mg/ml. Cette concentration a été choisie afin de pouvoir rester dans les bonnes conditions de fonctionnement du tube capillaire de notre viscosimètre, définies par le constructeur (PROLABO). Le temps d'écoulement des 10 ml de l'échantillon doit être supérieur à 180 secondes. Cette solution est additionnée de 1,2 ml de lysat phagique contenant $9 \cdot 10^9$ Φ /ml et de CaCl₂ 1,3 mM en concentration finale.

Les lysats utilisés contenant les métabolites et les enzymes issus de la destruction des cellules bactériennes, nous avons d'abord vérifié si la dépolymérisation n'était pas le fait d'enzymes bactériennes. Nous avons utilisé des stocks de phages CM1, réalisés sur les souches M5N1 et M12S de *R. meliloti*.

Le témoin négatif est le phage NM8 cultivé sur les mêmes souches car il ne provoque pas de dépolymérisation. Par contre, le phage CM1, quelle que soit la souche, donne une dépolymérisation (tab. 24). Ces résultats montrent que l'activité dépolymérasique est bien d'origine phagique.

Phage - bactérie hôte	Activité dépolymérasique
NM8.M5N1	-
NM8.M12S	-
CM1.M5N1	+
CM1.M12S	+

Tableau 24 - Activité dépolymérasique liée au phage.

Ensuite, nous avons recherché les paramètres les plus favorables au fonctionnement de la dépolymérase.

Ainsi, nous avons utilisé une gamme de pH de 5,2 à 8 en tampon tris-maléate 0,2 M. La courbe de viscosité relative V_R , en fonction du pH après 48 h d'incubation à température ambiante, précise que nous obtenons la dépolymérisation la plus importante à pH 6 (fig. 38).

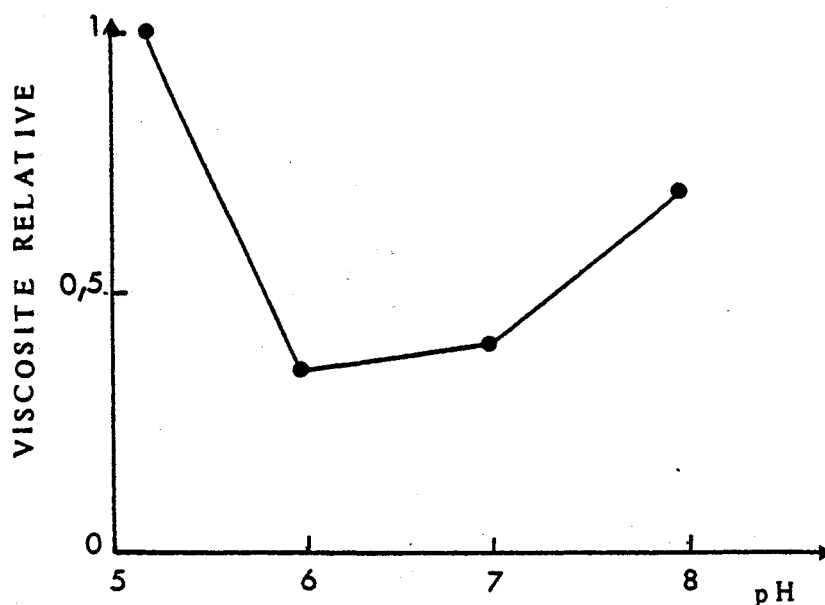


Figure 38 - Viscosité relative de l'exopolysaccharide de la souche M5N1 en présence de lysat du phage CM1.M5N1 en fonction du pH dans le tampon tris maléate 0,2 M.

Puis, nous avons étudié l'effet de la concentration du tampon pour constater que la diminution de la viscosité est plus importante pour une molarité de 0,1 M (fig. 39). Nous l'utiliserons dorénavant dans nos expériences.

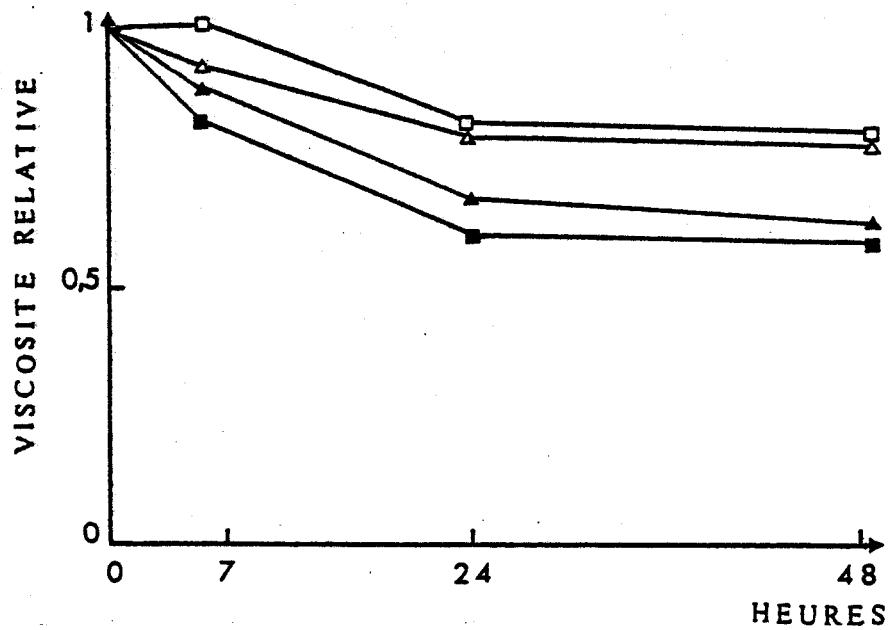


Figure 39 - Viscosité relative en fonction du temps, de l'exopolysaccharide de la souche M5N1 en présence de lysat du phage CM1.M5N1, dans le tampon tris-maléate, pH 6, à différentes molarités.

□ : 0,025 M ; △ : 0,05 M ; ▲ : 0,2 M ; ■ : 0,1 M.

Enfin, l'effet de l'EDTA à différentes concentrations a été mesuré (fig. 40).

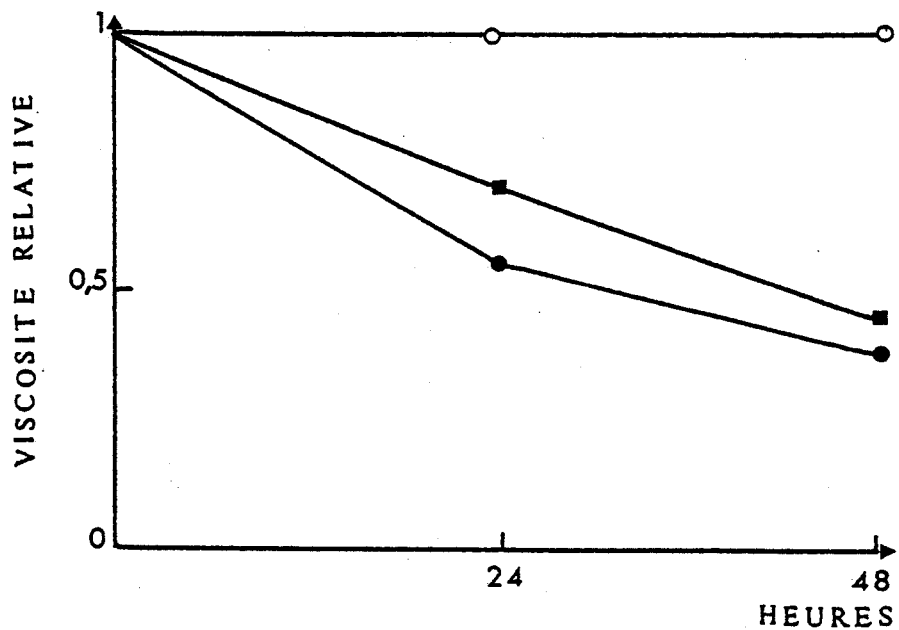


Figure 40 - Viscosité relative en fonction du temps, de l'exopolysaccharide de la souche M5N1 en présence de lysat du phage CM1.M5N1, dans le tampon tris-maléate 0,1 M, pH 6, additionné d'EDTA à différentes concentrations.

● : 0,1 mM ; ■ : 1 mM ; ○ : 10 mM.

Nous observons une inhibition totale de l'activité de dépolymérisation avec une concentration en EDTA de 10 mM puisque la viscosité de la solution d'EPS additionnée du lysat phagique ne varie pas. Ceci montre qu'à partir d'une concentration de 10 mM, tous les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} présents forment un complexe avec l'EDTA. La dépolymérase serait donc dépendante des ions divalents. Elle pourrait appartenir au groupe des métallo-enzymes.

Le plus souvent les dépolymérases phagiques coexistent sous une forme liée au phage et une forme soluble. Nous avons donc localisé notre activité. Une ultracentrifugation à 100 000 g durant 2 h a permis de séparer le phage. Le culot, récupéré dans un volume approprié de tampon tris-maléate 0,1 M, pH 6, pour donner une suspension titrant environ 10^{10} phages/ml, et le surnageant, ont été mis en présence des EPS de **R. meliloti** M5N1. On observe une diminution de la viscosité relative dans tous les échantillons, confirmant l'existence des deux formes de la polymérase, l'une liée au phage et l'autre soluble dans le lysat (tab. 25).

	V_R
Culot de phages CM1.M12S	81 %
Surnageant	50 %
Lysat brut	77 %

Tableau 25 - Viscosité relative, après 48 h, de la solution d'EPS de **R. meliloti** M5N1 soumis au culot et au surnageant d'ultracentrifugation et au lysat brut.

C. - Analyse des produits de dépolymérisation

Les EPS hydrolysés par le lysat phagique sont soumis à une ultrafiltration sur membrane AMICON XM100 qui fournit deux fractions :

P1 : de poids moléculaire supérieur à 10 000, retenue sur le filtre ;

P2 : non retenue, de poids moléculaire inférieur à 10 000.

1 - Etude des produits P1 ($P_M > 10\ 000$)

a) CLHP

Ces produits peu visqueux sont hydrolysés à l'acide sulfurique et analysés en CLHP. Leur composition en glucose et galactose s'avère identique à celle de l'EPS natif (tab. 26).

	EPS natifs	EPS après action du phage
Glc %	87,45	86,40
Gal %	10,82	11,08

Tableau 26 - Composition en glucose et galactose des EPS de *R. meliloti* M5N1, natifs et dépolymérisés par le lysat de Φ CM1.M12S.

b) RMN¹H

Elle a été utilisée pour étudier les substituants liés aux EPS de *R. meliloti* M5N1 : pyruvate, succinate, acétate.

Les spectres de la figure 41 montrent une importante diminution des signaux correspondant au succinate lorsque l'EPS a subi l'action du phage.

La dépolymérisation de l'EPS est donc accompagnée de l'élimination de nombreux résidus succinyles (tab. 27).

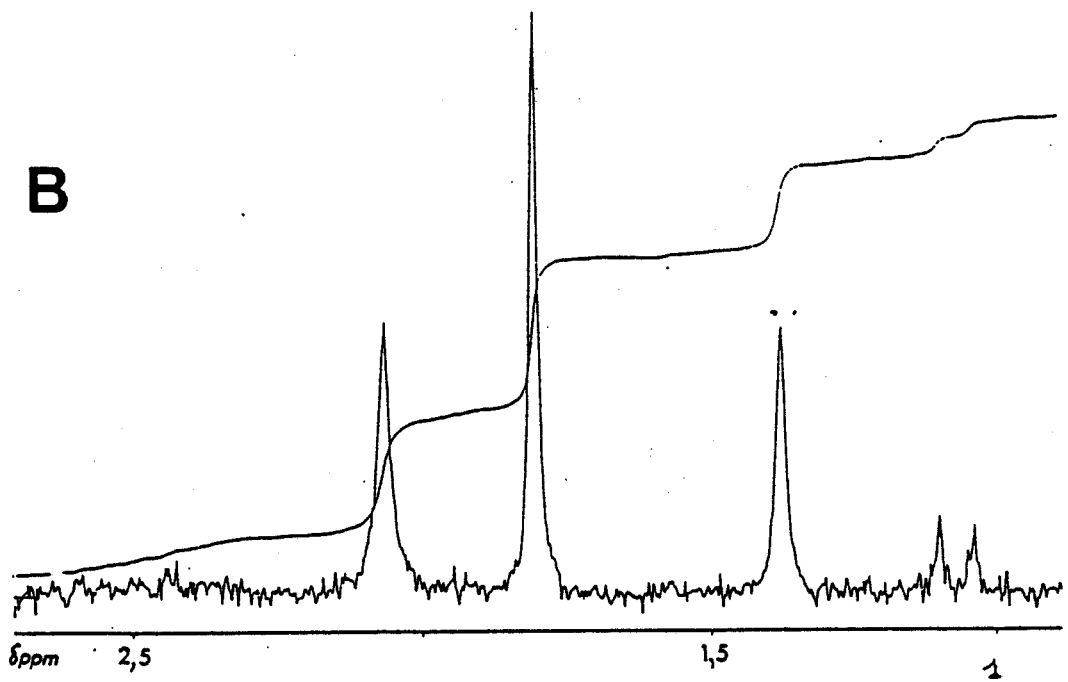
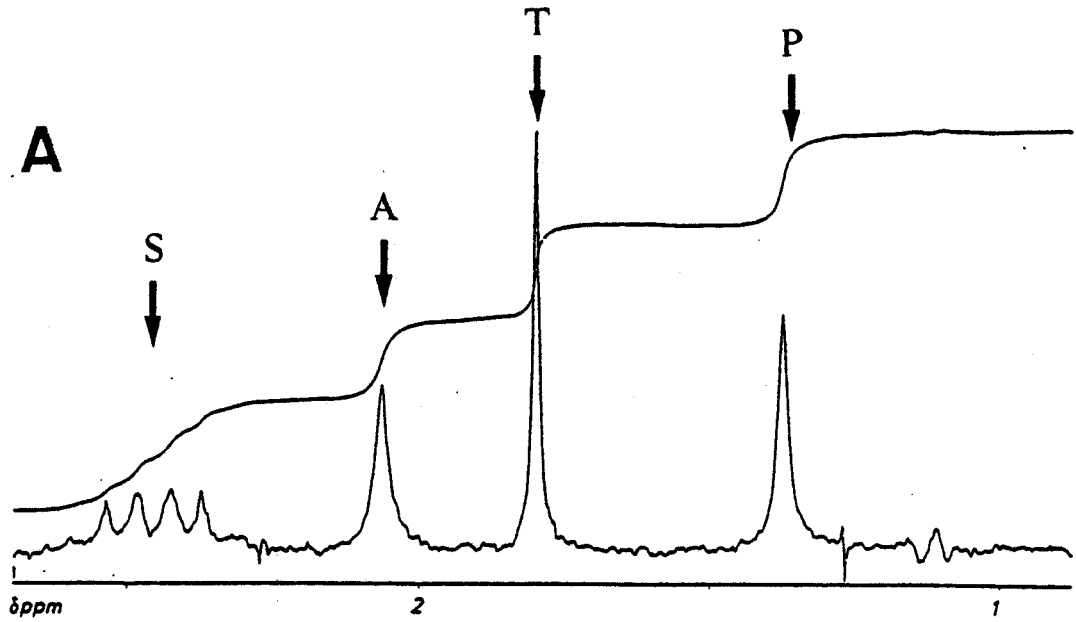


Figure 41 - Spectres de RMN¹H d'une solution d'EPS de *R. meliloti* M5N1 :

A : [EPS] = 7,4 mg/ml dans D₂O avant action du lysat de Φ CM4.M12S.

B : [EPS] = 6,0 mg/ml dans D₂O après action du lysat de Φ CM4.M12S.

A : acétate ; P : pyruvate₃ ; S : succinate ; T : témoin d'acétate de sodium $6,13 \cdot 10^{-3}$ M.

	Pyruvate	Acétate	Succinate
EPS natif	7,3	2,8	8,5
EPS après action du lysat de Φ CM1.M12S	5,4	3,4	2,1

Tableau 27 - Variations de la composition centésimale des substituants de l'EPS de *R. meliloti* M5N1 natif et hydrolysé par le phage Φ CM1.M12S.

2 - Etude des produits P2 ($P_M < 10\ 000$)

Les produits non retenus à la suite de l'ultrafiltration sur membrane AMICON XM100 ont été chromatographiés en gel filtration. La colonne de Biogel P4 a été éluée par une solution saline de nitrate de sodium 0,1 N qui élimine l'effet de charge entre le soluté et le gel, facilitant ainsi la séparation des oligomères. Deux fractions, repérées par réfractométrie, ont été obtenues :

- la fraction 1, quantitativement trop faible, n'a pu être étudiée ;
- la fraction 2, analysée en RMN¹³C, contiendrait un oligosaccharide constitué de 4 résidus glucose et 1 galactose, avec un substituant pyruvate.

L'analyse des produits de dépolymérisation ne nous permet pas, pour l'instant, de proposer un mécanisme d'action de la dépolymérase.

Des travaux antérieurs, réalisés au Laboratoire, avaient mis en évidence un oligosaccharide formé de 3 ou 4 résidus glucose et 1 pyruvate (BETTIQUI, 1988). Ceci nous avait amené à envisager une coupure de l'EPS au niveau de la chaîne latérale (cf. fig. 5, p. 39). Mais par la suite, un tel fragment n'a plus été décelé bien qu'il pourrait se trouver dans la fraction 1 qui n'a pu être analysée.

Par contre, la présence de galactose dans l'oligosaccharide de la fraction 2 implique nécessairement une coupure dans la chaîne principale de l'EPS. Les hypothèses sur l'origine de ce fragment se heurtent néanmoins au problème posé par l'existence simultanée du galactose et du pyruvate provenant de la chaîne latérale. Toutefois, il semble que cette activité dépolymérisique ne libère pas des unités de répétition de l'EPS, comme c'est souvent le cas. Par ailleurs, nous ne savons pas non plus s'il s'agit de glycosidase α ou β . En effet, le lysat du phage ϕ NM8.M12S s'est révélé inapte à réduire la viscosité d'une solution de cellulose soluble ou d'un scléroglycane fongique ayant une structure proche de celle de l'EPS de *R. meliloti*.

Quant à l'élimination des radicaux succinyles, cela suffirait à expliquer la chute de la viscosité des solutions d'EPS. Mais surtout elle révèle l'existence d'une succinylestérase phagique dont il serait intéressant d'étudier la signification biologique. Actuellement, des travaux réalisés au Laboratoire semblent indiquer que cette estérase n'est pas liée à la dépolymérase mais nous ne savons pas si ces enzymes sont indépendantes et d'activité simultanée ou si elles sont plus étroitement associées (THURETTE, 1989).

III. - INTERACTIONS ENTRE LE PHAGE NM8 ET LES LIPOPOLYSACCHARIDES DE R. MELILOTI M115

A. - Extraction des LPS

Réalisée sur des cellules entières de *R. meliloti*, l'extraction par la méthode au phénol aqueux de WESTPHAL et JANN (1965) donne trois fractions :

- un résidu : la muréine,
- une fraction phénolique : lipoprotéines et protéines,
- une fraction aqueuse contenant les LPS qui sont ensuite précipités à l'éthanol en présence d'acétate de sodium.

Toutefois, les LPS sont fréquemment accompagnés de protéines et d'acides nucléiques. Ces contaminants ont été évalués respectivement par le dosage selon LOWRY *et al.* (1951) et l'absorbance à 260 nm.

Le tableau 28 montre que la fraction LPS "brute" contient 12 % de protéines et 15 % d'acides nucléiques. De telles quantités pouvant gêner nos travaux ultérieurs, il nous a paru indispensable de les éliminer. Après action de DNase, RNase et pronase, nous observons une diminution du pourcentage des protéines et des acides nucléiques dans les LPS de *R. meliloti* M11S.

	LPS avant traitement	LPS après traitement
Protéines	12 %	2,5 %
Ac. nucléiques	15 %	0,1 %

Tableau 28 - Teneur en protéines et ac. nucléiques des LPS avant et après action d'enzymes protéolytiques et nucléasiques.

B. - Modalités de l'adsorption du phage

Nous avons recherché l'adsorption éventuelle du phage NM8 sur les fractions obtenues à partir de la souche propagatrice *R. meliloti* M11S. Les pourcentages d'adsorption ont été déterminés (tab. 29).

Fractions	% d'adsorption phagique sur chaque fraction			
	Résidu	Fraction phénolique	LPS	Bactéries (témoin)
Phage NM8.M11S	30	30	100	100

Tableau 29 - Pourcentages d'adsorption phagique sur les trois fractions issues de la souche M11S de *R. meliloti*.

On constate que les phages NM8 s'adsorbent totalement sur les LPS. Des adsorptions de l'ordre de 30 % sur la fraction phénolique et le résidu résultent vraisemblablement d'une pollution de ces échantillons par des molécules de LPS. Par ailleurs, les LPS seuls sont suffisants pour assurer l'adsorption du phage puisque les protéines pariétales extraites conjointement ont été éliminées par la pronase sans affecter la neutralisation du virus. La figure 42 montre que 2,5 mg/ml de LPS sont indispensables pour une adsorption phagique de 97 %. Cette quantité semble importante mais il est vraisemblable que ces LPS ne sont pas purs et contiennent d'autres produits d'extraction, de nature osidique.

