

50376
1991
240

N°d'ordre : 748



67175

50376
1991
240

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

T H E S E

DE DOCTORAT DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

T I M I N O U N I M o h a m e d

MISE EN EVIDENCE D'UN GENE "crp-like" IMPLIQUE
DANS LE PHENOMENE DE LA REPRESSION CATABOLIQUE
PAR LE SUCCINATE CHEZ RHIZOBIUM MELILOTI

Soutenu le 1er juillet 1991 devant la Commission d'Examen :

Président : GUILLAUME J.B. Professeur
Rapporteurs : DERIEUX J.C. Professeur
PIERARD A. Professeur
Examineurs : NOVEL G. Professeur
KREMBEL J. Professeur
HORNEZ J.P. Maître de Conférences

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, sous la direction de Monsieur le Professeur J.B. GUILLAUME. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accueilli et l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur J.C. DERIEUX pour m'avoir intégré dans son équipe, avoir suivi nos travaux avec intérêt et pour être Rapporteur de cette Thèse.

Que Monsieur le Professeur A. PIERARD, de l'Université Libre de Bruxelles, soit assuré de ma reconnaissance pour sa participation à l'élaboration de ce Mémoire et pour être Rapporteur de ce travail.

Ma reconnaissance s'adresse également à Messieurs les Professeurs J. KREMBEL et G. NOVEL qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur J.P. HORNEZ pour son excellente collaboration et disponibilité, ainsi que pour son aide et conseils, tant scientifiques que personnels, que j'ai beaucoup appréciés. Je le remercie également pour avoir accepté de juger ce Mémoire.

J'adresse aussi mes remerciements à Monsieur M. BECHET pour l'aide qu'il m'a apportée pour la réalisation de ce travail.

J'adresse mes remerciements à tous les membres du personnel du Laboratoire pour leur sympathie et leur aide précieuse.

Je suis très reconnaissant à Mlle DELECOURT qui s'est chargée de la dactylographie de ce Mémoire.

Je tiens enfin à exprimer ma profonde reconnaissance à toute ma famille pour son soutien financier et moral tout au long de mes études.

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

AMPc	:	Adénosine 3'-5' Monophosphate cyclique
Ap	:	Ampicilline
ATC	:	Cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de Krebs
CAP	:	Catabolite Activator Protein
Cm	:	Chloramphénicol
CMF	:	Catabolite Modulator Factor
crp	:	Cyclic AMP receptor protein
Cya	:	Cyclase adénylate
2DG	:	2 Désoxy-glucose
D.O.	:	Densité Optique
ED	:	Entner-Doudoroff
EDTA	:	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGTA	:	Ethylene glycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N'tetraacetic acid
IS	:	Séquence d'insertion
KG	:	Cétogluconate
Km	:	Kanamycine
α MeG	:	α -méthyl-D-glucoside
NEM	:	N-Ethyl-Maléimide
Nm	:	Néomycine
Pb	:	Paire de bases
PEG	:	Polyéthylène glycol
PEP	:	Phosphoenolpyruvate
PTS	:	Système phosphotransférase
rpm	:	Rotation par minute
SDS	:	Sodium Dodécyl Sulfate
Sm	:	Streptomycine
TBE	:	Tris acide orthoborique EDTA
Tc	:	Tétracycline
TNP	:	Tampon de non prolifération
UDP-Gal	:	Uridine Diphosphate Galactoside

TABLE DES MATIERES

AVANT - PROPOS	1
INTRODUCTION	
I. - PRESENTATION DU GENRE <u>RHIZOBIUM</u> ET DE LA SYMBIOSE	2
1.1. <u>Le genre Rhizobium</u>	2
1.2. <u>La symbiose</u>	2
II. - NUTRITION CARBONEE DES CELLULES LIBRES DE <u>RHIZOBIUM</u>	4
III. - TRANSPORT ET METABOLISME ENERGETIQUE DES SUBSTRATS CARBONES CHEZ LES CELLULES LIBRES DE <u>RHIZOBIUM</u>	4
3.1. <u>Le transport</u>	4
3.1.1. Transport des disaccharides	6
3.1.2. Transport des hexoses	6
3.1.3. Transport des acides dicarboxyliques	9
3.2. <u>Le métabolisme énergétique</u>	11
3.2.1. Dégradation des disaccharides	11
3.2.2. Dégradation des hexoses	14
3.2.3. Dégradation des polyols	16
3.2.4. Dégradation des pentoses	16
3.2.5. Métabolisme des acides organiques	17