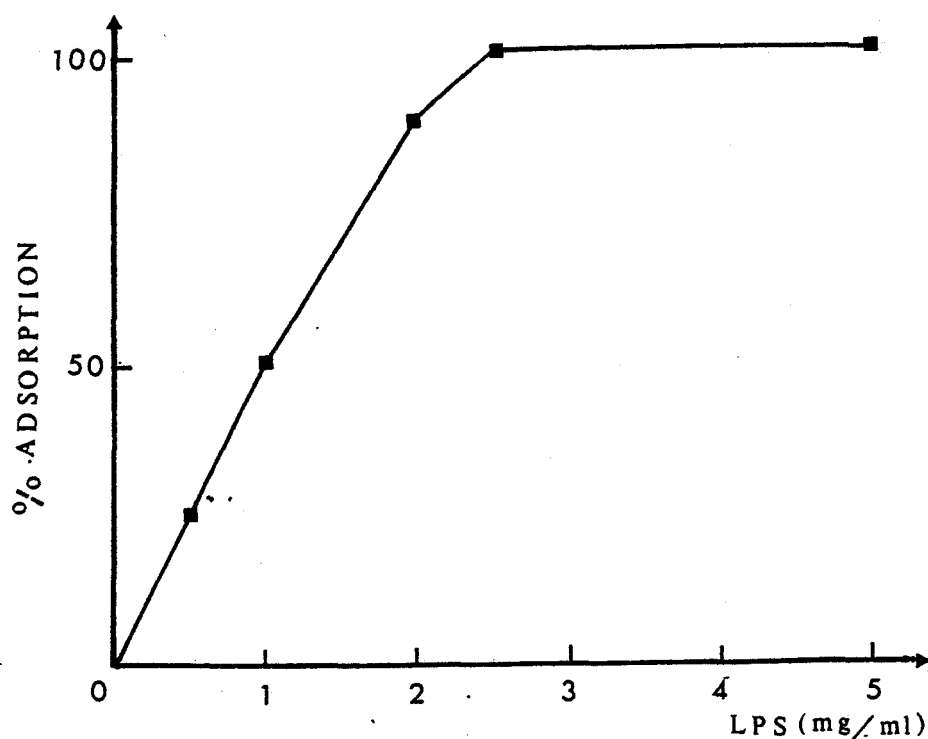


Figure 42 - Pourcentages d'adsorption du phage NM8.M11S en fonction de la concentration en LPS.

Nous avons montré que la dissociation de la structure des LPS par le déoxycholate de sodium (JARREL et KROPINSKI, 1977) inhibe totalement l'adsorption. L'élimination du DOC par dialyse permet la restauration de l'architecture fonctionnelle et, par conséquent, de l'adsorption (tab. 30).

	% d'adsorption du phage NM8
Témoin (LPS)	100
LPS + DOC	0
LPS + DOC + dialyse 12 h	100
LPS + EDTA	20
LPS + EDTA + Ca ²⁺	100
LPS + EDTA + Mg ²⁺	100

Tableau 30 - Pourcentages d'adsorption du phage NM8 sur les LPS de **R. meliloti** M11S (5 mg/ml) après action du DOC (10 mM), EDTA (10 mM), Ca²⁺ (2 mM) et Mg²⁺ (2 mM).

La chélation des ions divalents par l'EDTA entraîne également une très importante diminution de l'adsorption. Cet effet est annulé par l'addition de calcium ou de magnésium (tab. 30). Rappelons que nous avons précédemment constaté l'importance des cations lors de l'adsorption des phages sur les bactéries vivantes. Ces observations sont donc complémentaires.

C. - Caractérisation des LPS

1 - Test au lysat d'amoebocytes de limule

Le lysat d'amoebocytes de limule (**Limulus polyphemus**) a la propriété de coaguler en présence d'endotoxines bactériennes, c'est-à-dire de LPS (LEVIN et BANG, 1964). Le test LAL s'est révélé positif sur la fraction présumée contenir les LPS des souches M11S, M2S, M3S, M9S de **R. meliloti** et P15S de **R. leguminosarum** bv. **phaseoli**. URBANIK-SYPNIEWSKA et al. (1989) ont également trouvé que la toxicité létale, pour la souris, des LPS de **R. meliloti** est comparable aux LPS d'Enterobactéries.

2 - Microscopie électronique

Après coloration négative à l'acétate d'uranyle, les LPS de *R. meliloti* M11S, examinés en microscopie électronique, montrent des structures en forme de rubans linéaires ou enroulés, similaires à celles rapportées pour les LPS d'*E. coli* (LOPES ET INNES, 1970) ou *Leptospira interrogans* (VINH et al., 1986). L'ultrastructure est d'apparence lamellaire, le polysaccharide hydrophile est tourné vers l'extérieur tandis que le lipide A, hydrophobe, constitue la couche interne (fig. 43).

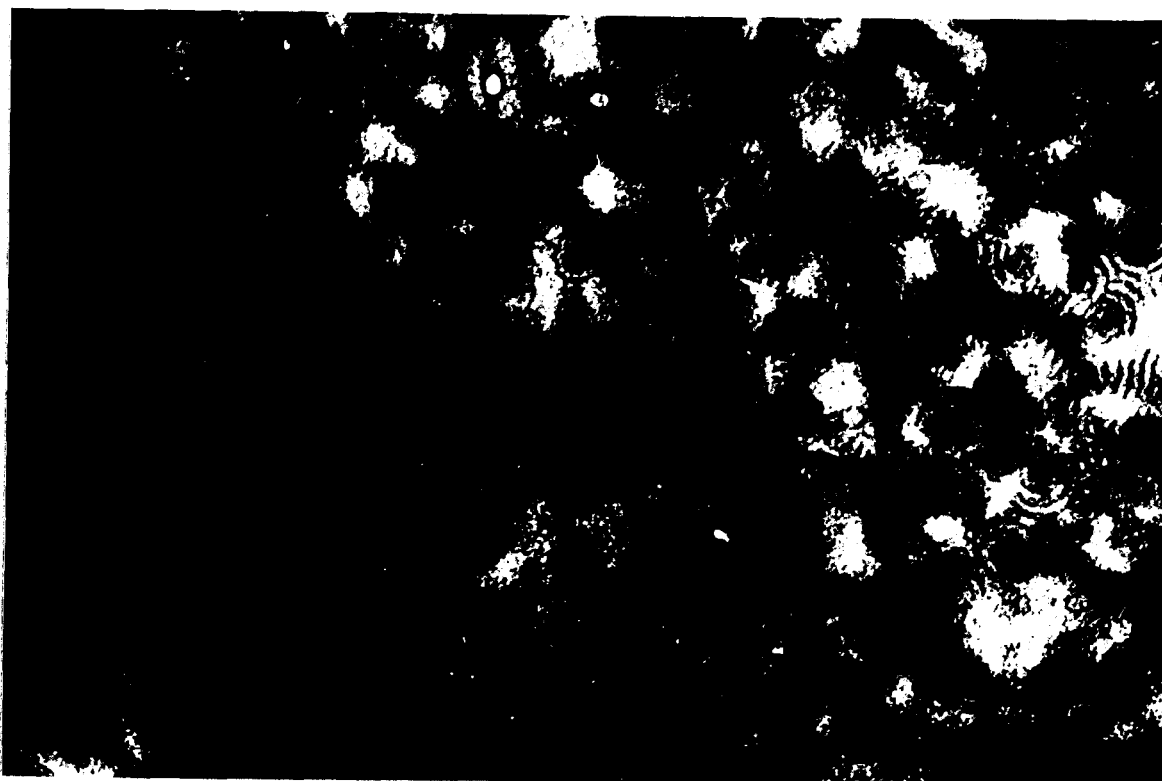


Figure 43 - LPS de *R. meliloti* M11S observés en microscopie électronique.

3 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide - Dodécylsulfate de sodium

Les LPS de *R. meliloti* M11S ont été extraits à divers stades de la croissance bactérienne et soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide, en conditions dénaturantes grâce au dodécylsulfate de sodium.

Les profils montrent deux bandes (fig. 44).

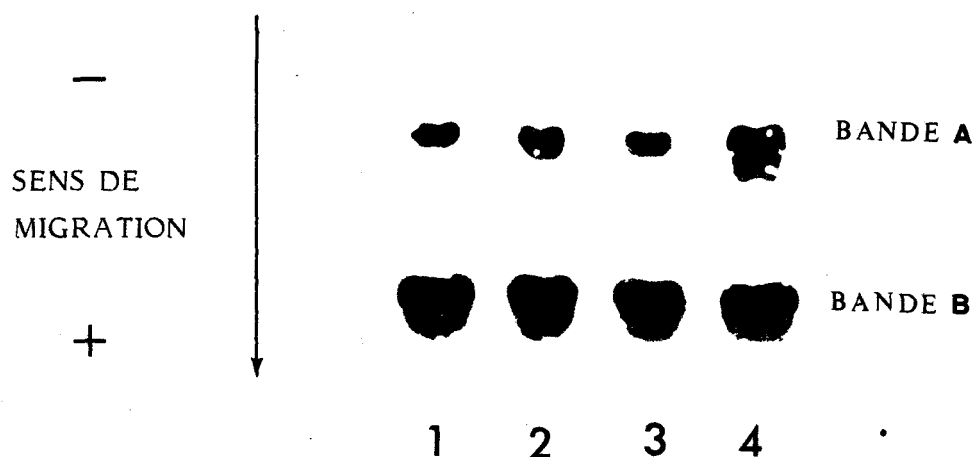


Figure 44 - Electrophorégrammes des LPS de *R. meliloti* M11S extraits à différents temps de croissance.

- 1 : 12 h de culture.
- 2 : 18 h de culture.
- 3 : 24 h de culture.
- 4 : 40 h de culture.

En analogie avec de nombreux travaux, on peut supposer que la fraction la plus mobile (bande **B**) représente le "core" du LPS tandis que la bande **A** contient les LPS complets, munis de la chaîne latérale. Les bandes ont tendance à se subdiviser car au fur et à mesure de la biosynthèse, les molécules de LPS se complètent et la dénaturation par le détergent fournit des fragments ayant subi divers degrés de dégradation et migrant avec des vitesses différentes.

D'ailleurs, le plus souvent, les LPS de type S engendrent beaucoup plus de bandes. On pourrait donc penser que le LPS de *R. meliloti* est de type R. Or,

il se comporte comme Smooth lors de l'épreuve à l'acriflavine ou au chlorure de sodium (KROPINSKI et CHADWICK, 1976). Il est possible que ce LPS ait une structure différente des LPS connus.

D. - Analyse du LPS

Les LPS natifs, débarrassés des protéines et des acides nucléiques, sont soumis à une deuxième étape de purification par chromatographie de gel filtration sur Séphadex G50. Deux pics sont obtenus (fig. 45).

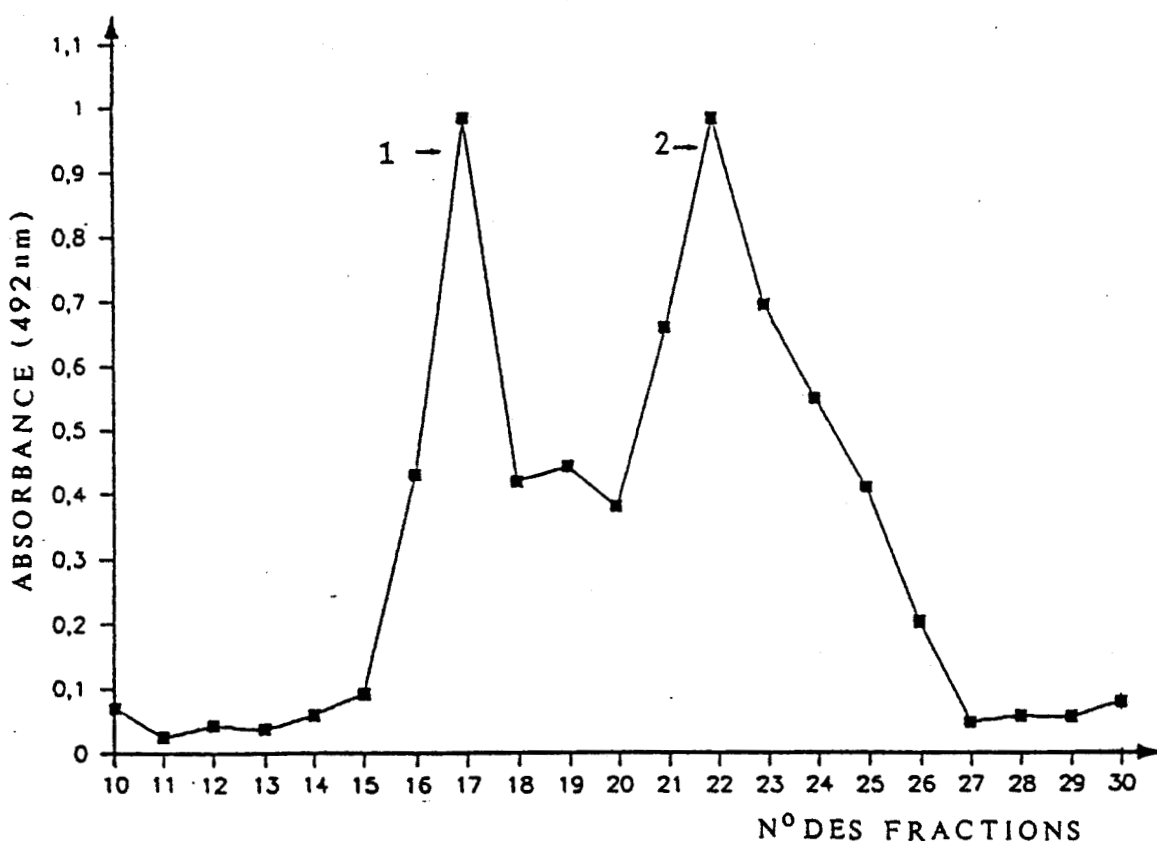


Figure 45 - Profil d'éluion du LPS de *R. meliloti* M11S sur Séphadex G50.

Chaque fraction a un volume de 3 ml.

L'analyse, par chromatographie en phase gazeuse, des oses du pic 1 montre la présence inattendue d'acides sialiques et, en rapports molaires plus faibles (tab. 31), de glucose, galactose, glucosamine et KDO. L'analyse des acides gras met en évidence les acides palmitique, stéarique, arachidique et 3-hydroxymyristique. Il semble donc que le LPS soit localisé dans ce pic 1.

Fractions	Rapports molaires								
	Glc	Gal	GlcN	KDO	A.S	3-OH-14:0	16:0	18:0	20:0
Pic 1 de Séphadex G50	1	ε	0,3	0,57	4,96	1	0,74	0,36	0,33
Pic 2 de Séphadex G50	+	ε	ε	ε	ε		-	-	-

Tableau 31 - Rapports molaires des monosaccharides et des acides gras du LPS de *R. meliloti* M11S après purification par gel filtration.

GlcN : glucosamine ; AS : acides sialiques ; 3-OH-14:0 : acide 3-hydroxymyristique ; 16:0 : acide palmitique ; 18:0 : acide stéarique ; 20:0 : acide arachidique.

Quant au pic 2, il est composé uniquement de glucose provenant sans doute d'exopolysaccharides extraits en même temps que les LPS, comme l'ont aussi constaté d'autres auteurs (WOLPERT et ALBERSHEIM, 1976 ; CARLSON, 1984).

Le fait remarquable concerne la détection d'acides sialiques, très inhabituels dans les LPS. Aussi, nous avons vérifié qu'ils appartiennent effectivement à la molécule lipopolysaccharidique. Pour cela, le produit du pic 1 de Séphadex G50 a été soumis à une nouvelle purification en utilisant une colonne anionique de chromatographie liquide à haute performance. Si les LPS contiennent bien les acides sialiques, ils seront retenus par les charges négatives de ces derniers. Deux pics apparaissent après élution (fig. 46).

La détermination des rapports molaires montre que la totalité des acides sialiques, du KDO, des autres oses et acides gras est localisée dans le deuxième pic, confirmant qu'ils constituent le LPS de *R. meliloti* M11S (tab. 32).

Le premier pic d'éluion contient exclusivement du glucose. Il s'agit sans doute d'un polymère de même poids moléculaire que le LPS, coélué par gel filtration mais séparé, grâce à la différence de charges électriques, sur colonne anionique.

On remarque donc la présence, dans nos LPS, d'une part de constituants habituels tels que glucose, galactose, glucosamine et KDO et, d'autre part, la présence, rare chez les Procaryotes, d'acides sialiques, en quantité importante (rapport molaire égal à 4,96 par rapport au glucose). Peu connus dans les LPS bactériens, les acides sialiques ne sont mis en évidence que dans très peu de cas : les antigènes O de *Salmonella toucra* (KEDZIERSKA, 1978) et de *Hafnia alvei* (GAMIAN et ROMANOWSKA, 1988), des souches du genre *Rhodobacter* (WECKESSER et al., 1972 ; KRAUSS et al. 1988) contiennent de l'acide N-acétylneuraminique tandis qu'un analogue d'acide sialique, l'acide pseudaminique, a été identifié chez des sérotypes de *Pseudomonas aeruginosa* et *Shigella boydii* type 7 (KNIREL et al., 1984). Nous n'avons pas décelé l'heptose alors qu'il est habituellement fréquent dans les LPS. Mais, cette absence a aussi été constatée chez d'autres souches de *Rhizobium* (ZEVENHUISEN et al., 1980). Enfin, on trouve relativement peu d'hexosamines. Là encore, ZEVENHUISEN et al. (1980) ont fait la même observation. Ces auteurs suggèrent qu'il s'agit d'un argument montrant que le lipide A de *Rhizobium* doit avoir un squelette différent de celui des *Enterobacteriaceae*. Pourtant, URBANIK-SYPNIEWSKA et al. (1989) ont proposé une organisation du lipide A de *R. meliloti* 10406 très proche du modèle classique (fig. 11, p. 45).

Pour ce qui concerne le lipide A de notre souche M11S, sa composition comporte aussi des originalités. Ainsi, on y trouve de l'acide arachidique rarement signalé dans les LPS. Nous avons également remarqué la faiblesse de la teneur en acides gras (2 %) alors qu'elle est de 15 à 20 % chez *R. leguminosarum* et de 14 à 17 % chez *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (ZEVENHUISEN et al., 1980). Ce faible pourcentage n'a pas été amélioré de

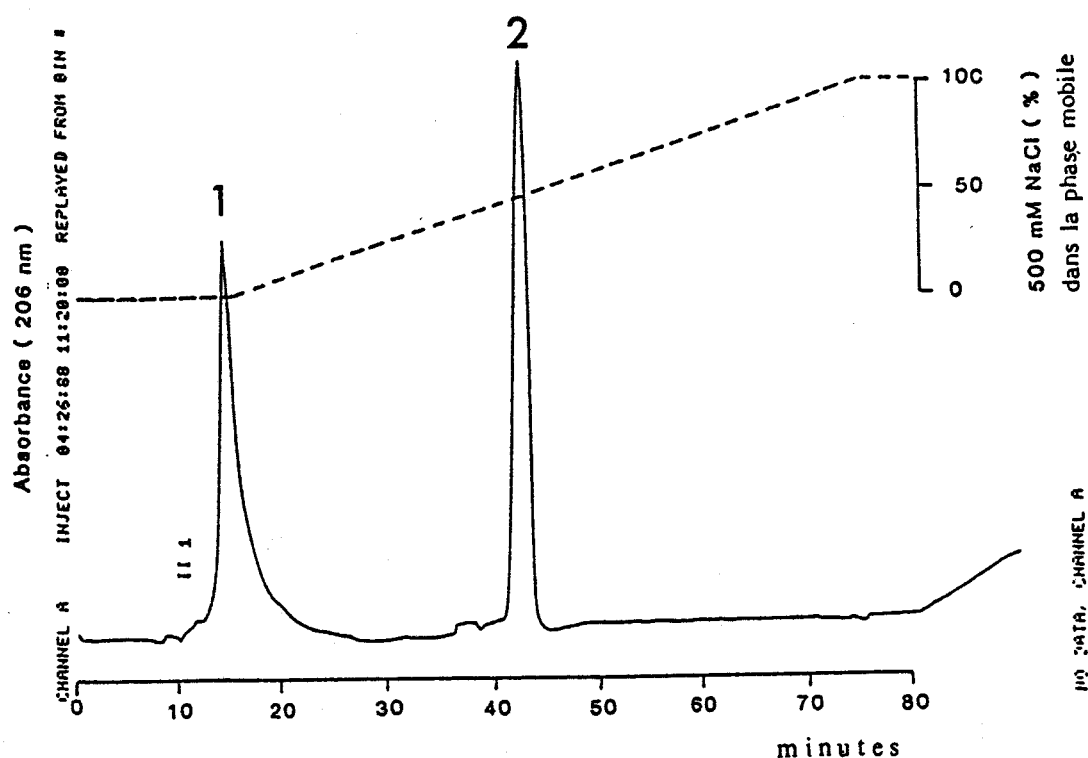


Figure 46 - Chromatographie liquide haute performance du LPS de *R. meliloti* M11S sur une colonne d'échange d'ions.

Fractions	Rapports molaires								
	Glc	Gal	GlcN	KDO	A.S	3-OH-14:0	16:0	18:0	20:0
Pic 1 HPLC	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pic 2 HPLC	1	0,22	0,50	0,81	7,69	1	0,77	0,64	0,42

Tableau 32 - Rapports molaires des monosaccharides et des acides gras contenus dans les pics obtenus par CLHP sur colonne anionique.

façon significative après une tentative de libération des acides gras par saponification. Certes, on peut penser à une dégradation partielle du lipide, provoquant la libération d'acides à longues chaînes et l'élimination d'une partie des acides β -hydroxylés dans la phase phénolique (OKUDA *et al.*, 1975).

Il est possible également que les acides gras soient ici d'extraction difficile, ce qui suggère encore une structure particulière du LPS.

A cet égard, la présence exceptionnelle des acides sialiques nous a amené à étudier leur nature et leur localisation.

Les LPS contenus dans le deuxième pic de CLHP (fig. 46) ont été soumis à une hydrolyse acétique douce limitant la perte des groupements O-acétylés (VARKI *et DIAZ*, 1984).

L'hydrolysate lyophilisé est triméthylsilylé et les esters formés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse suivie de spectrométrie de masse (SM). Deux composés sont obtenus (fig. 47a) dont les spectres fournis par l'ionisation chimique (IC) et l'impact électronique (IE) sont comparés aux résultats décrits par REUTER *et SCHAUER* (1986).

Le composé 1 est identifié à l'acide N-acétylneuraminique avec les fragments caractérisés par le rapport masse/charge (m/e) de 726, 624, 205 et 173 pour la SM-IE (fig. 47b) et les ions à m/e 742, 652 et 562 pour la SM-IC (fig. 47b'). Le spectre en SM-IE du composé 2 montre les ions à m/e 693, 594, 175 et 173 (fig. 47c) alors que la SM-IC donne des ions à m/e 712, 622 et 532 (fig. 47c'). On peut déduire que le composé 2 est l'acide N-acétyl-9-O-acétylneuraminique.

Dans le but de localiser les acides sialiques dans la molécule de LPS, nous avons effectué une digestion enzymatique. En raison de leur grande quantité dans les LPS de *R. meliloti* M115, on peut penser que les acides sialiques constituent la totalité ou au moins la majeure partie de la chaîne latérale. Si c'est le cas, se trouvant en position terminale, ils peuvent être libérés par une exoenzyme spécifique.

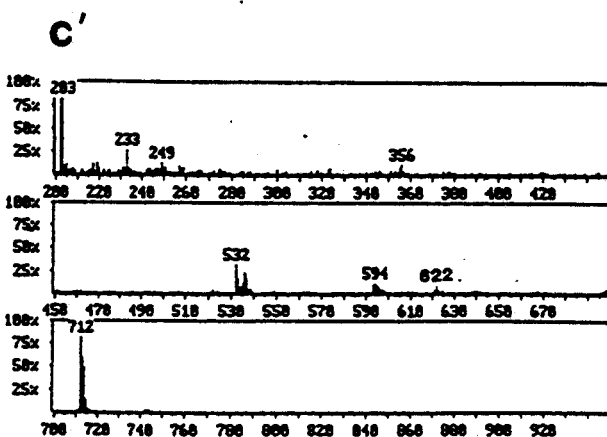
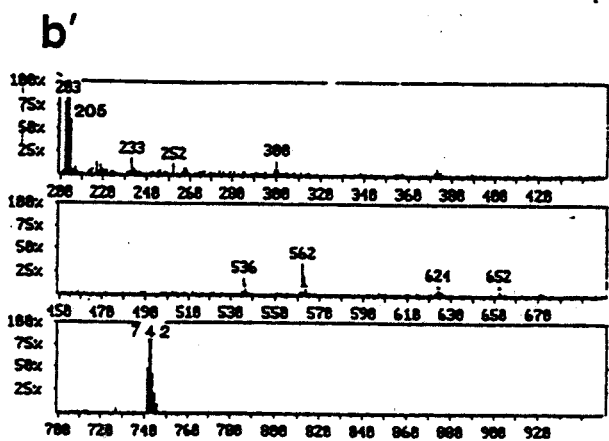
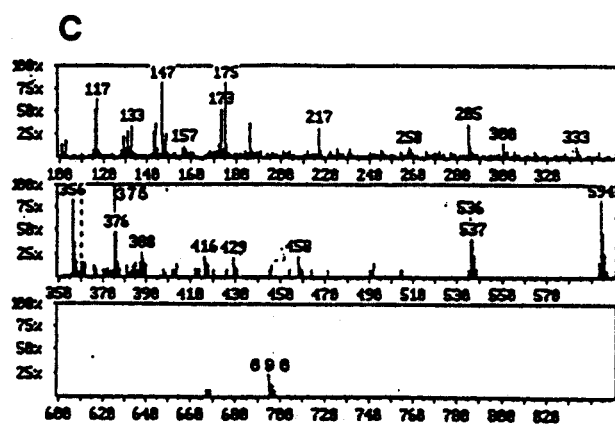
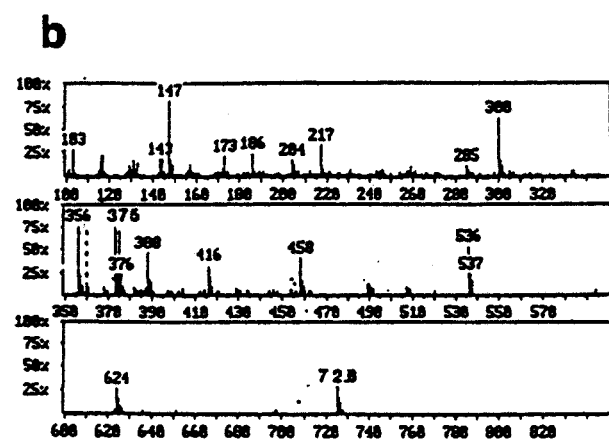
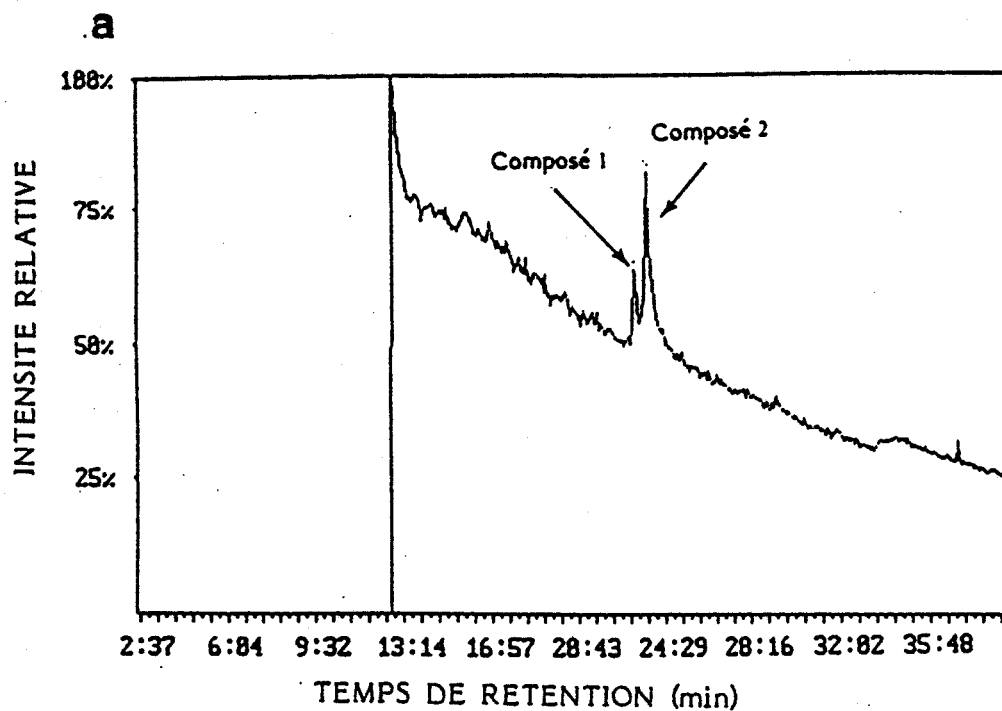


Figure 47 - Analyse par CPG-SM des acides sialiques des LPS de *R. meliloti* M11S.

a : CPG des dérivés triméthylsilylés ; b : SM/IE du composé 1 ;
b' : SM/IC du composé 1 ; c : SM/IE du composé 2 ; c' :
SM/IC du composé 2.

Nous avons fait agir la neuraminidase de *Clostridium perfringens* durant une assez longue période (72 h), car les sialoconjugés bactériens sont réputés stables et peu sensibles à l'hydrolyse enzymatique. Pour obtenir les quantités d'acides sialiques libérés, nous avons dosé les acides sialiques libres totaux après 24 et 72 h de réaction. Ces valeurs ont été corrigées des quantités d'acides sialiques spontanément hydrolysés dans le tampon acétate pH 5 à 37°C. Nous observons effectivement une libération progressive d'acides sialiques (tab. 33).

Temps d'hydrolyse	Acides sialiques libérés (en µg à partir de 0,5 mg de LPS)
24 h	35
72 h	73

Tableau 33 - Libération d'acides sialiques par action de la neuraminidase sur les LPS de *R. meliloti* M11S.

L'élimination des acides sialiques a été confirmée par l'analyse des produits d'hydrolyse. Les LPS digérés par l'enzyme ont d'abord été fractionnés sur la même colonne de Séphadex G50 qui nous a servi à la purification des LPS bruts mais, étant donné la faible quantité de produit dont nous disposons, le repérage des fractions a été effectué par l'absorbance UV à 206 nm et non par le dosage colorimétrique des oses totaux.

Deux pics sont obtenus (fig. 48). Remarquons que le premier pic est élué un peu plus rapidement que les LPS natifs (fig. 45, p. 178). S'il s'agit des LPS dégradés par la neuraminidase, il est concevable que l'élimination des acides sialiques ait engendré une hydrophobicité de la molécule, due au lipide A, et perturbé la migration du produit.

La comparaison des chromatogrammes obtenus par CPG du pic 1 et du LPS natif montre bien que les acides sialiques ont disparus (fig. 49). Le second pic contient des monosaccharides.

L'ensemble de ces résultats nous amène à conclure que l'élément marquant de la composition des LPS de *R. meliloti* M11S est la présence d'acides sialiques en positions terminales, sans doute constitutifs de la chaîne latérale.

Nous avons utilisé ces connaissances pour étudier le site récepteur du phage NM8.M11S.

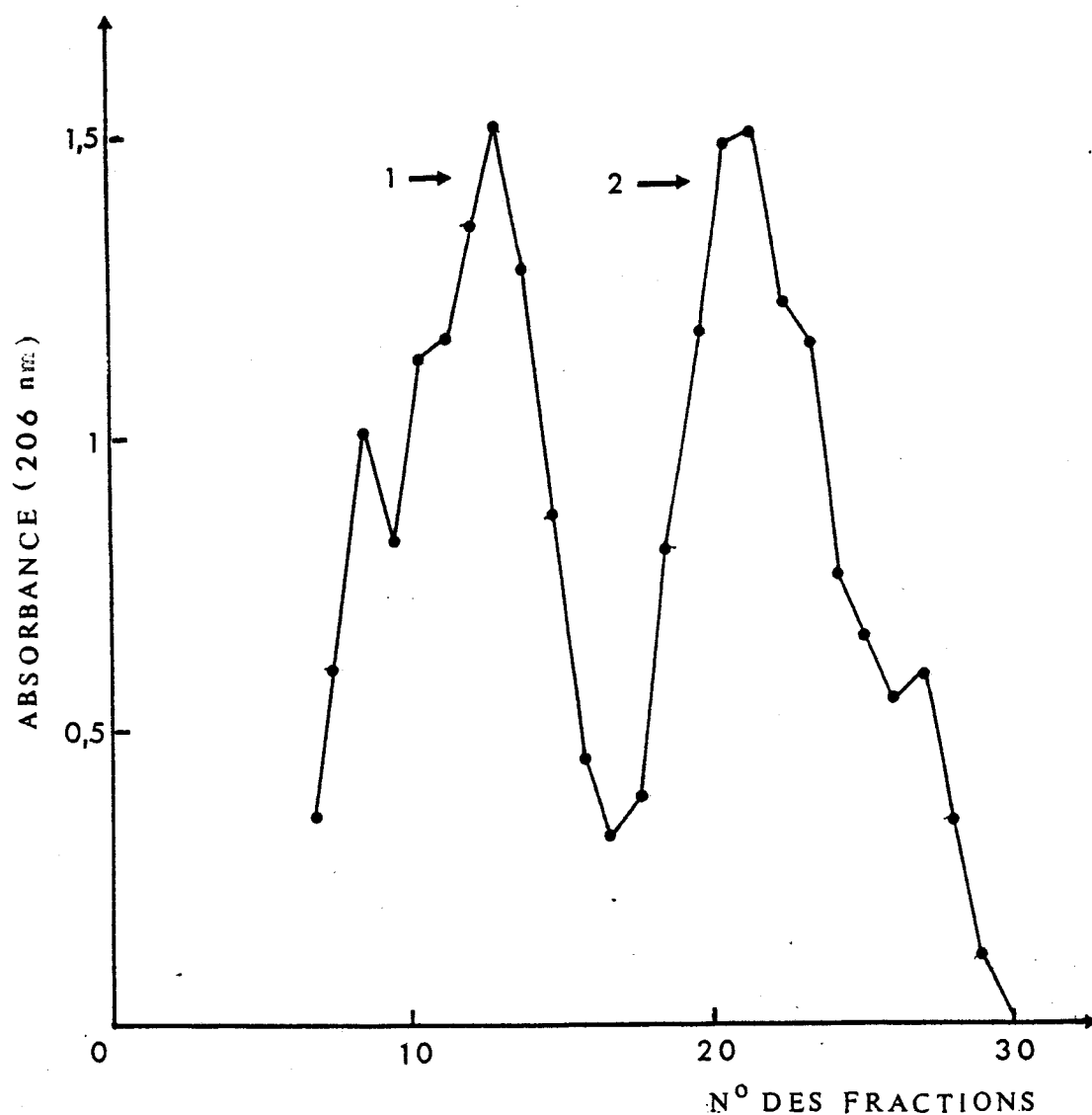


Figure 48 - Profil d'élution des LPS de M11S digérés par la neuraminidase.

Détection en spectrophotométrie UV des liaisons osamines à 206 nm.

Les protéines, détectées par absorbance UV à 280 nm sont en faibles quantités et ne créent pas d'interférences.

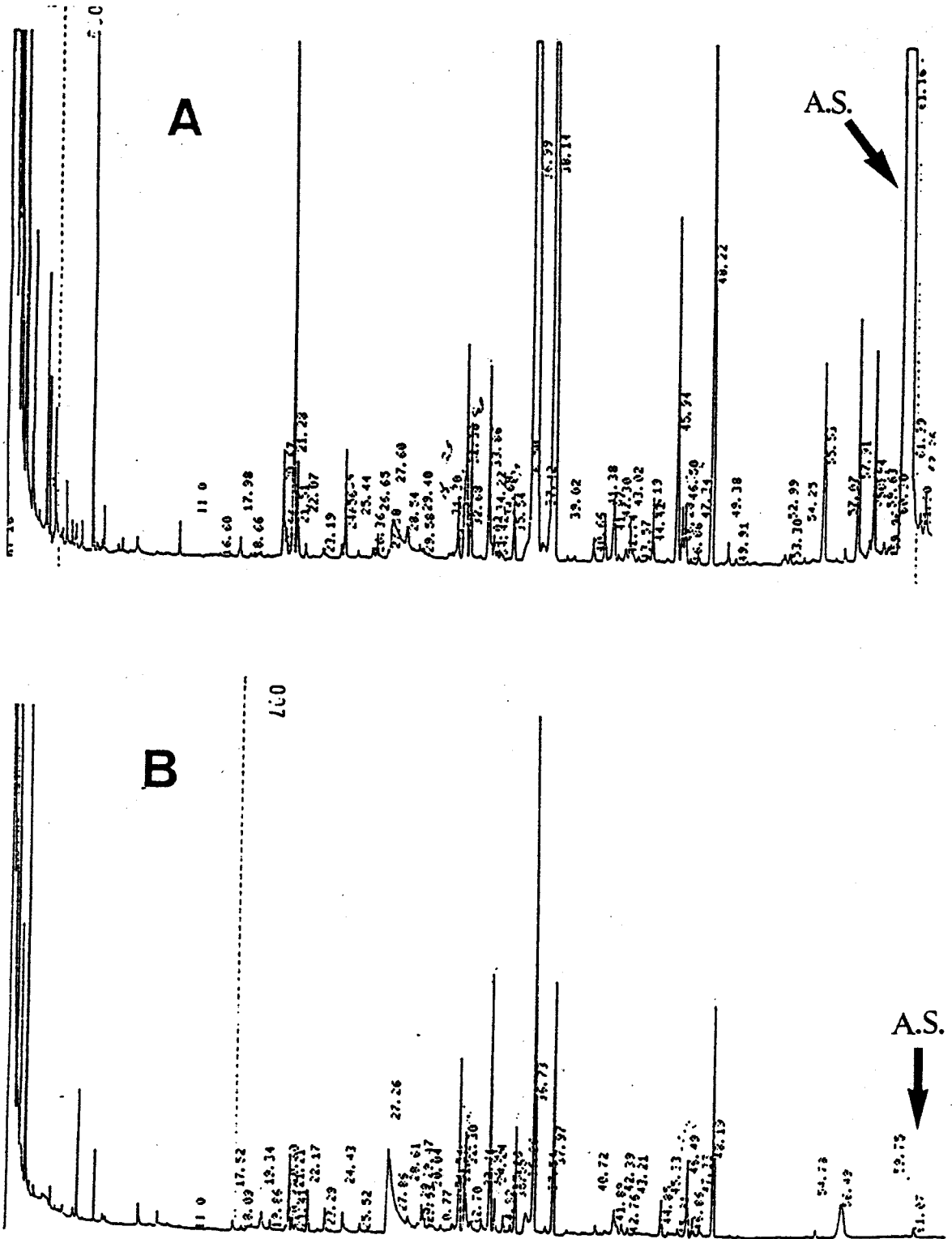


Figure 49 - Chromatographie en phase gazeuse des LPS de *R. meliloti* M115 avant (A) et après (B) action de la neuraminidase.

A.S. : acides sialiques.

E. - Etude du site récepteur du phage NM8.M11S

L'adsorption du phage NM8 a été mesurée sur les fractions de l'hydrolysate partiel du LPS, c'est-à-dire le lipide A et la fraction surnageante osidique (chaîne latérale et noyau) (tab. 34).

Fractions 5 mg/ml	% d'adsorption de ϕ NM8
LPS (témoin)	100
Lipide A	4
Fraction surnageante ("core" + "side-chain")	50

Tableau 34 - Pourcentages d'adsorption de ϕ NM8 sur les LPS et sur les fractions de l'hydrolysate partiel du LPS de *R. meliloti* M11S.

L'adsorption est pratiquement inexistante sur le lipide A alors qu'elle atteint 50 % sur le polysaccharide. Cette valeur semble faible en regard d'une adsorption maximale sur les LPS natifs, mais il est concevable qu'une partie des récepteurs présents dans l'échantillon ait été dégradée au cours de l'hydrolyse. Les sites d'adsorption du phage ϕ NM8 se trouveraient donc au niveau de la copule polysaccharidique du LPS. Celle-ci étant riche en acides sialiques, nous avons émis l'hypothèse qu'ils pouvaient avoir un rôle important dans l'adsorption phagique.

L'étude a été abordée de différentes manières.

Dans un premier temps, nous avons comparé la composition des LPS des souches M2S, M3S, M9S de *R. meliloti* connues pour leur résistance au phage NM8.M11S, par défaut d'adsorption, et de la souche P15S de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* sur laquelle le bactériophage peut s'adsorber mais ne peut pas développer son cycle lytique.

On remarque que la différence significative dans la composition en monosaccharides est la présence d'acides sialiques dans les LPS acceptant l'accrochage du phage tandis qu'ils sont absents dans les LPS des souches résistantes (tab. 35).

LPS	Monosaccharides					Adsorption du phage NM8.M11S
	Gal	Glc	GlcN	KDO	ANAN	
R. meliloti						
M2S	1,04	1	0,63	0,40	0	0
M3S	ε	1	0,54	0,62	0	0
M9S	0,98	1	0,74	0,80	0	0
M11S	ε	1	0,30	0,57	<u>4,96</u>	<u>100</u>
R. leguminosarum bv. phaseoli						
P15S	0,47	1	0,93	1,18	<u>0,55</u>	<u>84</u>

Tableau 35 - Adsorption du phage NM8.M11S en relation avec les rapports molaires des monosaccharides de divers LPS de **Rhizobium**.

Remarque : Nous n'avons comparé que les monosaccharides propres à **R. meliloti**. Les LPS de **R. leguminosarum** bv. **phaseoli** contiennent également d'autres oses.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé des lectines capables de se lier avec une haute spécificité aux sucres présents dans les LPS, sans les modifier mais en neutralisant leur activité. Les cellules de **R. meliloti** M11S sont mises en présence des agglutinines du glucose, du galactose et de l'acide N-acétylneuraminique puis nous mesurons l'inhibition de l'adsorption du phage NM8.M11S. Il s'avère que la fixation des lectines sur le glucose (ConA) et le galactose (SBA et RCA) est sans effet notable tandis que l'agglutinine LPA spécifique de l'acide N-acétylneuraminique inhibe fortement l'adsorption phagique (fig. 50).

Toutefois, nous ne disposons pas de lectines affines au KDO et à la glucosamine. Aussi, afin de pouvoir examiner le rôle de ces sucres dans l'adsorption, nous avons cherché à saturer le site récepteur utilisé sur le phage à l'aide des oses constitutifs du LPS. Nous avons aussi employé des oses apparentés, soit en tant que témoin négatif (mannose), soit pour la présence de groupements acétylés (N-acétylglucosamine).

Les résultats du tableau 36 indiquent que l'acide N-acétylneuraminique contrarie fortement l'adsorption du phage NM8.M11S. Le KDO, la glucosamine et la N-acétylglucosamine possèdent également un pouvoir non négligeable. On peut penser que les deux premiers sont inclus dans le site récepteur et interagissent avec le site phagique complémentaire ; ils seraient alors vraisemblablement proches des acides sialiques dans l'architecture du LPS. Il est également possible qu'ils agissent grâce à des similitudes de configuration moléculaire. Quant à l'inhibition de l'adsorption par la N-acétylglucosamine, elle indique clairement que la présence des radicaux acétylés dans le site récepteur est absolument indispensable.

Il apparaît donc que les acides sialiques des LPS de **R. meliloti** M11S assurent l'adsorption du phage NM8, en particulier grâce à leurs groupements acétylés.

D'autres souches de cette espèce bactérienne, ne possédant pas de sialoconjugués mais étant néanmoins sensibles à leurs phages homologues, doivent donc leur proposer d'autres récepteurs. On peut envisager qu'il s'agit de radicaux acétylés pouvant substituer d'autres oses que les acides sialiques.