IV. - TRANSPORT ET METABOLISME DES SUBSTRATS	
CARBONES CHEZ LES BACTEROIDES	17
4.1. <u>Le transport</u>	17
4.2. <u>Métabolisme</u>	19
V. - REGULATION	21
5.1. <u>Les "effets glucose"</u>	21
5.1.1. La répression catabolique et rôle de l'AMPc	22
5.1.2. Relation entre répression catabolique et exclusion d'inducteur	25
5.2. <u>Régulation de la synthèse de l'AMPc :</u> <u>intégration par le système des phosphotransférases</u>	28
VI. - LES ELEMENTS GENETIQUES TRANSPOSABLES	30
6.1. <u>Découverte</u>	30
6.2. <u>Les différents groupes</u>	31
6.2.1. Les séquences d'insertion "IS"	31
6.2.2. Les transposons : Tn	32
6.2.3. Episomes	32
6.2.4. Bactériophages	35
6.3. <u>Structure et propriétés du transposon Tn5</u>	35
6.4. <u>Intérêt de mutagenèse par transposition</u>	38
6.5. <u>Utilisation du Tn5 pour l'obtention de mutants</u> <u>chez Rhizobium</u>	39
VII. - LES TRANSFERTS GENETIQUES	40
7.1. <u>La transformation</u>	40
7.1.1. Compétence naturelle	40
7.1.2. Compétence induite artificiellement	41
7.1.2.1. <u>Utilisation des ions divalents</u>	41
7.1.2.2. <u>Transformation avec du</u> <u>polyéthylène-glycol</u>	42

7.2. <u>La conjugaison</u>	42
VIII. - CONCLUSION	42

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

I. - SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES	44
II. - TAMPONS ET MILIEUX DE CULTURE	44
2.1. <u>Tampon de non prolifération (TNP)</u>	44
2.2. <u>Milieu minimum de croissance (RHB1)</u>	44
2.3. <u>Milieu riche TY (Tryptone-Yeast)</u>	46
2.4. <u>Milieu de Luria Burrous (LB)</u>	46
2.5. <u>Milieu de NICOL et THORNTON (1941)</u>	46
III. - CONDITIONS DE CULTURE	47
3.1. <u>Croissance bactérienne</u>	47
3.2. <u>Culture en microbiomètre</u>	47
IV. - ANTIBIOTIQUES	47
4.1. <u>Solution d'antibiotiques</u>	47
4.2. <u>Détermination de la résistance aux antibiotiques</u>	48
V. - TRANSPORT DES SUBSTRATS CARBONES	48
5.1. <u>Préparation des cellules pour les études de transport</u>	48
5.2. <u>Accumulation des substrats</u>	48
VI. - DETERMINATION DU COEFFICIENT DE TRANSFERT EN OXYGENE : LE K_{La}	49
VII. - DOSAGE DES PROTEINES	49

VIII. - DETERMINATION DES PROPRIETES SYMBIOTIQUES	49
8.1. <u>Infectivité</u>	49
8.1.1. Stérilisation des graines de Luzerne et prégermination	50
8.1.2. Culture aseptique des Légumineuses	50
8.1.3. Inoculation de la souche à tester	50
8.2. <u>Efficiéce</u>	50
8.2.1. Conditions expérimentales	51
8.2.2. Technique de dosage	51
8.2.3. Calcul de la quantité d'éthylène produite	51
8.2.4. Isolement des souches à partir des nodules	52
IX. - METHODES D'EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE	53
9.1. <u>Technique rapide selon GROSVELD et coll. (1982)</u>	53
9.2. <u>Méthode de préparation de plasmides selon ISH-HOROWICZ et BURKE (1981)</u>	54
X. - EXTRACTION D'ADN TOTAL	56
XI. - METHODES ELECTROPHORETIQUES	57
11.1. <u>Electrophorèse horizontale</u>	57
11.2. <u>Lyse directe sur gel par électrophorèse verticale</u>	58
11.3. <u>Electroélution</u>	59
XII. - METHODES DE TRANSFERT D'ADN	60
12.1. <u>Transformation</u>	60
12.2. <u>Transposition</u>	60
XIII. - UTILISATION DES ENZYMES	61
13.1. <u>Enzymes de restriction</u>	61
13.2. <u>Ligase</u>	62
13.3. <u>Phosphatase alcaline</u>	62