La composition du LPS de **R. meliloti** M11S appelle d'autres remarques. La structure présente des similitudes avec les LPS de **R. meliloti** décrits par d'autres auteurs. Ainsi, les électrophorogrammes en gel de polyacrylamide sont beaucoup plus simples que ceux des LPS de type S des Entérobactéries. Ils comportent seulement deux bandes. De plus, l'heptose est absent et la teneur en acides gras du lipide A est anormalement faible.

Comme nous l'avons déjà précisé, il semble que ces LPS ont une organisation différente des LPS les mieux connus plutôt qu'une structure de type R.

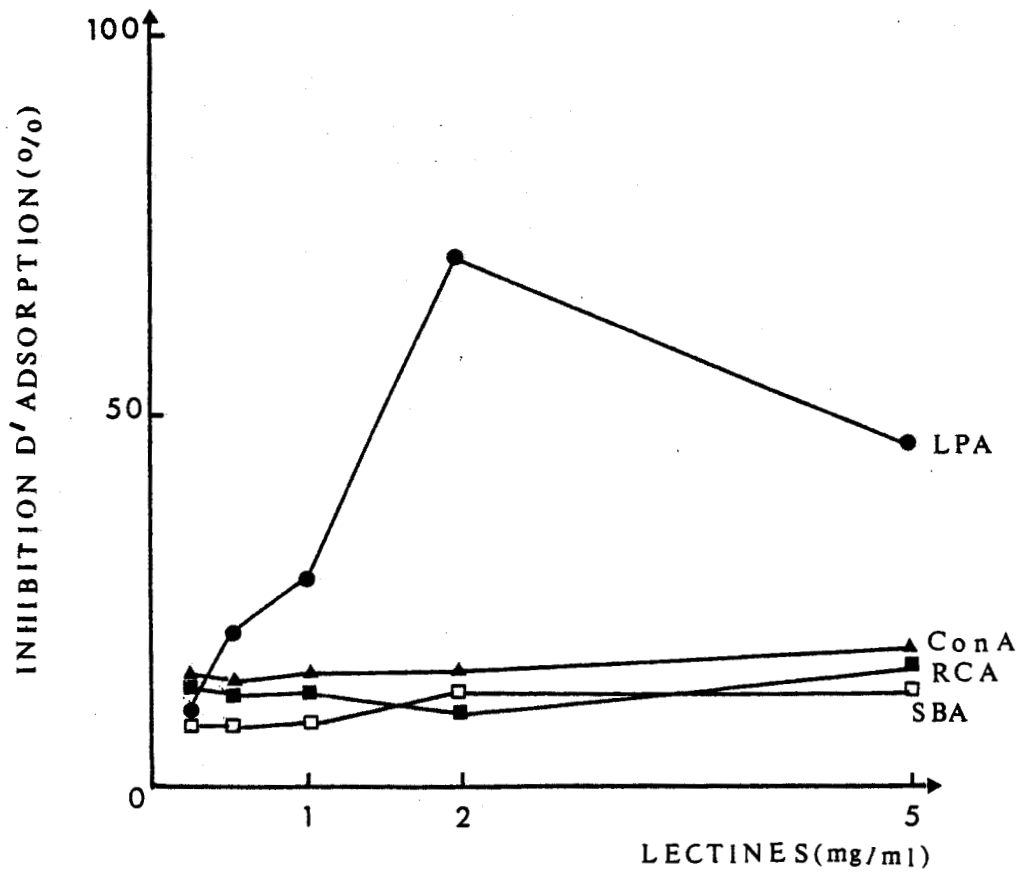


Figure 50 - Effet des lectines sur l'adsorption du phage NM8.M11S sur *R. meliloti* M11S.

Sucres (2,5 mg/ml)	% d'inhibition de l'adsorption de ϕ NM8
Glucose	10
Galactose	6
ANAN	83
KDO	50
Glucosamine	30
N-acétylglucosamine	66
Mannose (témoin négatif)	2

Tableau 36 - Inhibition de l'adsorption du phage ϕ NM8 sur *R. meliloti* M11S par les sucres constitutifs du LPS.

Par contre, la présence des acides N-acétylneuraminique et N-acétyl-9-O-acétylneuraminique est tout à fait remarquable, en raison de son caractère insolite.

Toutefois, il est possible que les acides sialiques aient été ignorés dans d'autres LPS. En effet, le dosage colorimétrique du KDO fournit parfois des valeurs élevées. Or, les acides sialiques réagissent également avec l'acide thiobarbiturique utilisé dans la méthode. Cette interférence n'est pas soupçonnée puisque les acides sialiques sont considérés comme inexistantes chez les Procaryotes.

Ainsi, URBANIK-SYPNIEWSKA *et al.* (1989) n'excluent pas la présence d'acides sialiques dans les LPS de *R. meliloti* 10406, et la découverte d'ANAN dans les LPS de *Campylobacter jejuni* (MORAN *et al.*, 1991) et la membrane externe d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (STEFFENS *et al.*, 1990) nous conforte dans l'opinion que l'utilisation de techniques fines d'analyse permettra la mise en évidence d'acides sialiques dans d'autres LPS.

CONCLUSION

Les bactériophages de *R. meliloti* que nous avons étudiés ne présentent pas de propriétés particulières et s'intègrent parfaitement dans la nomenclature générale des virus bactériens. On notera cependant qu'ils s'adsorbent rapidement sur leurs hôtes où ils trouvent nécessairement des récepteurs aisément accessibles. Par ailleurs, si le cycle lytique est banal, la multiplication des phages peut se heurter à une forte restriction exercée par des endonucléases bactériennes. Mais nous avons déjà signalé qu'en raison de l'importante compétition que se livrent les microorganismes telluriques, des bactéries telles que *Rhizobium* doivent posséder des capacités de survie et de préservation du patrimoine génétique. L'exploitation des connaissances acquises sur la Biologie du développement des Rhizobiophages nous semble intéressante dans deux domaines. D'une part, en Agriculture, on pourrait étudier l'utilisation des phages afin de réduire sensiblement une population de *Rhizobium* dans le sol avant d'introduire une autre souche plus efficiente, au profil de restriction-modification adéquat, et de favoriser ainsi l'implantation des bactéries inoculées. D'autre part, les phages tempérés sont potentiellement utilisables en Génie Génétique des *Rhizobiaceae*. Mais, il est d'abord impératif d'approfondir l'étude de leur génome. En particulier, on pourrait déterminer les portions non indispensables à la fonction virale, donc remplaçables par un ADN étranger, pour construire des vecteurs de clonage. De plus, une meilleure connaissance de la régulation de la lysogénisation est nécessaire.

Mais, dans ce travail, nous avons envisagé le rôle des polysaccharides pariétaux dans la relation phage-bactérie.

Ainsi, nous avons remarqué que l'accumulation progressive des exopolysaccharides, dans le milieu de culture, protège les bactéries, *in vitro*, contre l'infection virale grâce à un simple phénomène mécanique empêchant les phages d'atteindre la surface bactérienne. Mais peut-il en être de même dans le sol où les conditions nutritives ne permettent sans doute pas une synthèse d'EPS suffisante pour aboutir à un même résultat ?

Souvent, les phages qui parasitent des bactéries sécrétrices de polysaccharides possèdent une dépolymérase dont le fonctionnement exige la présence d'acides

uroniques dans le glycanne et fournit les unités de répétition du polymère. Les Rhizobiophages ne sont pas tous capables d'agir sur les EPS de *Rhizobium*. Dans le cas où nous l'avons observée, cette activité engendre une diminution de la viscosité de la solution polysaccharidique. Toutefois, nous n'avons pas obtenu de produits de dépolymérisation permettant de préciser le type de coupure dans la macromolécule.

S'agit-il d'une activité trop faible pour être détectée dans nos conditions expérimentales ou d'un autre type de dépolymérase que celui habituellement décrit ? Nous essayons de répondre à cette question.

Par ailleurs, nous avons constaté, chez le phage CMI, la présence originale d'une succinylestérase dont la signification biologique ne semble pas évidente.

Certes, l'élimination des radicaux succinyles de l'EPS est théoriquement susceptible, à elle seule, d'abaisser la viscosité du polymère. L'approche du phage vers la bactérie est-elle ainsi facilitée ? De plus, on connaît l'importance du succinoglycane dans la phase d'établissement de la symbiose et des acides dicarboxyliques comme source d'énergie privilégiée pour les bactéroïdes.

La mise en évidence d'une relation entre ces phénomènes et la désuccinylation de l'EPS apparaît difficile.

Par contre, l'interaction phage-lipopolysaccharide est plus claire et nous avons rapidement montré que les LPS contiennent les sites récepteurs du phage. Par ailleurs, le fait remarquable est la présence des acides N-acétylneuraminique et N-acétyl-9-0-neuraminique dans ces LPS.

En effet, les acides sialiques sont considérés comme appartenant essentiellement au règne animal. Ils entrent en particulier dans la composition des gangliosides du cortex cérébral mais aussi dans les membranes de nombreux types cellulaires où, grâce à leurs charges négatives, ils ont d'importantes fonctions de récepteurs de toxines, d'hormones, de microorganismes, de virus. Ils peuvent aussi masquer d'autres sites

immunologiques. Leur rôle dans des processus pathologiques, notamment cancéreux, attire également l'attention.

Chez les Procaryotes, les acides sialiques sont occasionnels. Ils sont pourtant des composants importants de polysaccharides associés à la virulence de certaines bactéries pathogènes pour l'Homme : capsules de **Neisseria meningitidis** groupe B et d'**E. coli** K11, antigènes spécifiques de **Streptococcus** groupe B, antigènes O des lipopolysaccharides de quelques Entérobactéries et de **P. aeruginosa**. Leur rôle dans le pouvoir pathogène est indiscutable car ils sont d'abord capables d'inhiber la voie alterne d'activation du complément et ensuite, étant donné qu'ils sont ubiquitaires dans les tissus humains, ils procurent aux antigènes bactériens un puissant mimétisme moléculaire qui leur permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte. L'un des polysaccharides capsulaires qui possèdent ces fonctions est l'homopolymère d'acides sialiques commun à **N. meningitidis** B et **E. coli** K11. Ils possèdent les mêmes oligomères d'acides sialiques que les glycopeptides rencontrés dans le tissu cérébral foetal et d'autres cellules de l'Homme et des Animaux (FINNE, 1985). Face à une infection par ces bactéries, la réponse immunitaire de l'organisme est faible. Evidemment, ce pouvoir pathogène ne se retrouve aucunement chez **Rhizobium** dont l'innocuité semble parfaite pour un organisme animal sain même si certains LPS isolés ont révélé un pouvoir toxique expérimental chez la Souris.

Outre ces sialoconjugués synthétisés par des bactéries entretenant des relations de parasitisme avec un hôte possédant lui-même des acides sialiques, et à l'exception de quelques Protozoaires, on ne trouve pas d'acides sialiques chez les Protistes, les Champignons et les Plantes. Il était donc postulé que les acides sialiques étaient apparus assez tardivement au cours de l'évolution, en même temps que les premiers Animaux connus possesseurs d'acides sialiques, c'est-à-dire les Echinodermes de l'Ere Primaire (CORFIELD et SCHAUER, 1982). La capacité, pour certaines bactéries pathogènes, de synthétiser des acides sialiques étant une acquisition ultérieure..

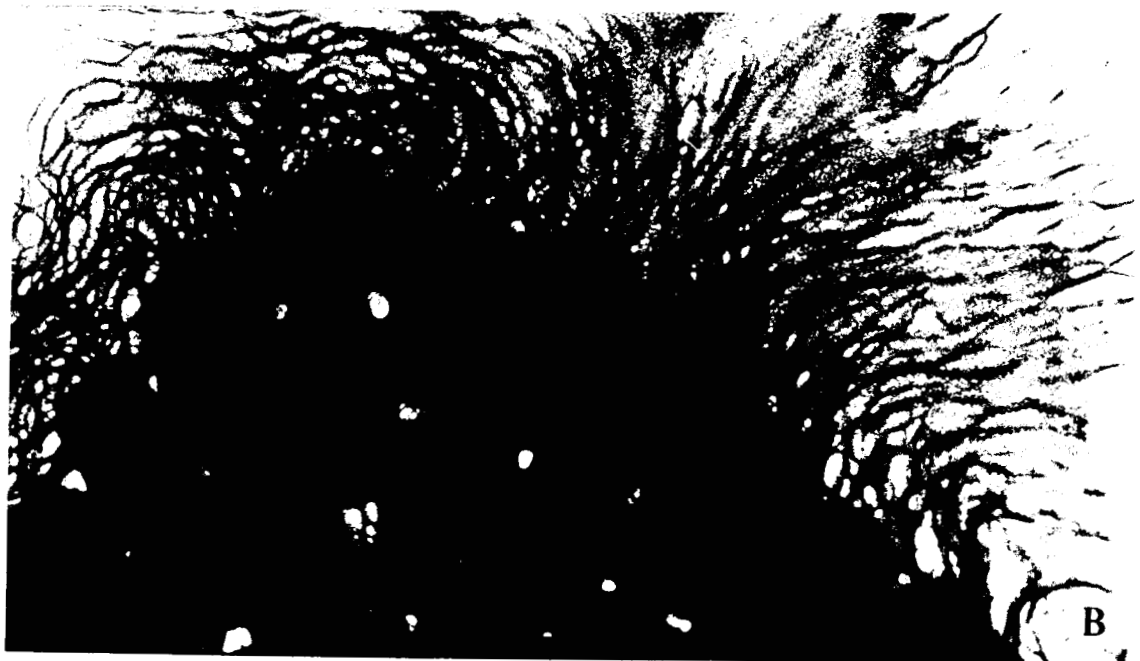
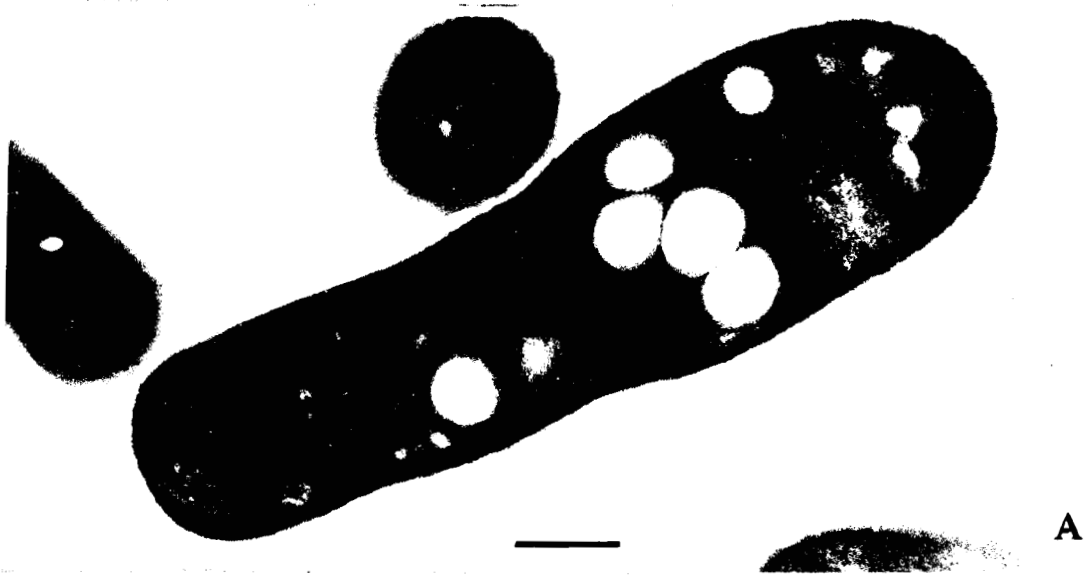
Mais en 1988, KRAUSS *et al.* détectent l'acide N-acétylneuraminique dans le "core" des LPS de bactéries photosynthétiques non sulfureuses du genre

Rhodobacter. Puis nous l'avons découvert chez **Rhizobium**. Or ces deux germes appartiennent au même sous-groupe $\alpha 3$ des bactéries pourpres et espèces associées en fonction des analogies de séquence des ARN ribosomiaux 16S (WOESE et al., 1984). Comme les bactéries pourpres sont vraisemblablement apparues très tôt dans l'évolution (STANIER et al., 1976), et qu'il en est certainement de même pour **Rhizobium**, il apparaît que les acides sialiques sont sans doute plus anciens qu'on ne le pensait auparavant. La découverte d'acides sialiques dans d'autres espèces bactériennes donnerait lieu à des considérations phylogéniques intéressantes. Comme l'élucidation de l'architecture des LPS de **Rhizobium** et de **Rhodobacter** pourrait apporter des informations sur l'évolution de ces structures.

Par ailleurs, cela nous permettrait de préciser le site d'ancrage du phage sur la bactérie. A ce sujet, il faut remarquer que dans notre modèle expérimental, les groupes acétyles des acides sialiques bactériens sont vraisemblablement les récepteurs moléculaires du phage, comme les radicaux O-acétyles des sialoconjugués humains fixent le virus de l'influenza C ou le cytomegalovirus. Il semble que la reconnaissance et l'association entre des entités différentes soient des rôles universels des acides sialiques.

ANNEXE I

PLANCHE 1



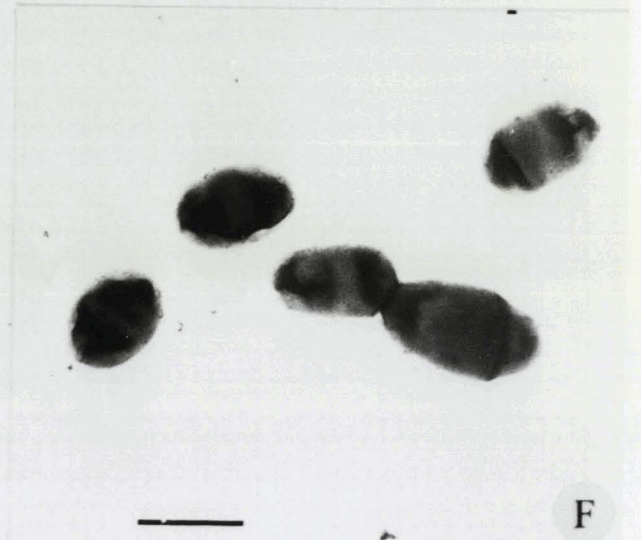
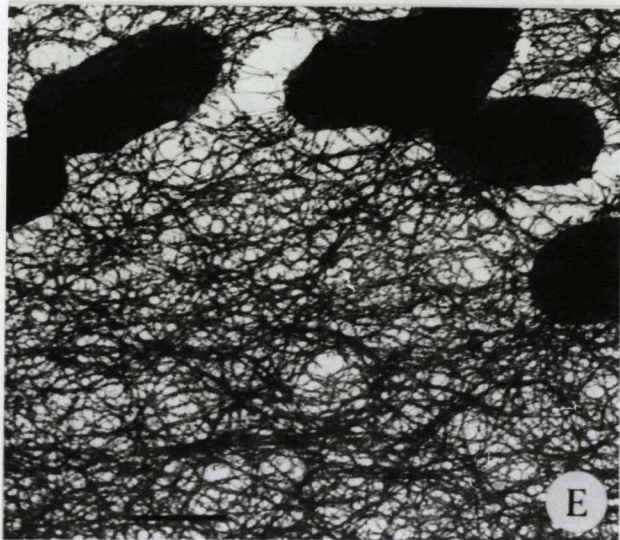
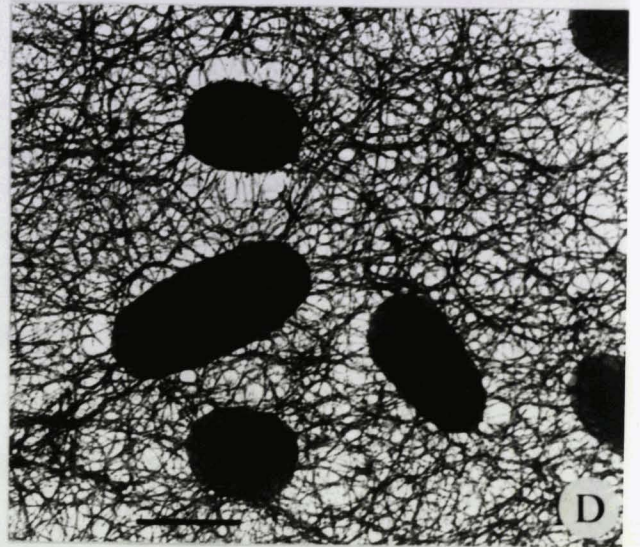
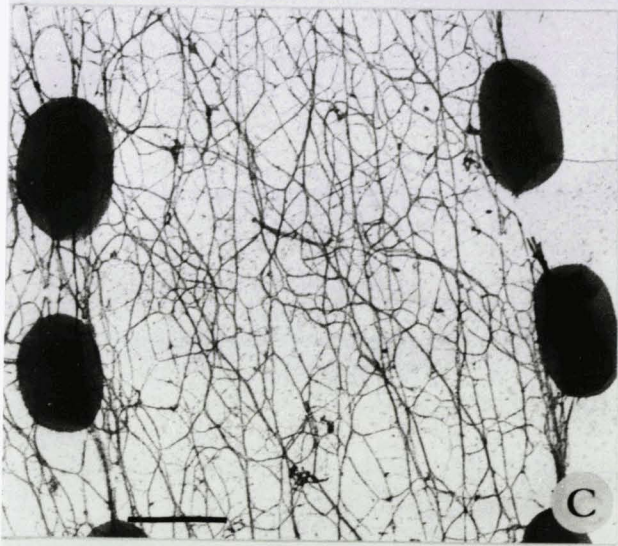
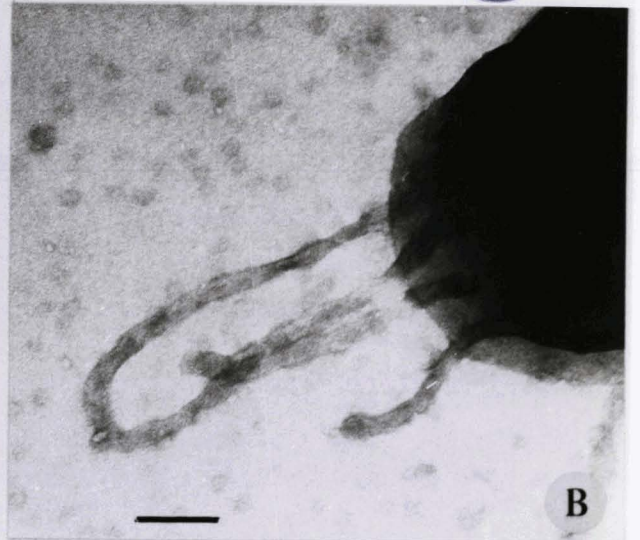
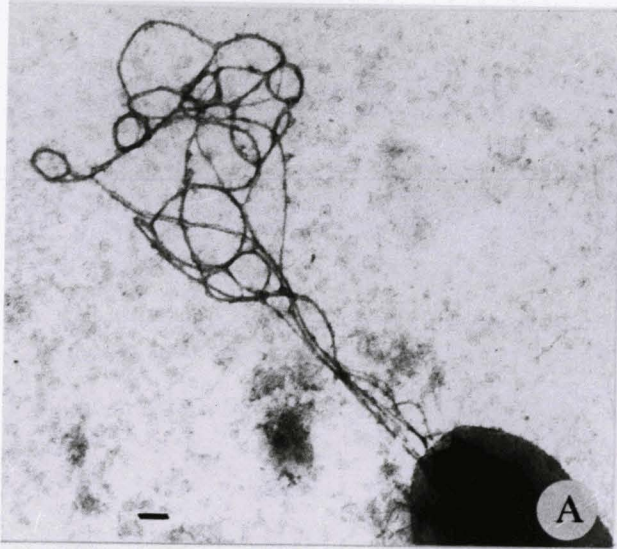


PLANCHE 3

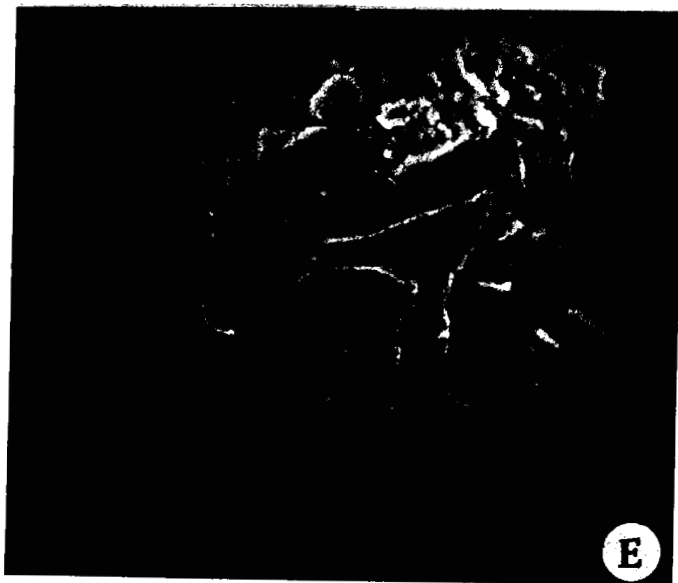
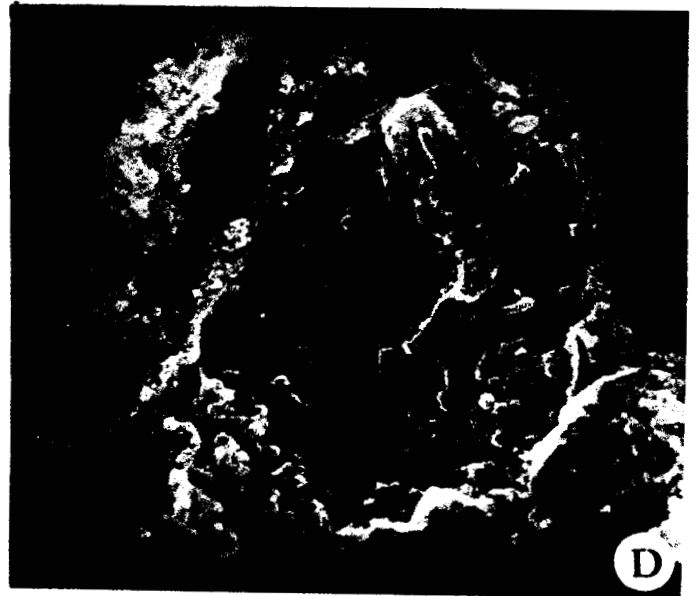
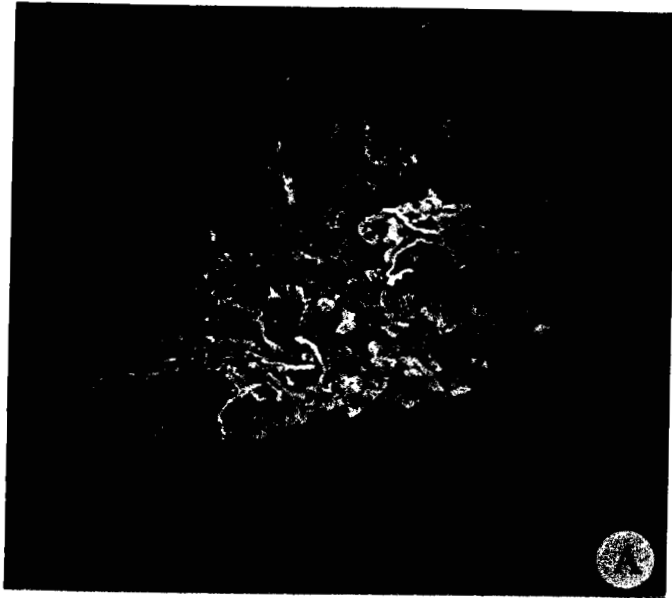


PLANCHE 4

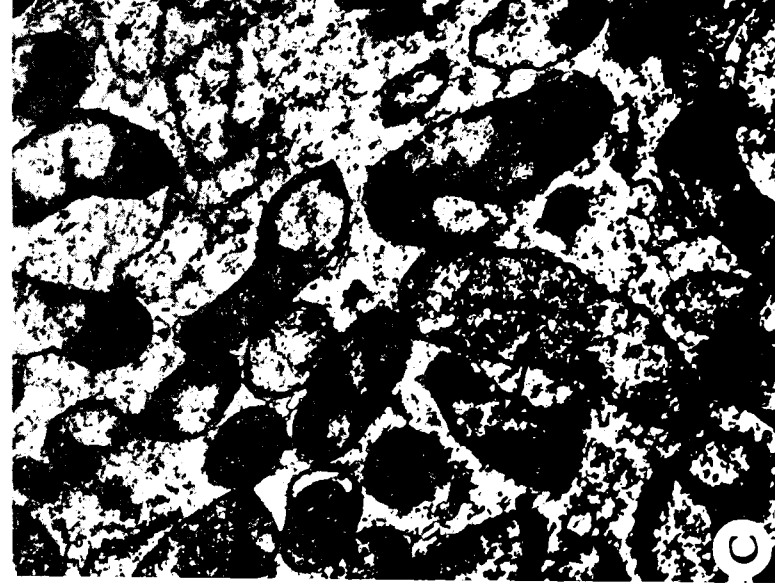
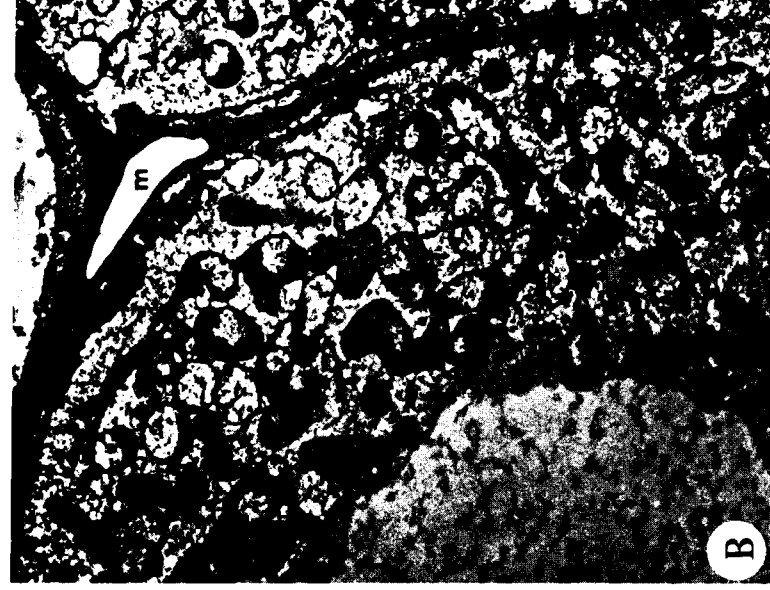
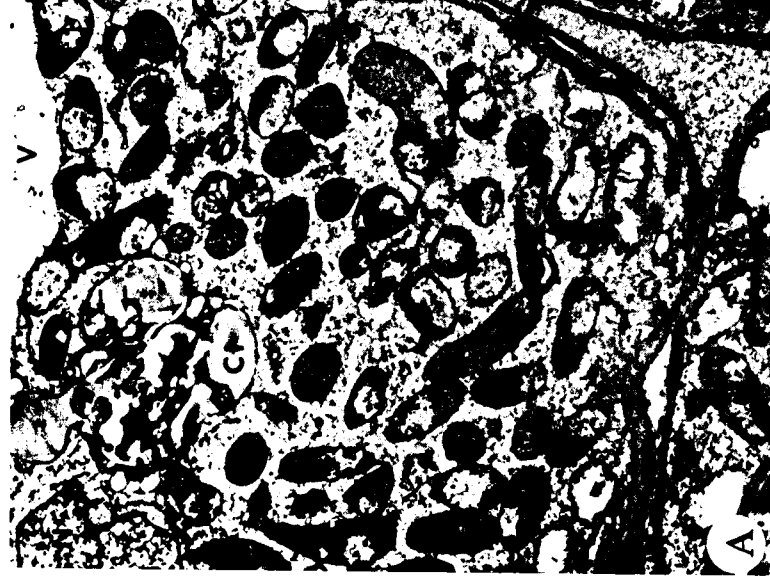
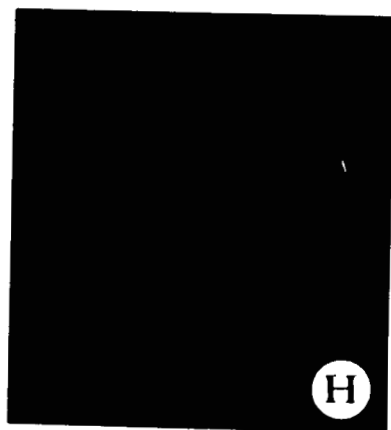
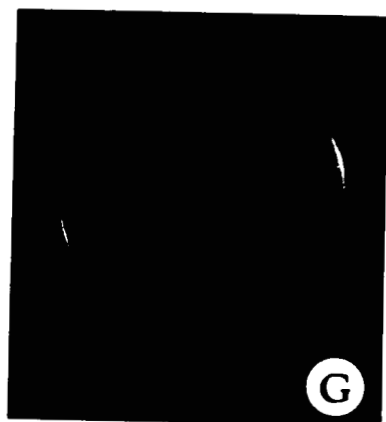
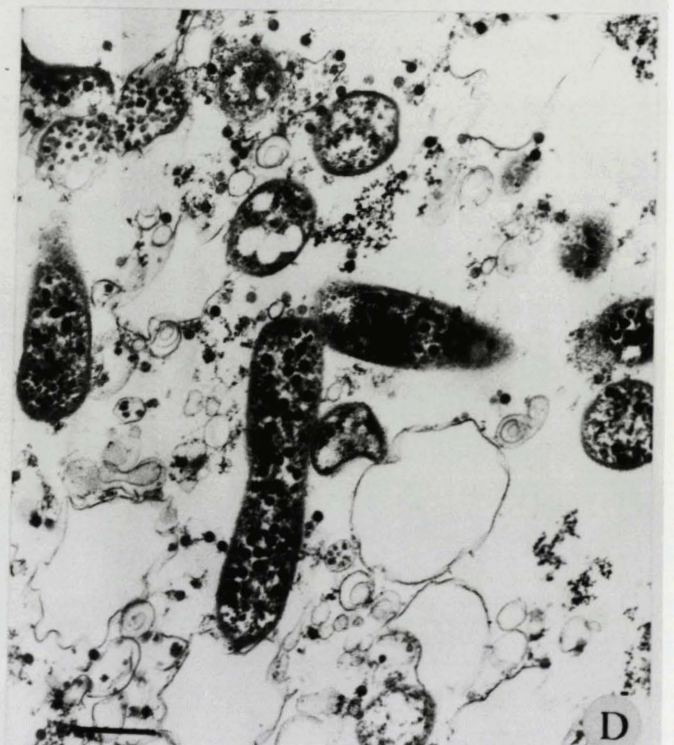
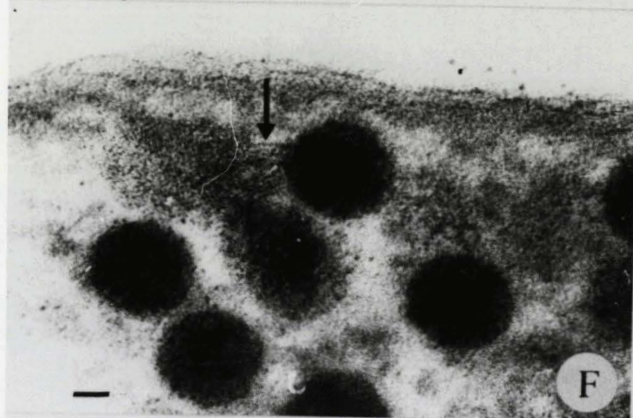
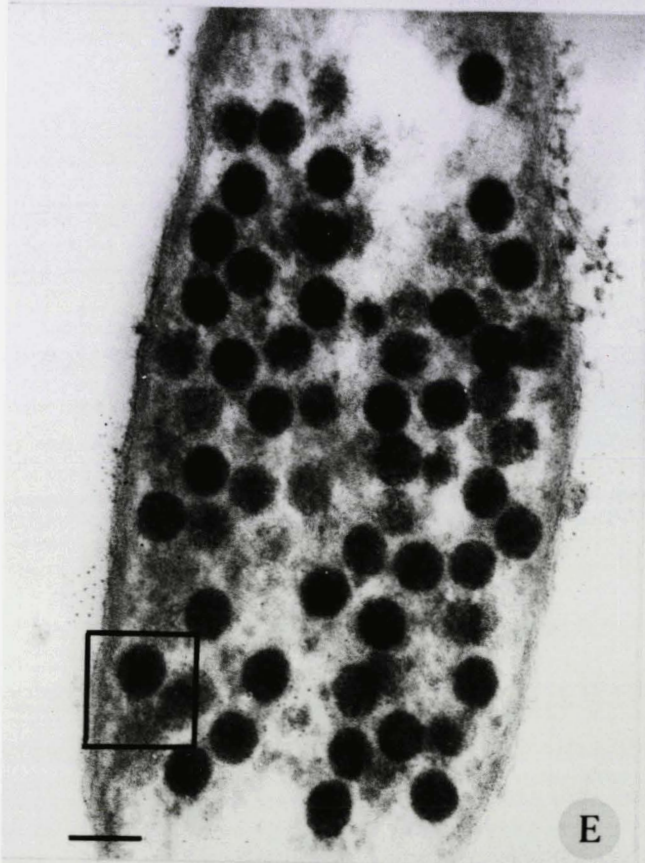


PLANCHE 5





A N N E X E I I

IDENTIFICATION PRESOMPTIVE RAPIDE DE
RHIZOBIUM MELILOTI PAR MICROGALERIES API

I. - PRINCIPE

Les microméthodes API (Appareils et Procédés d'Identification) utilisent le principe de l'identification numérique des bactéries.

Les galeries comportent généralement vingt microtubes contenant des milieux ou des substrats déshydratés, combinant huit tests conventionnels (ex. : urée, nitrates, gélatinase, etc...) et douze tests d'assimilation métabolique (ex. : maltose, arabinose, caprate, etc...).

Les microtubes sont ensemencés, selon les prescriptions du fabricant, à l'aide d'une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par la présence ou l'absence de culture, par le virage d'un indicateur coloré, ou sont révélées par des réactifs.

Les tests sont regroupés par trois. On donne la valeur 0 aux tests négatifs et on attribue pour les réactions positives : la valeur 1 au premier test de chaque groupe, la valeur 2 au deuxième, la valeur 4 au troisième. En additionnant les valeurs positives pour chaque groupe, on obtient un chiffre de 0 à 7 caractérisant une triade de caractères. Pour une vingtaine de tests, les résultats se traduisent par un nombre de 7 chiffres. Un décodeur ou une banque de données informatisée traduit ce profil numérique en précisant le genre et l'espèce de la bactérie étudiée, avec un pourcentage de certitude.

Nous avons donc appliqué ce concept à l'identification présomptive rapide de **Rhizobium meliloti**, à l'aide de deux microgaleries :

- la galerie API 20 NE destinée à l'identification des bacilles à Gram négatif n'appartenant pas à la famille des Enterobacteriaceae,
- la galerie API 20 B utilisée pour les bactéries hétérotrophes de l'environnement.

II. - REALISATION PRATIQUE

Vingt et une souches de la famille des Rhizobiaceae ont été utilisées (tab. 1).

Chacune d'elles est cultivée dans du milieu RC fructosé à 1 p100 en agitation à 30°C puis isolée à la surface de milieux RCG fructosé et incubés à 30°C jusqu'à obtention de colonies suffisamment développées. Après 72 h, on constate une abondante production de mucus.

A partir de ces clones, on réalise les manipulations suivantes :

- coloration de GRAM,
- examen à l'état frais en microscopie optique pour vérifier la mobilité,
- recherche de l'oxydase par la méthode des disques (DIAGNOSTICS PASTEUR),
- recherche de la catalase par l'observation d'un dégagement de bulles d'oxygène lorsqu'une petite quantité de masse bactérienne est immergée dans l'eau oxygénée à 10 volumes,
- ensemencement des galeries par un inoculum plus dense que celui préconisé par le fabricant :
 - . suspension d'opacité égale à 1 de l'échelle de MacFARLAND pour API 20 NE,
 - . suspension d'opacité 2 à 3 de l'échelle de MacFARLAND pour API 20 B.

Ceci permet une lecture des microgaleries après une incubation de 48 h à 30°C.

SOUCHES		ORIGINE
R. meliloti	M11S	U.S.T.L.F.A.
	M13S	
	M14S	
	M18S	
	M19S	
	M5N1	R.I.O. R.C.R.
	M12S	
	2001	
	2004	
	2009	S.R.M.S.
	2011	
	Tu20	
	Ve26	TRUCHET (Toulouse) PULHER (Bielefeld, Allemagne) C.S.I.R.A.
	444	
	E12	
U45		
R. leguminosarum		
bv. viceae	L17	R.C.R.
bv. trifolii	T8	U.S.T.L.F.A.
bv. phaseoli	P6	U.S.T.L.F.A.
Agrobacterium rhizogenes	A4	I.N.R.A. Versailles
A. tumefaciens		I.P.L.

Tableau 1 - Origine des souches utilisées.

- U.S.T.L.F.A. : Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois - Laboratoire de Microbiologie.
- R.I.O. : Research Institut Ontario.
- R.C.R. : Rhothamsted Collection of **Rhizobium**.
- S.R.M.S. : Station de Recherche de Microbiologie des Sols, Dijon.
- C.S.I.R.A. : Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Canberra.
- I.N.R.A. : Institut National de Recherche Agronomique.
- I.P.L. : Institut Pasteur de Lille.

III. - RESULTATS - CONCLUSION

A. - API 20 NE

Nous donnons ci-dessous l'exemple de la fiche d'identification de *R. meliloti* M12S.

24 h	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+		
48 h	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	+		
	NO ₂	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADH	MLT	CIT	PAC	OXI
- 24 h																					
- 48 h	1			6			6			7			7			4				4	

api 20 NE

* NO₂ - NO₃ - N₂
Voir notice technique
See instruction leaflet

- Morph/Gram	SAC. GRAM -
- Pigmentation	-
- Mobilité/Motility	+
- Flagelles/Flagella	+

REF.: M12.S.....	Patient:
Date:	Origine/Source:
Dr:	Service/Dept:

Identification :	
A. RADIOBACTER	99.8 %

L'ensemble des résultats est consigné dans le tableau 2.

Pour 17 des 22 souches, le profil numérique obtenu est celui de *Agrobacterium radiobacter* avec un pourcentage de certitude très élevé. Or, on sait que les *Agrobacterium* et les *Rhizobium* à croissance rapide sont phylogéniquement proches et difficiles à différencier par des critères biochimiques.

Les 5 autres souches ont des profils très voisins, ne différant des autres que par l'utilisation de sucres, la présence d'une arginine déhydrogénase ou d'une gélatinase. Mais les caractères principaux sont identiques et ne contredisent pas les remarques précédentes.

API ZONE	NO ₂	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	MAG	MAL	GNT	CAP	ADI	HLT.	CIT	PAC	OX	Profil numérique	%	Espèce bactérienne correspondante	
M ₁₂ S	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	1667744	99,8	AGRO BACTERIUM RADIOBACTER	
M ₂₀₁₁	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	1667744	99,8		
M ₁₉ S	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1667744	99,3		
M ₅ N ₁	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1667344	99,3		
M ₁₄ S	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1467344	99,2		
Ve ₂₆	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1667744	99,8		
M ₁₃ S	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1667344	99,3		
M ₂₀₀₁	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1667744	99,8		
U ₄₅	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1667344	99,3		
M ₂₀₀₉	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1667744	99,8		
M ₂₀₀₄	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1667744	99,8		
E ₁₂	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1667744	99,8		
L ₁₇	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1667744	99,8		
T ₈	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	1457754	99,8		
A.Rhi.A ₄	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	0667744	98,6		
P ₆ S	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	0667744	98,6		
M ₁₁ S	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1667304			Pas de correspondance avec les taxons répertoriés
TU ₂₀	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	1477745			
M ₄₄₄	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1665344			
M ₁₈ S	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	1577345			
A.tum.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	1777744			

Tableau 2 - Résultats des galeries API 20 NE.

B. - API 20 B

Les fiches d'identification des galeries API 20 B font apparaître des profils numériques à neuf chiffres, tel que celui de *R. meliloti* M12S ci-dessous, rassemblés dans le tableau 3.

api 20B

GEL	NIT	ONPG	SAC	ARA	MAN	FRU	GLU	MAL	AMD	RHA	GAL	MNE	SOR	GLY	URE	IND	H ₂ S	VP	CIT	OX
-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
6			7			7			6			7			1		4			
CAT OF-F MOB			GRAM COCC SPOR			M12S														
+	-	+	-	-	-															
5			0																	

Les trois premiers chiffres (677) correspondent à neuf caractères identiques pour toutes les souches sauf *R. meliloti* Tu20 et *A. tumefaciens* qui possèdent une gélatinase.

Les deux derniers chiffres (50) définissent le genre : bacilles à Gram négatif, non sporulés, non fermentatifs, mobiles, possédant une catalase.

Les quatre chiffres intermédiaires représentent des propriétés variables selon les souches (citrate, urée, sorbitol) ou constantes comme l'utilisation du fructose, glucose, mannose, la production d'indol ou l'absence d'acétoïne.

On obtient donc un profil (677XXXX50) différent de celui des autres bactéries hétérotrophes aérobies rencontrées dans l'environnement (tab. 4) et qui caractérise les *Rhizobium*.

API 20 B	GEL	NIT	ONPG	SAC	ARA	MAN	FRU	GLU	MAL	AMD	RHA	CAL	MNE	SOR	GLY	URE	IND	H ₂ S	VP	CIT	OX	
M ₁₂ S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	677671450
M ₂₀₁₁	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	677611450
M ₁₉ S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	677671450
M ₁₁ S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	677631450
M _{5N1}	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	677671450
M ₁₄ S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	677610450
TU ₂₀	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	777650650
M ₄₄₄	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	677701450
Ve ₂₆	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	677771450
M ₁₈ S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	677771450
M ₁₃ S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	677671450
M ₂₀₀₁	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	677711450
V ₄₅	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	677771450
E ₁₂	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	677671450
M ₂₀₀₉	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	677671450
M ₂₀₀₄	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	677671450
L ₁₇	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	677671450
T ₈₃	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	677770450
A.tum.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	777510650
A.Rhi.A ₄	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	677650650
P ₆ S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	677671650

Tableau 3 - Résultats des galeries API 20 B.

Kurthia	000 000 011	Pseudomonas inerte/ Alcaligenes	000 001 650
	000 000 211		200 000 450
Arthrobacter	177 570 411		200 001 650
	263 011 611		300 001 450
	457 510 411		600 001 750
	457 770 611		
Acinetobacter	022 000 212	Bacillus	100 000 755
Micrococcus	000 000 213		500 001 755
	000 000 613		557 170 755
	000 100 013	Enterobacteriaceae	203 012 170
	200 000 313		203 413 070
Bacillus	000 001 615		207 416 070
Streptococcus	017 410 023		247 472 070
	417 410 023		247 474 070
	457 770 023		267 674 270
Enterobacteriaceae	243 412 030		647 674 270
	247 630 030		657 470 270
	647 651 030		657 670 370
	657 771 330		677 670 270
Staphylococcus	017 000 133	Vibrionaceae Vibrio	357 311 770
	015 050 133	Plesiomonas	677 513 770
	117 040 133		677 552 670
	117 050 033	Aeromonas	777 553 770
	117 050 133		
	117 450 133	Bacillus	107 101 775
	517 050 133		117 110 775
Bacillus	307 101 535		147 050 575
			477 750 475

Tableau 4 - Profil numérique des bactéries hétérotrophes aérobies de l'environnement (galeries API 20 B).

En conclusion, l'utilisation des microgaleries API 20 'NE et API 20 B permet une identification présomptive rapide de *R. meliloti*. Les résultats obtenus étant à rapprocher des caractères cultureux de la souche étudiée, la microméthode s'avère suffisante pour vérifier rapidement, lorsque c'est nécessaire, l'identité du clone utilisé.

ABREVIATIONS DES TESTS ET REACTIONS UTILISES

DANS LES GALERIES API 20 NE ET API 20 B

GEL	:	gélatine.
NO ₂ ou NIT	:	formation de nitrites.
ONPG ou PNPG	:	β-galactosidase.
TRP	:	tryptophane désaminase.
ADH	:	arginine déshydrogénase.
URE	:	uréase.
ESC	:	esculine.
SAC	:	saccharose.
ARA	:	arabinose.
MAN	:	mannitol.
FRU	:	fructose.
GLU	:	glucose.
MAL	:	maltose.
AMD	:	amidon.
RHA	:	rhamnose.
NAG	:	N-acétyl-glucosamine.
GAL	:	galactose.
MNE	:	mannose.
SOR	:	sorbitol.
GLY	:	glycérol.
GNT	:	gluconate.
CAP	:	caprate.
ADI	:	adipate.
MLT	:	malate.
PAC	:	phényl acétate.
IND	:	indole.
H ₂ S	:	formation de H ₂ S.

VP	:	réaction de VOGES-PROSKAUER (acétoïne).
CIT	:	citrate SIMMONS.
OX	:	oxydase.
CAT	:	catalase.
O.F.F.	:	oxydation-fermentation.
MOB	:	mobilité.
GRAM	:	coloration de GRAM.
COCC	:	Coccus.
SPOR	:	spores.

BIBLIOGRAPHIE

- AAIJ C. and BORST P.
Biochem. Biophys. Acta, 1971, 269 : 192-200.
- ABE M., SHERWOOD J.E., HOLLINGSWORTH R.I. and DAZZO F.B.
J. Bacteriol., 1984, 160 : 517-520.
- ACKERMANN H.W. and EISENSTARK A.
Intervirology, 1974, 3 : 301-219.
- ACKERMANN H.W.
Microbiol. Sci., 1987, 4 : 214-218.
- ACKERMANN H.W. and DUBOW M.S.
Occurrence and frequency of bacteriophages, pp. 29-47 ; Phage multiplication, pp. 49-85.
In : "Virus of prokaryotes", vol. 1 : "General properties of bacteriophages".
C.R.C. Press, 1987, Boca Raton, Floride.
- ADAMS M.H.
Methods of study in bacterial viruses.
In : "Bacteriophages", ADAMS M.H. (Ed.), 1959, pp. 443-522, Interscience
Publisher Inc., New-York.
- ALSAADAWI I.S.
Plant Soil, 1987, 102 : 279-282.
- ALTMANN F., MÄRZ L., STIRM S. and UNGER F.M.
FEBS Lett., 1987, 221 : 145-149.
- AMEMURA A., HARADA T., ABE M. and HIGASHI S.
Carbohydr. Res., 1983, 115 : 165-174.
- AMINOFF D.
Biochem. J., 1961, 81 : 384-392.
- ANDRIANTSIMIAVONA RAKOTONISAINANA M.
D.E.A., Université de Lille Flandres-Artois, 1981.
- ARBER W. and DUSSOIX D.
J. Mol. Biol., 1962, 5 : 18-36.
- ARBER W. and LINN S.
Annu. Rev. Biochem., 1969, 38 : 467-500.
- ATKINS G.J. and HAYES A.H.
J. Gen. Microbiol., 1972, 73 : 273-278.
- AULING G., BUSSE J., HAHN M., HENNECKE H., KROPPESTEDT R.M.,
PROBST A. and STACKEBRANDT E.
Syst. Appl. Microbiol., 1988, 10 : 264-272.
- BAL A.K., SHANTARAM S. and RATNAM S.
J. Bacteriol., 1978, 133 : 1393-1400.

- BAMFORD D.M., ROMANTSCHUK M. and SOMERHARJU P.J.
EMBO J., 1987, 6 : 1467-1474.
- BANFALVI Z., KONDOROSI E. and KONDOROSI A.
Plasmid, 1985, 13 : 129-139.
- BARBE J., VILLAVERDE A. and GUERRERO R.
FEMS Microbiol. Lett., 1982, 15 : 291-294.
- BARBOUR W.M. and ELKAN G.H.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55 : 813-818.
- BARNET Y.M. and VINCENT J.M.
J. Gen. Microbiol., 1970, 61 : 319-325.
- BARNET Y.M. and HUMPHREY B.
Can. J. Microbiol., 1975, 21 : 1647-1650.
- BARNET Y.M.
Can. J. Microbiol., 1980, 26 : 572-576.
- BECHET M. et GUILLAUME J.B.
Can. J. Microbiol., 1978, 24 : 960-966.
- BEIJERINCK M.W.
Bot. Ztg., 1888, 46 : 740-750.
- BELLOGIN R.A., ESPUNY M.R., GUTIERREZNAVARRO A. and PEREZ SILVA J.
Microbios, 1984, 41 : 97-104.
- BENEDI V.J., CIURANA B. and TOMAS J.M.
Can. J. Microbiol., 1988, 34 : 918-921.
- BERGERSEN F.J.
Formation and function of bacteroids.
In : "Biology of Nitrogen Fixation", QUISPÉL A. (Ed.), 1974, pp. 473-498,
North Holland Press, Amsterdam.
- BERINGER J.E., BREWIN N.J. and JOHNSTON A.W.B.
Heredity, 1980, 45 : 161-186.
- BERTANI G. and WEIGLE J.J.
J. Bacteriol., 1953, 65 : 113-121.
- BETTIOUI M.
DEA, Université Technologique de Compiègne, 1988.
- BHUVANESWARI T.V., BHAGWAT A.A. and BAUER W.D.
Plant Physiol., 1981, 68 : 1144-1149.
- BICKLE T.A.
ATP-dependent restriction endonucleases.
In : "Nucleases", LINN S.M. and ROBERTS R.J. (Eds), 1982, pp. 85-108,
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York.

- BLOCK T., MILLER R., KORNGOLD R. and JUNGKIND D.
Biotechniques, 1989, 7 : 756-762.
- BLONDEAU R.
Symbiose avec les Légumineuses.
In : "Fixation biologique de l'azote atmosphérique". Vuibert (ed.), 1981,
pp. 54-80, Paris.
- BOHLOOL B.B. and SCHMIDT E.L.
Science, 1974, 185 : 269-271.
- BOIVIN A. et MESSROBEANU L.
Rev. Immunol., 1935, 1 : 553-569.
- BORTHAKUR D., DOWNIE J.A., JOHNSTON A.W.B. and LAMB J.W.
Mol. Gen. Genet., 1985, 200 : 278-283.
- BOULANGER P. and LETELLIER L.
J. Biol. Chem., 1988, 263 : 9767-9775.
- BOUSSEMAER J.P., SCHRAUWEN P.P., SOURROUILLE T.L. and GUY P.
J. Dairy Res., 1980, 47 : 401-409.
- BOWEN G.D. and ROVIRA A.D.
Annu. Rev. Phytopathol., 1976, 14 : 121-144.
- BOYD A.C., CHARLES I.G., KEYTE S.W. and BRAMMAR W.J.
Nucl. Acid Res., 1986, 14 : 5255-5274.
- BOYER H.W.
Annu. Rev. Microbiol., 1971, 25 : 153-176.
- BRADE H. and RIETSCHER E.T.
Eur. J. Biochem., 1985, 153 : 249-254.
- BRADE H., BRADE L. and RIETSCHER E.T.
Zbl. Bakt. Hyg., 1988, A268 : 151-179.
- BRADLEY D.E.
J. R. Microsc. Soc., 1965, 84 : 257-316.
- BRADLEY D.E.
Bacteriol. Rev., 1967, 31 : 230-314.
- BRADLEY D.E.
A comparative study of the structure and biological properties of bacteriophages.
In : "Comparative Virology". MARAMOROSCH K. and KURSTAK E. (Eds),
1971, pp. 207-253, Academic Press Inc., New-York.
- BRAUN V., SCHALLER K. and WOLFF H.
Biochim. Biophys. Acta, 1973, 323 : 87-97.
- BREWIN N.J., WOOD E.A., LARKINS A.P., GALFRE G. and BUTCHER G.W.
J. Gen. Microbiol., 1986, 132 : 1959-1968.

- BROMFIELD E.S.P., THURMAN N.P., WHITWILL S.T. and BARRAN L.R.
J. Gen. Microbiol., 1987, 133 : 3457-3466.
- BROUGHTON W.J., SAMREY V. and STANLEY J.
FEMS Microbiol. Lett., 1987, 40 : 251-256.
- Van BRUSSELL A.A.N., PLANQUE K. and QUISPÉL A.
J. Gen. Microbiol., 1977, 101 : 51-56.
- BRZEZINSKI R. and PIEKAROWICZ A.
J. Mol. Biol., 1982, 154 : 615-627.
- BUCHANAN-WOLLASTON A.V.
J. Gen. Microbiol., 1979, 112 : 135-142.
- BURG D., GUILLAUME J. and TAILLIEZ R.
Arch. Microbiol., 1982, 133 : 162-163.
- CAETANO-ANOLLES G., WALL L.G., DEMICHELI A.T., MACCHI E.M.,
BAUER W.D. and FAVELUKES G.
Plant Physiol., 1988, 86 : 1228-1235.
- CAETANO-ANOLLES G., LAGARES A. and W.D. BAUER
Plant Physiol., 1990, 92 : 456-461.
- CAMPBELL A.
Evolution, 1961, 15 : 153-165.
- CARLSON R.W., SANDERS R.E., NAPOLI C. and ALBERSHEIM P.
Plant Physiol., 1978, 62 : 912-917.
- CARLSON R.W.
Surface chemistry.
In : "Nitrogen fixation", vol. 2 : "**Rhizobium**". BROUGHTON W.J. (Ed.),
1982, pp. 199-234, Clarendon Press, Oxford.
- CARLSON R.W.
J. Bacteriol., 1984, 158 : 1012-1017.
- CARLSON R.W. and YADAV M.
Appl. Environ. Microbiol., 1985, 50 : 1219-1224.
- CARLSON R.W., SHATTERS R., DUH J.L., TURNBULL E., HANLEY B.,
ROLFE B.G. and DJORDJEVIC M.A.
Plant Physiol., 1987a, 84 : 421-427.
- CARLSON R.W., KALEMBASA S., TUROWSKI D., PACHORI P. and
NOEL K.D.
J. Bacteriol., 1987b, 169 : 4923-4928.
- CARLSON R.W., HOLLINGSWORTH R.L. and DAZZO F.B.
Carbohydr. Res., 1988, 176 : 127-136.
- CARLSON R.W., GARCI F., NOEL D. and HOLLINGSWORTH R.
Carbohydr. Res., 1989, 195 : 101-110.

- CARRION M., BHAT U.R., REUHS B. and CARLSON R.W.
J. Bacteriol., 1990, 172 : 1725-1731.
- CAVA J.R., ELIAS P.M., TUROWSKI D.A. and NOEL K.D.
J. Bacteriol., 1989, 171 : 8-15.
- CAVA J.R., TAO H. and NOEL K.D.
Mol. Gen. Genet., 1990, 221 : 125-128.
- CAVIEDES M.A., MEGIAS M., GIL A.M., PALOMARES A.J., RUIZ-BERRAQUERO F.
Arch. Microbiol., 1982, 133 : 20-22.
- CHABY R. and GIRARD R.
Virology, 1980, 105 : 136-147.
- CHEN H. and ROLFE B.G.
J. Plant Physiol., 1987, 127 : 307-322.
- CHEN G.C.C., BROWN A. and LEMA M.W.
Can. J. Microbiol., 1986, 32 : 591-604.
- CHEN KAN N., LAUTENBERGER J.A., EDGELL M.H. and HUTCHINSON C.
J. Molec. Biol., 1979, 130 : 191-209.
- CHEN W.X., YAN G.H. and LI J.L.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1988, 38 : 392-397.
- CHRISTENSEN J.R.
Virology, 1961, 13 : 40-43.
- CLOVER R.H., KIEBER J. and SIGNER E.H.
J. Bacteriol., 1989, 171 : 3961-3967.
- CONN H.J.
Genus III : Alcaligenes Castellani and Chambers.
In : "Bergey's manual of determinative bacteriology", 5th éd. BERGEY D.H., BREED R.S., MURRAY E.G.D. and HITCHENS A.P. (Eds), 1939, pp. 95-102, The Williams and Wilkins Co, Baltimore.
- CONN H.J.
J. Bacteriol., 1942, 44 : 353-360.
- CORFIELD A.P. and SCHAUER R.
Occurrence of sialic acids.
In : "Sialic acids. Cell Biol. Monogr. 10". SCHAUER R. (Ed.), 1982, pp. 5-39, Springer, Wien, New-York.
- COURTOIS B., DERIEUX J.C. et HORNEZ J.P.
Ann. Microbiol. Inst. Pasteur Paris, 1975, 126B : 3-15.
- COURTOIS B.
Thèse de Doctorat es-Sciences, n°625, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 1984.

- COURTOIS B., COURTOIS J., HEYRAUD A. and RINAUDO M.
J. Gen. Appl. Microbiol., 1986, 32 : 519-526.
- CROZAT Y., CLEYET-MAREL J.C., GIRAUD J.J. and OBATON M.
Soil Biol. Biochem., 1982, 14 : 401-405.
- DANDEKAR A.M. and MODI V.V.
Can. J. Microbiol., 1978, 24 : 685-688.
- DANGEARD P.A.
Botaniste, 1926, 16 : 1-275.
- DANSO S.K.A., KEYA S.O. and ALEXANDER M.
Can. J. Microbiol., 1975, 21 : 884-895.
- DAZZO F.B. and HUBBELL D.H.
Appl. Microbiol., 1975, 30 : 1017-1033.
- DAZZO F.B., NAPOLI C.H. and HUBBELL D.H.
Appl. Environ. Microbiol., 1976, 32 : 168-171.
- DAZZO F.B., YANKE W.E. and BRILL W.J.
Biochim. Biophys. Acta, 1978, 539 : 276-286.
- DAZZO F.B., TRUCHET G.L., SHERWOOD J.E., HRABAK E.M., ABE M.
and PANKRATZ S.H.
Appl. Environ. Microbiol., 1984, 48 : 1140-1150.
- DEFIVES C. and WERQUIN M.
6th Int. Congr. Virol., Sendai (Japon), 1984.
- DEFIVES C., OCHIN D., HORNEZ J.P. et WERQUIN M.
Microbiol. Alim. Nut., 1990, 8 : 77-79.
- DEGTYAREV S.K., RECHKUNOVA N.I., KOLYHALOV A.A., DEDKOV V.S.
and ZHILKIN P.A.
Nucl. Acids Res., 1990, 18 : 5807-5810.
- DELATTRE J.M.
Thèse de Docteur-Ingénieur, n°121, Université des Sciences et Techniques
de Lille Flandres-Artois, 1971.
- DELBRUCK M.
J. Gen. Physiol., 1940, 23 : 643-660.
- DELBRUCK M.
J. Bacteriol., 1945, 50 : 131-145.
- DEMAAGD R.A., DERIJK R., MULDER I.H.M. and LUGTENBERG B.J.J.
J. Bacteriol., 1989a, 171 : 1136-1142.
- DEMAAGD R.A., RAO A.S., MULDER I.H.N., GOOSENDEROO L., VAN
LOOSDRECHT C.M., WIJFFELMAN C.A. and LUGTENBERG B.J.J.
J. Bacteriol., 1989b, 171 : 1143-1150.

- DEMOLON A. et DUNEZ A.
Ann. Agron., 1935, 5 : 89-111.
- DESTORANI M.M.C., ROSAS S.B. and GHITTONI M.E.
Anton. Leeuwenhoek J. Microbiol., 1985, 54 : 249-254.
- DESTORANI M.M.C., ROSAS S.B. and GHITTONI M.E.
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1986, 36 : 267-270.
- DHAR B., SINGH B.D., SINGH R.B., SRIVASTAVA J.S., SINGH V.P. and SINGH R.M.
Acta Microbiol. Pol., Ser.A, 1979, 28 : 319-324.
- DHAR B., SINGH B.D., SINGH R.B., SRIVASTAVA J.S. and SINGH R.M.
Indian J. Exp. Biol., 1980, 18 : 1168-1170.
- DHAR B. and RAMKRISHNA K.
Arch. Microbiol., 1987, 147 : 121-125.
- DHAR B., RAMAKRISHNA K., SINGH B.D. and SINGH R.M.
Indian J. Exp. Biol., 1987, 25 : 38-41.
- DIAZ C.L., VAN SPRONSEN P.C., BAKHUIZEN R., LOGMAN G.J.J. and LUGTENBERG E.J.J.
Planta, 1986, 168 : 350-359.
- DIEBOLD R. and NOEL D.
J. Bacteriol., 1989, 171 : 4821-4830.
- DJORDJEVIC M.A., GABRIEL D.W. and ROLFE B.G.
Ann. Rev. Phytopathol., 1987a, 25 : 145-168.
- DJORDJEVIC S.P., CHEN H., BATLEY M., REDMOND J.W. and ROLFE B.G.
J. Bacteriol., 1987b, 169 : 53-60.
- DORGAI L., OLASZ F., BERENYI M., DALLMANN G., PAY A. and OROSZ L.
Mol. Gen. Genet., 1981, 182 : 321-325.
- DORGAI L., OLASZ F. and NEMETH K.
Mol. Gen. Genet., 1986, 205 : 568-571.
- DOWDLE S.F. and BOHLOOL B.B.
Can. J. Microbiol., 1987, 33 : 990-995.
- DOWLING D.N. and BROUGHTON W.J.
Annu. Rev. Microbiol., 1986, 40 : 131-157.
- DREYFUS B., GARCIA J.L. and GILLIS M.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1988, 38 : 89-98.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. and SMITH F.
Anal. Chem., 1956, 28 : 350-356.

- DUDMAN W.F.
J. Bacteriol., 1968, 95 : 1200-1201.
- DUDMAN W.F.
Carbohydr. Res., 1978, 66 : 9-23.
- DUNIGAN E.P., BOLLICH P.K., HUTCHINSON R.L., HICKS P.M.,
ZAUNBRECHER F.C., SCOTT S.G. and MOWERS R.P.
Agron. J., 1984, 76 : 463-466.
- DUTTON G.G.S. and KARUNARATNE D.N.
Carbohydr. Res., 1985, 138 : 277-293.
- DUTTON G.G.S., LAM Z. and LIM A.V.S.
Carbohydr. Res., 1988, 183 : 123-125.
- DYBVIG K., ALDERETE J., WATSON H.L. and CASSELL G.H.
J. Bacteriol., 1988, 170 : 4373-4375.
- EARNSHAW W.C. and HARRISON S.C.
Nature, 1977, 268 : 598-602.
- EDSTROM R.D. and HEATH E.C.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 21 : 638-543.
- EL-HALOU I N.E., OCHIN D. and TAILLIEZ R.
Plant and Soil, 1986, 95 : 337-344.
- ELLIS E.L. and DELBRUCK M.
J. Gen. Physiol., 1939, 22 : 365-384.
- ERIKSSON V., SVENSON S.B., LONNGREN J. and LINDBERG A.A.
J. Gen. Virol., 1979, 43 : 503-511.
- ESKIN B. and LINN S.
J. Biol. Chem., 1972, 247 : 6183-6191.
- EVANS J., BARNET Y.M. and VINCENT J.M.
Can. J. Microbiol., 1979a, 25 : 968-973.
- EVANS J., BARNET Y.M. and VINCENT J.M.
Can. J. Microbiol., 1979b, 25 : 974-978.
- FEIGE V. and STIRM S.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, 71 : 566-573.
- FERNANDEZ-ARIAS H., GOURRET J.P., LENORMAND M. et COLENO A.
C. R. Acad. Sci. Paris, Ser.D, 1973, 277 : 1709-1712.
- FINAN T.M., HARTWIEG E., LE MIEUX K., BERGMAN K., WALKER G.C.
and SIGNER E.R.
J. Bacteriol., 1984, 159 : 120-124.
- FINNE J.
Trends Biochem. Sci., 1985, 10 : 129-132.

- FOX J.A., BOOTH S.J. and MARTIN E.L.
Virology, 1976, 73 : 557-561.
- FRANCK B.
Ber. Deut. Bot. Ges., 1889, 7 : 332-346.
- FRED E.B., BALDWIN I.J. and McCOY E.
Root nodule bacteria and leguminous plants.
Univ. Wisconsin Press, Madison (Wisconsin), 1932, 343 p.
- GAMIAN A. and ROMANOWSKA E.
Structural characterization of a sialic acid containing polysaccharide from **Hafnia alvei** strain 2.
In : "Sialic acids : Proceedings of the Japanese-German Symposium on Sialic acids". SCHAUER R. and YAMAKAWA T. (Eds), 1988, p. 60, Kieler Verlag Wissenschaft + Bildung.
- GARDIOL A.E., TRUCHET G.L. and DAZZO F.B.
Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53 : 1947-1950.
- GAUTIER M. and CHOPIN M.C.
Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53 : 923-927.
- GEREMIA R.A., CAVAINAC S., ZORREQUIETA A., TORO N., OLIVARES J. and UGALDE R.A.
J. Bacteriol., 1987, 169 : 880-884.
- GLAUERT A.M. and GLAUERT R.H.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1958, 4 : 191-194.
- GLAZEBROOK J. and WALKER G.C.
Cell, 1989, 56 : 661-672.
- GLAZEBROOK J., REED J.W., REUBER T.L. and WALKER G.C.
Int. J. Biol. Macromol., 1990, 12 : 67-70.
- GLOWACKA M., RUSSA R. and LORKIEWICZ Z.
Acta Microbiol. Pol., 1986, 35 : 199-206.
- GLOWACKA M., URBANIK T. and DERYLO M.
Arch. Microbiol., 1989, 152 : 539-541.
- GOLEBIEWSKA J., SAWIEKA A. and SWIATEK J.
Acta Microbiol. Pol., 1976, 25 : 161-163.
- GOTTFERT M., MORVATH B., KONDOROSI E., PUTNOKY P., RODRIGUEZ-QUINONES F. and KONDOROSI A.
J. Mol. Biol., 1986, 191 : 411-420.
- GRAHAM P.H. and O'BRIEN M.A.
Antonie van Leeuwenhoek, 1968, 34 : 326-330.
- GREENE P.J., HEYNEKER H.L., BOLIVAR E. and RODRIGUEZ R.L.
Nucl. Acids Res., 1978, 5 : 2373-2380.

- GREGORY D.W. and PIRIE B.J.S.
J. Microsc., 1973, 99 : 251-265.
- GUDOLIN A. and MANNING P.A.
Eur. J. Biochem., 1985, 153 : 89-94.
- HAAR L., JENSEN H.B. and HELLAND D.E.
J. Gen. Virol., 1981, 53 : 115-123.
- HABERMAN A.
J. Mol. Biol., 1974, 89 : 545-563.
- HALVERSON L.J. and STACEY G.
Microbiol. Rev., 1986, 50 : 193-225.
- HANDELSMAN J., UGALDE R.A. and BRILL W.J.
J. Bacteriol., 1984, 157 : 703-707.
- HASHEM F.M., ANGLE J.S. and RISTIANO P.A.
Can. J. Microbiol., 1986, 32 : 326-329.
- HASHEM F.M. and ANGLE J.S.
Soil Biol. Biochem., 1988, 20 : 69-74.
- HASSANI L.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, n°1059, Université des Sciences et
Techniques de Lille Flandres-Artois, 1983.
- HAVELAAR A.H.
Microbiol. Sci., 1987, 4 : 362-370.
- HELEMISH F.A. and ELGAMMAL S.M.A.
Zbl. Mikrobiol., 1987, 142 : 211-214.
- d'HERELLE F.
C. R. Acad. Sci. Paris, Ser.D, 1917, 165 : 373-375.
- HEUMANN W., ROSCH A., SPRINGER R., WAGNER E. and WINKLER K.P.
Mol. Gen. Genet., 1984, 197 : 425-436.
- HEYRAUD A., RINAUDO M. and COURTOIS B.
Int. J. Biol. Macromol., 1986, 8 : 85-88.
- HIGASHI S. and ABE M.
J. Gen. Appl. Microbiol., 1978, 24 : 143-154.
- HILL C., PIERCE K. and KLAENHAMMER T.R.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55 : 2416-2419.
- HITCHCOCK P.J. and BROWN T.M.
J. Bacteriol., 1983, 154 : 269-277.
- HOLLINGSWORTH R.I., ABE M., SHERWOOD J.E. and DAZZO F.B.
J. Bacteriol., 1984, 160 : 510-516.

- HOLLINGSWORTH R.I., CARLSON R.W., GARCIA F. and GAGE H.C.
J. Biol. Chem., 1989a, 264 : 9294-9299.
- HOLLINGSWORTH R.I. and CARLSON R.W.
J. Biol. Chem., 1989b, 264 : 9300-9303.
- HONMA M.A. and AUSUBEL F.M.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1987, 84 : 8558-8564.
- HORNEZ J.P., COURTOIS B., DEFIVES C. et DERIEUX J.C.
C. R. Acad. Sci. Paris, Ser.D, 1974, 278 : 157-160.
- HORNEZ J.P., COURTOIS B. et DERIEUX J.C.
C. R. Acad. Sci. Paris, Sér. D, 1976, 283 : 1559-1562.
- HORNEZ J.P., EL GUEZZAR M. and DERIEUX J.C.
Curr. Microbiol., 1989, 19 : 207-212.
- HOWIESON J.G., EWING M.A. and D'ANTUONO M.F.
Plant Soil, 1988, 105 : 179-188.
- HRABAK E., URBANO M.R. and DAZZO F.B.
J. Bacteriol., 1981, 148 : 697-711.
- HUMBECK C. and WERNER D.
J. Plant Physiol., 1989, 134 : 276-283.
- HYNES M.F., SIMON R., MULLER P., NIEHAUS K., LABES M. and
PUHLER A.
Mol. Gen. Genet., 1986, 202 : 356-362.
- ISHIBASHI K., TAKESUE S., WATANABE K. and OISHI K.
J. Gen. Microbiol., 1982, 128 : 2251-2259.
- IWASHITA S. and KANEGASAKI S.
J. Biol. Chem., 1976, 17 : 5361-5365.
- JACOBY G.A. and SUTTON L.
Plasmid, 1977, 1 : 115-116.
- JACOBY G.A. and SUTTON L.
Plasmid, 1982, 8 : 141-147.
- JANSSON P., KENNE L., LINDBERG B., LJUNGGREN H., LOONGREN J.,
RUDEN W. and SVENSSON S.
J. Am. Chem. Soc., 1977, 99 : 3812-3815.
- JARRELL K.F. and KROPINSKI A.M.B.
J. Virol., 1977, 23 : 461-466.
- JARVIS B.D.W., PANKHURST C.E. and PATEL J.J.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1982, 32 : 378-380.
- JARVIS A.W., HEAP H.A. and LIMSOWTIN G.K.Y.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55 : 1537-1543.

- JENSEN E.S. and SORENSEN L.H.
FEMS Microbiol. Ecol., 1987, 45 : 221-226.
- JIMENEZ J. and CASADESUS J.
J. Heredity, 1989, 80 : 335-337.
- JORDAN D.C.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1982, 32 : 136-139.
- JORDAN D.C.
Family III. Rhizobiaceae (CONN 1938).
In : "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", vol. 1. KRIEG N.R. and HOLT J.G. (Eds), 1984, pp. 234-244. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- KAMBERGER W.
Arch. Microbiol., 1979, 121 : 83-90.
- KANNENBERG E.L. and BREWIN N.J.
J. Bacteriol., 1989, 171 : 4543-4548.
- KAO S. and McCLAIN W.H.
J. Virol., 1980, 34 : 104-107.
- KATINAKIS P., KLEINLANKHORST R.M., LOUWERSE J., VAN KAMMEN A. and VAN DEN BOS R.C.
Plant Mol. Biol., 1988, 11 : 183-190.
- KAWAMURA M., SAKAKIBARA M., WATANABE T., KITA K., HIRAOKA N., OBAYASHI A., TAKAGI M. and YANO K.
Nucl. Acid Res., 1986, 14 : 1985-1990.
- KEDZIERSKA B.
Eur. J. Biochem., 1978, 91 : 545-552.
- KENNE L. and LINDBERG B.
Bacterial polysaccharides.
In : "The Polysaccharides", vol. 2. ASPINALL G.O. (Ed.), 1983, pp. 287-363, Academic Press, New-York.
- KESSLER C. and HOLTKE H.J.
Gene, 1986, 47 : 1-153.
- KIJNE J.W., SMIT G., DIAZ C.L. and LUGTENBERG B.J.J.
J. Bacteriol., 1988, 170 : 2994-3000.
- KIM C.H., TULLY R.E. and KEISTER D.L.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55 : 1852-1854.
- KIRCHNER O.
Beitr. Biol. Pflanz., 1896, 7 : 213-224.
- KISS G.B. and KALMAN Z.
J. Bacteriol., 1982, 150 : 465-470.

- KLAENHAMMER T.R.
FEMS Microbiol. Rev., 1987, 46 : 313-325.
- KNIREL Y.A., VINOGRADOV E.V., L'VOV V.L., KOCHAROVA N.A.,
SHASHKOV A.S., DMITRIEV B.A. and KOTCHETKOV N.K.
Carbohydr. Res., 1984, 133 : C5-C8.
- KNIREL Y.A. and KOCHETKOV N.K.
FEMS Microbiol. Rev., 1987, 46 : 381-386.
- KO Y.H. and GAYDA R.
J. Gen. Microbiol., 1990, 136 : 105-113.
- KOHRING G.W., MAYER F. and MAYER H.
Eur. J. Cell. Biol., 1985, 37 : 1-7.
- KOHRING G.W. and MAYER F.
FEBS Lett., 1987, 217 : 207-210.
- KOL O., MONTREUIL J., FOURNET B., ZALISZ R. and SMETS P.
J. Chromatogr., 1987, 396 : 281-286.
- KOWALSKI M.
Acta Microbiol. Pol., 1967, 16 : 7-12.
- KOWALSKI M.
Acta Microbiol. Pol., SerA, 1970, 2 : 115-122.
- KOWALSKI M. et DENARIE J.
C. R. Acad. Sci. Paris, Ser.D, 1972, 275 : 141-144.
- KRAUSS J.H., REUTER G., SCHAUER R., WECKESSER J. and MAYER H.
Arch. Microbiol., 1988, 150 : 584-589.
- KROPINSKI A.M.B. and CHADWICK J.S.
Can. J. Microbiol., 1976, 21 : 2084-2088.
- KRSMANOVIC-SIMIC D. et WERQUIN M.
C. R. Acad. Sci. Paris, Ser.D, 1973, 276 : 2745-2748.
- KRUGER D.H. and BICKLE T.A.
Microbiol. Rev., 1983, 47 : 345-360.
- LAEMMLI U.K.
Nature, 1970, 227 : 680-685.
- LAEMMLI U.K. and FAVRE M.
J. Mol. Biol., 1973, 80 : 575-582.
- LAFAVRE A.K. and EAGLESHAM A.R.J.
Plant Soil, 1987, 102 : 267-270.
- LAIRD D.G.
Arch. Mikrobiol., 1932, 3 : 159-193.

- LAMBERT P.A.
J. Appl. Bacteriol., Symp. Suppl., 1988, 215-345.
- LAWSON K.A., BARNET Y.M. and McGILCHRIST C.A.
Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53 : 1125-1131.
- LEDERBERG S.
Virology, 1957, 3 : 496-513.
- LEIGH J.A., SIGNER E.R. and WALKER G.C.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1985, 82 : 6231-6236.
- LEIGH J.A., REED J.W., HANKS J.F., HIRSCH A.M. and WALKER G.C.
Cell, 1987, 51 : 579-587.
- LEIGH J.A. and LEE C.
J. Bacteriol., 1988, 170 : 3327-3332.
- LEPAULT J., DUBOCHET J., BASCHONG W. and KELLENBERGER E.
EMBO J., 1987, 6 : 1507-1512.
- LEROUGE P., ROCHE P., FAUCHER C., MAILLET F., TRUCHET G.,
PROME J.C. and DENARIE J.
Nature, 1990, 344 : 781-784.
- LESLEY S.M.
Can. J. Microbiol., 1982, 28 : 180-189.
- LEVIN J. and BANG F.B.
Bull. Johns Hopkins Hosp., 1964, 115 : 265-274.
- LEWIS L.O. and YOUSTEN A.A.
Curr. Microbiol., 1988, 17 : 55-60.
- LICKFELD K.G., MENGE B., HOHN B. and HOHN T.
J. Mol. Biol., 1976, 103 : 299-318.
- LINDSTROM K.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1989, 39 : 365-367.
- LONG S.R.
Cell, 1989, 56 : 203-214.
- LOPES J. and INNES W.E.
J. Bacteriol., 1970, 103 : 238-248.
- LOTZ W. and PFISTER H.
J. Virol., 1975, 16 : 725-728.
- LOTZ W., ACKER G. and SCHMITT R.
J. Gen. Virol., 1977, 34 : 9-17.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J.
J. Biol. Chem., 1951, 193 : 265-273.

- LOWTHER W.L., JOHNSON D.A. and RUMBAUGH M.D.
J. Range Manage., 1987a, 40 : 264-267.
- LOWTHER W.L., RUMBAUGH M.D. and JOHNSON D.A.
J. Range Manage., 1987b, 40 : 268-270.
- LUFT J.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 9 : 408-414.
- LUFT J.H.
Anat. Rec., 1971, 172 : 347-368.
- LURIA S.E. and HUMAN M.L.
J. Bacteriol., 1952, 64 : 557-569.
- LURIA S.E.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1953, 18 : 237-244.
- MacGUIRE E.J. and BINKLEY S.B.
Biochemistry, 1964, 3 : 247-251.
- MAIER R.J. and BRILL M.J.
J. Bacteriol., 1978, 133 : 1295-1299.
- MARANTZ L.A., MOSKALENKO L.N. and RAUTENSTEIN Y.I.
Mikrobiologiya, 1973, 42 : 1088-1094.
- MARTENSSON A.M., GUSTAFSSON J.G. and LJUNGGREN H.D.
J. Gen. Microbiol., 1987, 133 : 3467-3472.
- MARTIN M.O. and LONG S.R.
J. Bacteriol., 1984, 159 : 125-129.
- MARY P., OCHIN D. and TAILLIEZ R.
Appl. Environ. Microbiol., 1985, 50 : 207-211.
- MAYER H., KRAUSS J.H., URBANIK-SYPNIEWSKA T., PUVANESARAJAH V., STACEY G. and AULING G.
Arch. Microbiol., 1989, 151 : 111-116.
- MELLOR H.Y., GLENN A.R., ARWAS R. and DILWORTH M.J.
Arch. Microbiol., 1987, 148 : 34-39.
- MELLOR R.B.
J. Exp. Bot., 1989, 217 : 831-839.
- MELLOR R.B., GARBERS C. and WERNER D.
Plant Mol. Biol., 1989, 12 : 307-315.
- MENICHI B. and BUU A.
J. Bacteriol., 1983, 154 : 130-138.
- MENICHI B. and BUU A.
J. Bacteriol., 1986, 166 : 1137-1140.

- MESELSON M. and YUAN R.
Nature, 1968, 217 : 1110-1114.
- MILLER K.J., GORE R.S., JOHNSON R., BENESI A.J. and RHEINHOLD V.N.
J. Bacteriol., 1990, 172 : 136-142.
- MOAWAD H. and SCHMIDT E.L.
Biol. Fertil. Soils, 1987, 5 : 112-114.
- MORAN A.P., RIETSCHEL E.T., KOSUNEN T.U. and ZHRINGER U.
J. Bacteriol., 1991, 173 : 618-626.
- MORT A.S. and BAUER W.D.
J. Biol. Chem., 1982, 257 : 1870-1875.
- MOSELEY W.K. and WINSLOW R.L.
J. Dairy Sci., 1959, 42 : 906-912.
- MOSSE B.
J. Gen. Microbiol., 1964, 36 : 49-66.
- MOULE A.L. and WILKINSON S.G.
J. Gen. Microbiol., 1989, 135 : 163-174.
- MULLEN W.M.A.
Dairy Ind. Int., 1986, 51 : 39-41.
- MULLER P., HYNES M., KAPP D., NIEHAUS K. and PUHLER A.
Mol. Gen. Genet., 1988, 211 : 17-26.
- MULLIGAN J.T. and LONG S.R.
Genetics, 1989, 122 : 7-18.
- MUTAFTSCHIEV S., VASSE J. and TRUCHET G.
FEMS Microbiol. Lett., 1982, 13 : 171-175.
- MUTOH N., FURUKAWA H. and MIZUSHIMA S.
J. Bacteriol., 1978, 136 : 693-699.
- NATHANS D. and SMITH H.O.
Annu. Rev. Biochem., 1974, 44 : 273-293.
- NEL L., WINGFIELD B.D., VAN DER MEER L.J. and VAN VUUREN H.J.J.
FEMS Microbiol. Lett., 1987, 44 : 63-68.
- OGATA S., MIYAMOTO H. and HAYASHIDA S.
J. Gen. Appl. Microbiol., 1980, 26 : 97-108.
- OKUDA S., SATO M., UCHIYAMA H. and TAKAHASHI H.
J. Gen. Appl. Microbiol., 1975, 21 : 169-184.
- OUAHAL M.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, n°1312, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 1985.

- PALOMARES A.J., MONTOYA E. and OLIVARES J.
Microbios, 1978, 22 : 7-13.
- PANASENKO S.M., JANN B. and JANN K.
J. Bacteriol., 1989, 171 : 1835-1840.
- PERRY M.B., MacLEAN L. and GRIFFITH D.W.
Biochem. Cell Biol., 1986, 64 : 21-28.
- PETERS N.K., FROST J.W. and LONG S.R.
Science, 1986, 233 : 917-1008.
- PLADYS D. and RIGAUD J.
Plant Physiol. Biochem., 1988, 26 : 179-186.
- PLANQUE K., VAN NIEROP J.J., BURGERS A. and WILKINSON S.G.
J. Gen. Microbiol., 1979, 110 : 151-159.
- POSTMA J., VAN ELSAS J.D., GOVAERT J.M. and VAN VEEN J.A.
FEMS Microbiol. Ecol., 1988, 53 : 251-260.
- PRANGISHVILI D.A., VASHAKIDZE R.P., CHELIDZE M.G. and GABRIADZE I.Y.
FEBS Lett., 1985, 192 : 57-60.
- PRICE C., PRIPFL T. and BICKLE T.A.
Eur. J. Biochem., 1987, 167 : 111-115.
- PUTNOKY P., PETROVIC G., KERESZT A., GROSSKOPF E., THI CAM HA D., BANFALVI Z. and KONDOROSI A.
J. Bacteriol., 1990, 172 : 5450-5458.
- PUVANESARAJAH V., SCHELL F.M., GERMOLD D. and STACEY G.
J. Bacteriol., 1987, 169 : 137-141.
- REANNEY D.C. and ACKERMAN H.W.
Adv. Virus Res., 1982, 27 : 205-280.
- REDMOND J.W., BATLEY M., DJORDJEVIC M.A., INNES R.W., KUEMPEL P.L. and ROLFE B.G.
Nature, 1986, 323 : 632-635.
- REUTER G. and SCHAUER R.
Anal. Biochem., 1986, 157 : 39-46.
- REYNOLDS E.S.
J. Cell Biol., 1963, 17 : 208-212.
- ROBERTS R.J.
Nucl. Acids Res., 1986, 13 : r165-r200.
- ROBERTS R.J.
Nucl. Acids Res., 1989, 17 suppl. : r347-r387.

- ROBERTS R.J.
Nucl. Acids Res., 1990, 16 suppl. : 2331-2365.
- ROBERTSON J.G., WELLS B., BREWIN N.J., WOOD E., KNIGHT C.D.
and DOWNIE J.A.
J. Cell. Sci. Suppl., 1985, 2 : 317-331.
- RODRIGUEZ-QUINONES F., BANFALVI Z., MURPHY P. and KONDOROSI
A.
Plant Mol. Biol., 1987, 8 : 61-76.
- ROLFE G.B. and GREESHOFF P.M.
Annu. Rev. Plant Physiol., 1988, 39 : 297-319.
- ROMANTSCHUK M., OLKKONEN V.M. and BAMFORD D.H.
EMBO J., 1988, 7 : 1821-1830.
- ROSLYCKY E.B.
Can. J. Soil Sci., 1981, 61 : 11-17.
- ROSLYCKY E.B.
Soil Biol. Biochem., 1982, 14 : 87-92.
- ROTH L.E., JEON K.W. and STACEY G.
Homology in endosymbiotic systems : the term "symbiosome".
In : "Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions". PALACIOS R.
and VERMA D.P.S. (Eds), 1988, pp. 220-225, APS Press, St-Paul, Minnesota.
- ROTH L.E. and STACEY G.
Eur. J. Cell Biol., 1989, 49 : 13-23.
- RUPELA O.P., TOOMSAN B., MITTAL S., DART P.J. and THOMPSON J.A.
Soil Biol. Biochem., 1987, 19 : 247-252.
- RUSSA R. and LORKIEWICZ Z.
FEMS Microbiol. Lett., 1979, 6 : 71-74.
- RUSSA R., URBANIK T., ZURKOWSKI W. and LORKIEWICZ Z.
Plant and Soil, 1981, 61 : 81-86.
- RUSSA R., URBANIK T. and LORKIEWICZ Z.
Acta Microbiol. Pol., 1983, 32 : 25-30.
- RUSSEL P., SCHELL G.M., NELSON K.K., HALVERSON L.J., SIROTKIN
K.M. and STACEY G.
J. Bacteriol., 1985, 164 : 1301-1308.
- RYTER A. et KELLENBERGER E.
Z. Naturforsch., 1958, 13 : 597-605.
- SAHIM L.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, n°1060. Université des Sciences et
Techniques de Lille Flandres-Artois, 1983.

- SARGENT L., HUANG S.Z., ROLFE B.G. and DJORDJEVIC M.A.
Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53 : 1611-1619.
- SCHOFIELD P.R., GIBSON A.H., DUDMAN W.F. and WATSON J.M.
Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53 : 2942-2947.
- SCHOLLA M.M. and ELKAN G.H.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1984, 34 : 484-486.
- SCHWINGAMER E.A.
Aust. J. Biol. Sci., 1965, 18 : 333-343.
- SEN D., WEAVER R.W. and BAL A.K.
J. Exp. Bot., 1986, 37 : 356-363.
- SERWER P.
J. Mol. Biol., 1986, 190 : 509-512.
- SHAH K., DESOUSA S. and MODI V.V.
Arch. Microbiol., 1981, 130 : 262-266.
- SHARP P.M.
Mol. Biol. Evol., 1986, 3 : 75-84.
- SHAW D.R.D. and CHATTERJEE A.N.
J. Bacteriol., 1971, 108 : 584-585.
- SHERWOOD J.E., HRABAK E.M. and DAZZO F.B.
Abstr. Annu. Meet. Ann. Soc. Microbiol., 1981, 81 : 151.
- SHERWOOD J.E., VASSE J.M., DAZZO F.B. and TRUCHET G.L.
J. Bacteriol., 1984, 159 : 145-152.
- SKILTON H. and WHEELER D.
J. Appl. Bacteriol., 1988, 65 : 387-396.
- SKILTON H. and WHEELER D.
J. Appl. Bacteriol., 1989, 66 : 549-558.
- SLADEK T.L., NOWAK J.A. and MANILOFF J.
J. Bacteriol., 1986, 165 : 219-225.
- SLOPEK S., WEBERDABROWSKA B., DABROWSKI M. and KUCHAROWICZ-KRUKOSKA A.
Arch. Immunol. Ther. Exp., 1987, 35 : 569-584.
- SMIT G., KIJNE J.W. and LUGTENBERG B.J.J.
J. Bacteriol., 1987, 168 : 821-827.
- SMIT G., KIJNE J.W. and LUGTENBERG B.J.J.
J. Bacteriol., 1989a, 171 : 569-572.
- SMIT G., LOGMAN T.J.J., BOERRIGTER M.E.T.I., KIJNE J.W. and LUGTENBERG B.J.J.
J. Bacteriol., 1989b, 171 : 4054-4062.

- SMITH H.O. and WILLCOX K.W.
J. Mol. Biol., 1970, 51 : 379-391.
- SMITH H.O. and NATHANS O.
J. Mol. Biol., 1973, 81 : 419-423.
- SOUROUILLE J.L.
Thèse de Docteur-Ingénieur, Université de Lyon, 1978.
- STACEY G., PAAU A.S., NOEL K.D., MAIER R.J., SILVER L.E. and BRILL N.J.
Arch. Microbiol., 1982, 132 : 219-224.
- STACEY G., POCRATSKY L.A. and PUVANESARAJAH V.
Appl. Environ. Microbiol., 1984, 48 : 68-72.
- STAMM W.W., KITTELMANN M., FOLLMANN H. and TRUPER H.G.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 1989, 30 : 41-46.
- STANIER R.Y., ADELBERG E.A. and INGRAHAM J.L.
The photosynthetic prokaryotes : the evolution of photosynthesis.
In : "General Microbiology", 4th ed., 1976, pp. 559-587, Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- STANIEWSKI R. and KOWALSKI M.
Acta Microbiol. Pol., Ser.A, 1965, 14 : 231-236.
- STANIEWSKI R., JURZYK I. and LORKIEWICZ Z.
Acta Microbiol. Pol., 1973, 5 : 21-25.
- STANIEWSKI R.
Acta Microbiol. Polon., 1980, 29 : 331-341.
- STANIEWSKI R.
J. Basic Microb., 1987, 27 : 153-166.
- STEFFENS W.L., BYRD W. and KADIS S.
Vet. Microbiol., 1990, 25 : 217-227.
- STRAUSS H. and KING J.
J. Mol. Biol., 1984, 172 : 523-543.
- SVAB Z., KONDOROSI A. and OROSZ L.
J. Gen. Microbiol., 1978, 106 : 321-327.
- SZMELCMAN S. and HOFNUNG M.
J. Bacteriol., 1975, 124 : 112-118.
- TAKUMI K., TAKEOKA A., KINOUCI T. and KAWATA T.
Microbiol. Immunol., 1985, 29 : 1185-1195.
- TEMPLE G.S., AYLING P.D. and WILKINSON S.G.
Microbios, 1986, 45 : 81-91.

- TEUBER M., ANDRESEN A. and SIEVERS M.
Biotechnol. Lett., 1987, 9 : 37-38.
- THIERY J.P.
J. Microsc., 1967, 6 : 995-1001.
- THURETTE J.
D.E.A., Université de Technologie de Compiègne, 1989.
- TOMAS J.M. and KAY W.W.
J. Bacteriol., 1984, 159 : 1047-1052.
- TOMAS J.M., BENEDI V.J. and JOFRE J.T.
FEMS Microbiol. Lett., 1987, 41 : 223-228.
- TORTORELLO M.T. and DELWICHE A.
Curr. Microbiol., 1984, 11 : 107-112.
- TSAI C.M. and FRASCH C.E.
Anal. Biochem., 1982, 119 : 115-119.
- TWORT F.W.
Lancet, 1915, 2 : 1241-1243.
- UCHIUMI T., ONO Y., ABE M. and HIGASHI S.
J. Gen. Microbiol., 1989, 135 : 3133-3142.
- UETAKE H., TOYAMA S. and HAGIWARA S.
Virology, 1964, 22 : 202-213.
- UGALDE R.A., HANDELSMAN J. and BRILL W.J.
J. Bacteriol., 1986, 166 : 148-154.
- URBANIK-SYPNIEWSKA T., SEYDEL U., GRECK M., WECKESSER J.
and MAYER H.
Arch. Microbiol., 1989, 152 : 527-532.
- VANDENBERG P.A., WRIGHT A.M. and VIDAVER A.K.
Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49 : 994-996.
- VANDENBOSCH K.A., BRADLEY D.J., KNOX J.P., PEROTTO S.,
BUTCHER G.W. and BREWIN N.J.
EMBO J., 1989a, 8 : 335-342.
- VANDENBOSCH K.A., BREWIN N.J. and KANNENBERG E.L.
J. Bacteriol., 1989b, 171 : 4537-4542.
- VARKI A. and DIAZ S.
Anal. Biochem., 1984, 137 : 236-247.
- VASSE J., de BILLY F., CAMUT S. and TRUCHET G.
J. Bacteriol., 1990, 172 : 4295-4306.

- VESELY Z., MULLER A., SCHMITZ G.G., KALUZA K., JARSCH M. and KESSLER C.
Gene, 1990, 95 : 129-131.
- VESPER S.J. and BAUER W.D.
Appl. Environ. Microbiol., 1986, 52 : 134-141.
- VESPER S.J., MALIK N.S.A. and BAUER W.D.
Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53 : 1959-1961.
- VINCENT J.M.
J. Gen. Microbiol., 1962, 28 : 658-663.
- VINH T., ADZER B. and FAINE S.
J. Gen. Microbiol., 1986, 132 : 103-109.
- WATANABE T., TAKNO T., ARAI H., NISHIDA H. and SATO S.
J. Bacteriol., 1966, 92 : 477-487.
- WATANABE H. and WATANABE M.
Can. J. Microbiol., 1970, 16 : 859-865.
- WEAVER R.W. and FREDERICK L.R.
Agron. J., 1974, 66 : 233-236.
- WECKESSER J., DREWS G. and FROMME I.
J. Bacteriol., 1972, 109 : 1106-1113.
- WERQUIN M., TAHAR BEN BRAHIM M. and KRSMANOVIC-SIMIC D.
C. R. Acad. Sci. Paris, Sér. D, 1977, 284 : 1851-1854.
- WERQUIN M., DEFIVES C. and SANIEZ M.H.
6th Int. Congr. Virol., 1984a, Sendai (Japan).
- WERQUIN M., DEFIVES C., HASSANI L. and ANDRIANTSIMIAVONA-OTONIA M.
J. Virol. Meth., 1984b, 8 : 155-160.
- WERQUIN M., DEFIVES C., BOUREY S. and ACKERMANN H.W.
VIIth Int. Congr. Virol., 1987, Edmonton (Canada).
- WERQUIN M., ACKERMANN H.W. and LEVESQUE R.C.
Appl. Environ. Microbiol., 1988, 54 : 188-196.
- WERQUIN M.
Thèse de Doctorat d'Etat, n°782, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 1989.
- WERQUIN M., ACKERMANN H.W. and LEVESQUE R.C.
Curr. Microbiol., 1989, 18 : 307-311.
- WESTPHAL O., LUDERITZ O. and BISTER F.
Z. Naturforsch., 1952, B7 : 148-155.

- WESTPHAL, O. and JANN K.
Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure.
In : "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol. 5. WHISTLER R.L. (Ed.), 1965, pp. 83-91, Academic Press Inc., New-York.
- WHEELER D., SKILTON H.E. and CARROLL R.F.
J. Appl. Bacteriol., 1988, 65 : 377-386.
- WHITEHEAD P.R. and BROWN N.L.
J. Gen. Microbiol., 1985, 131 : 951-959.
- WHITFIELD C.
Can. J. Microbiol., 1888, 34 : 415-320.
- WILKINSON S.G. and GALBRAITH L.
Eur. J. Biochem., 1975, 52 : 331-343.
- WILLIAMS M.N.V., KLEIN S. and SIGNER E.R.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55 : 3229-3230.
- WILLIAMS M.N.V., HOLLINGSWORTH R.I., KLEIN S. and SIGNER E.R.
J. Bacteriol., 1990, 172 : 2622-2632.
- WILSON J.J. and TAKAHASHI I.
Can. J. Microbiol., 1978, 24 : 1-8.
- WINKLER K.P.
Dr-dissertation, 1983, Erlangen.
- WOESE C.R., STACKEBRANDT E., WEISBURG W.G., PASTER B.J., MADIGAN M.T., FOWLER V.J., HAHN C.M., BLANZ P., GUPTA R., NEALSON K.H. and FOX G.E.
System. Appl. Microbiol., 1984, 5 : 315-326.
- WOLFSON J.L.
Entomol. Exp. Appl., 1987, 43 : 237-243.
- WOLPERT J.S. and ALBERSHEIM P.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, 70 : 729-737.
- YAMADA H., NOGAMI T. and MIZUSHIMA S.
J. Bacteriol., 1981, 147 : 660-669.
- YORK W.S., McNEIL M., DARVILL A.G. and ALBERSHEIM P.
J. Bacteriol., 1980, 142 : 243-248.
- YU F., YAMADA H. and MIZUSHIMA S.
J. Bacteriol., 1981, 148 : 712-715.
- YUAN R. and REISER J.
J. Molec. Biol., 1978, 122 : 433-445.
- YUAN R.
Annu. Rev. Biochem., 1981, 50 : 285-315.

- YUREWICZ E.C., GHALAMBOR M.A. and HEATH E.C.
J. Biol. Chem., 1971, 246 : 5596-5506.
- ZAJAC E., RUSSA R. and LORKIEWICZ Z.
J. Gen. Microbiol., 1975, 90 : 365-367.
- ZAJAC E. and LORKIEWICZ Z.
J. Gen. Microbiol., 1983, 129 : 3171-3176.
- ZAJAC E.
Acta Microbiol. Pol., 1987, 36 : 169-178.
- ZAJAC E.
J. Basic Microb., 1988, 28 : 409-415.
- ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C. and WINCEDON G.
J. Chromatogr., 1972, 69 : 291-304.
- ZEVENHUIZEN L.P.T.M., SCHOLTEN-KOERSELMAN H.J. and POSTHUMUS
M.A.
Arch. Microbiol., 1980, 125 : 1-8.
- ZHAN H., LEVERY S.B., LEE C.C. and LEIGH J.A.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1989, 86 : 3055-3059.

PUBLICATIONS RELATIVES A LA THESE

- HORNEZ J.P., COURTOIS B., DEFIVES C. et DERIEUX J.C.
Etude des membranes internes dans les bactéroïdes de **Rhizobium meliloti** au sein des nodules de Luzerne (**Medicago sativa**).
C. R. Acad. Sc. Paris, 1974, Ser. D, 278 : 157-160.
- WERQUIN M., DEFIVES C., HASSANI L. and ANDRIANTSIMIYAVONATONIA M.
Large scale preparation of **Rhizobium meliloti** bacteriophages by fermenter culture.
J. Virol. Meth., 1984, 8 : 155-160.
- DEFIVES C., WERQUIN M., OUAHAL M., SAHIM L. and DERIEUX J.C.
Phage growth restriction by **Rhizobium meliloti**.
Microbios Lett., 1986, 31 : 107-114.
- DEFIVES C., BOUSLAMTI R., DERIEUX J.C., KOL O. and FOURNET B.
Characterization of sialic acids containing lipopolysaccharide from **Rhizobium meliloti** M11S.
FEMS Microbiol. Lett., 1989, 57 : 203-208.
- DEFIVES C., OCHIN D., HORNEZ J.P. et WERQUIN M.
Accidents de fabrication du vinaigre causés par un bactériophage.
Microbiol. Alim. Nut., 1990, 8 : 77-79.
- WERQUIN M., DEFIVES C. and SANIEZ M.H.
Isolation and morphology of a bacteriophage which causes troubles during gluconic acid production by industrial fermentation.
6th Int. Congr. Virol., 1984, Sendai (Japon).
- DEFIVES C. and WERQUIN M.
Phages able to interfere in **Rhizobium meliloti** inoculum produced by fermentation.
6th Int. Congr. Virol., 1984, Sendai (Japon).
- WERQUIN M., DEFIVES C., BOUREY S. and ACKERMANN H.W.
Bradyrhizobium japonicum phages : morphology and partial characterization.
VIIth Int. Congr. Virol., 1987, Edmonton (Canada).

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

M. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECUYPER,
DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF,
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL,
PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI, Mes BEAUJEU, LELONG.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON, J. CORTOIS.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

M. A. DUBRULLE.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

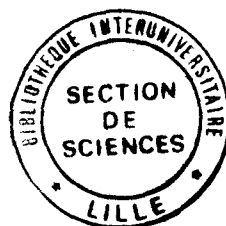
M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNELLE Jean Pierre	Chimie-Physique
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie-Physique
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DHAINAUT André	Biologie animale
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GRANELLE Jean jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LEROY Jean Marie	Spectrochimie
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MIGEON Michel	E.U.D.I.L.
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PETIT Francis	Chimie organique
M. POUZET Pierre	Modélisation - Calcul scientifique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHAMPS Joel	Spectroscopie moléculaire
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
Mle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. ALLAMANDO Etienne	Composants électroniques
M. ANDRIES Jean Claude	Biologie des organismes
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
M. BASSERY Louis	Génie des procédés et réactions chimiques
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERTRAND Hugues	Sciences Economiques et Sociales
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIS Pierre	Mécanique
M. BOISSIER Daniel	Génie civil
M. BOIVIN Jean Claude	Spectrochimie
M. BOUQUELET Stéphane	Biologie appliquée aux enzymes
M. BOUQUIN Henri	Gestion
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CATTEAU Jean pierre	Chimie organique
M. CAYATTE Jean Louis	Sciences Economiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. CHARET Pierre	Biochimie structurale
M. CHIVE Maurice	Composants électroniques optiques
M. COMYN Gérard	Informatique théorique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
M. CORIAT Benjamin	Sciences Economiques et Sociales
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Tectonique Géodynamique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DEJAEGER Roger	Electrochimie et Cinétique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences Economiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPRES Gilbert	Physique du solide - Cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DHAMELINCOURT Paul	Chimie physique
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides

M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.A.E.)
Mme EVRARD Micheline	Génie des procédés et réactions chimiques
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FAUQUEMBERGUE Renaud.	Composants électroniques
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GOURIEROUX Christian	Probabilités et statistiques
M. GREGORY Pierre	I.A.E.
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrice	Sciences Economiques
M. GRIMBLOT Jean	Chimie organique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.A.E.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANCRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEBVRE Jacques	Physique
M. LEFEBVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEGRAND Pierre	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.A.E.)
M. LEROY Yves	Composants électroniques
M. LESENNE Jacques	Systèmes électroniques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAHIEU Jean Marie	Optique - Physique atomique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MAURISSON Patrick	Sciences Economiques et Sociales
M. NESMACQUE Gérard	Génie Mécanique
M. NESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MORCELLET Michel	Chimie organique
M. MORTREUX André	Chimie organique
Mme NOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
M. NICOLE Jacques	Spectrochimie
M. NOTELET Francis	Systèmes électroniques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée

M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POSTAIRE Jack	Informatique industrielle
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean Claude	EUDIL
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Systèmes électroniques
M. THIEBAULT François	Sciences de la terre
M. THUMERELLE Pierre	Démographie - Géographie Humaine
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOURSEL Bernard	Informatique
M. TREANTON Jean René	Sociologie du Travail
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VASSEUR Christian	Automatique
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WACRENIER Jean Marie	Electronique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
M. WEINSTEIN Olivier	Analyse économique de la recherche et développement
M. WERNER Georges	Informatique théorique
M. WOZNIAK Michel	Spectrochimie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Algèbre



R E S U M E

Rhizobium meliloti est une bactérie induisant chez la Luzerne une symbiose qui aboutit à l'assimilation de l'azote atmosphérique dans des nodules racinaires. Prédateurs des bactéries, les bactériophages semblent jouer un rôle non négligeable sur les populations bactériennes de la rhizosphère et ainsi influencer la symbiose. Nous avons donc étudié quelques aspects de la relation entre *R. meliloti* et ses rhizobiophages.

Dans une première partie, nous avons approfondi nos connaissances de la lyse phagique en milieu liquide. Ainsi nous avons précisé l'importance des ions bivalents Ca^{2+} et Mg^{2+} et de la multiplicité d'infection. Des cinétiques nous ont permis de mesurer les durées de lyse et les rendements en phage. De plus, nous avons montré que l'infection phagique est contrôlée par des systèmes de Restriction-Modification bactériens.

Dans une deuxième partie, nous avons réalisé une étude de l'adsorption du phage sur les bactéries. Ainsi, nous avons constaté que l'accumulation des exopolysaccharides (EPS), secrétés par *R. meliloti* lors de sa croissance, constitue une barrière physique qui gêne l'adsorption. Seul le phage CM1 est capable d'agir sur ces EPS grâce à une activité originale associant une dépolymérase et une succinylestérase qui élimine la plus grande partie des succinates substituant les EPS. Les véritables récepteurs phagiques sont les lipopolysaccharides (LPS). Après extraction et purification, l'analyse des LPS par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse a permis d'identifier les acides gras et les oses constitutifs parmi lesquels il est remarquable de constater la présence d'acide-N-acétylneuraminique et 9-O-N-acétylneuraminique très inhabituels dans les LPS bactériens. Nous avons déterminé que la fraction osidique du LPS neutralisait le rhizobiophage NM8 et mis en évidence le rôle majeur des acides sialiques et, en particulier, les fonctions acétyles dans l'adsorption phagique. L'action d'une neuraminidase a détruit les sites récepteurs des phages suggérant ainsi une localisation externe des acides sialiques dans les LPS.