R E S U L T A T S E T D I S C U S S I O N

I. -	ISOLEMENT DE MUTANTS METABOLIQUES ET ETUDE DE LEURS CARACTERISTIQUES	63
1.1.	<u>Obtention des mutants par transposition</u>	63
1.2.	<u>Vérification de l'appartenance des mutants au genre Rhizobium : infectivité</u>	63
1.3.	<u>Caractéristiques du mutant 2.10</u>	66
1.3.1.	Contrôle de la pureté	66
1.3.1.1.	<u>Digestion d'ADN total</u>	66
1.3.1.2.	<u>Mesure de l'efficience</u>	66
1.3.2.	Propriétés de croissance	69
1.3.3.	Mesure des activités perméasiques	69
1.3.4.	Recherche de la modification du contenu plasmidique	76
1.4.	<u>Obtention et étude des révertants</u>	78
1.4.1.	Réversion	78
1.4.2.	Digestion de l'ADN total	79
1.4.3.	Propriétés symbiotiques	79
1.5.	<u>Conclusion</u>	80
II. -	RECHERCHE DE L'EXISTENCE D'UNE MUTATION SUR LE GENE CODANT POUR LA SYNTHÈSE DE L'AMPcyclique	82
2.1.	<u>Les phénomènes de croissance diauxique</u>	82
2.1.1.	Rappel : effet du succinate sur l'utilisation du glucose	82
2.1.2.	Effet du succinate sur l'utilisation des substrats carbonés	85
2.1.3.	Effet d'autres acides dicarboxyliques sur l'utilisation du glucose	85
2.2.	<u>Mise en évidence du rôle de l'AMPc sur la levée de diauxie</u>	89
2.2.1.	Rappel	89
2.2.2.	Conditions générales d'abolition de la diauxie	89

2.3. <u>Effet de l'addition de l'AMPc sur la croissance du mutant</u> .	91
2.4. <u>Conclusion</u>	91
III. - RECHERCHE DE L'EXISTENCE CHEZ <u>R. MELILOTI</u>	
D'UN GENE EQUIVALENT AU GENRE <u>crp</u> D' <u>E. COLI</u>	96
3.1. <u>Vecteur de clonage</u>	96
3.2. <u>Etapes de clonage</u>	98
3.3. <u>Transformation de la souche d'E. coli CH208:Δ crp</u>	98
3.4. <u>Criblage des transformants</u>	100
3.4.1. Sélection des clones positifs	100
3.4.2. Vérification des souches	100
3.5. <u>Analyse des plasmides recombinants</u>	104
IV. - CONCLUSION	113
CONCLUSION GENERALE ET	
PERSPECTIVES	114
BIBLIOGRAPHIE	117

A V A N T - P R O P O S

L'association symbiotique des souches du genre **Rhizobium** avec les plantes de la famille des Légumineuses se traduit par la fixation de l'azote atmosphérique.

Lors de cette association, l'échange des nutriments entre les deux symbiontes est d'une importance capitale pour le développement et le maintien de la fixation de l'azote.

Les glucides sont très abondants dans les nodules des Légumineuses mais leur rôle dans l'établissement de l'efficacité reste incertain contrairement aux acides dicarboxyliques dont le rôle est primordial.

Dans notre Laboratoire, nous étudions particulièrement le métabolisme énergétique et sa régulation chez les cellules de **Rhizobium** à l'état libre, afin de mieux comprendre leur fonctionnement lors de la symbiose.

Des travaux antérieurs au Laboratoire ont montré que le transport du glucose et du fructose chez **R. meliloti** M5N1 est réalisé par un mécanisme actif qui dépend de l'énergisation de la membrane. Le système de transport de chacun de ces deux hexoses peut être considéré comme constitutif et il subit une répression catabolique par le succinate.

Afin de contribuer à une meilleure compréhension des phénomènes de régulation chez **Rhizobium**, nous avons isolé par méthode biologique des mutants métaboliques. Nous avons obtenu des souches incapables d'utiliser de nombreux substrats carbonés, mais se développant normalement à partir de certains acides organiques dont le succinate.

Les travaux réalisés ont permis de montrer que le système de répression catabolique par le succinate chez **Rhizobium** est voisin de celui existant chez **E. coli** et contrôlé par le glucose.

INTRODUCTION

I. - PRESENTATION DU GENRE RHIZOBIUM ET DE LA SYMBIOSE

1.1. Le genre Rhizobium

Le genre *Rhizobium* regroupe l'ensemble des bactéries capables d'induire la formation de nodules sur les racines des plantes de la famille des Légumineuses.

Des études sérologiques et lysotypiques (DE LEY et RASSEL, 1965 ; VINCENT et HUMPHREY, 1970) ont permis de séparer le genre *Rhizobium* en deux grandes catégories d'espèces (Tab. 1) :

- les espèces à croissance rapide qui ont un temps de génération variant de 2 à 4 h,
- les espèces à croissance lente qui ont un temps de génération de 6 à 8 h.

Chaque espèce est définie par rapport à un ensemble de Légumineuses qu'elle infecte spécifiquement et avec lequel elle entretient des relations symbiotiques.

1.2. La symbiose

Le phénomène de la symbiose se caractérise par une série d'étapes conduisant à un nodule "efficient", c'est-à-dire fixant l'azote atmosphérique.

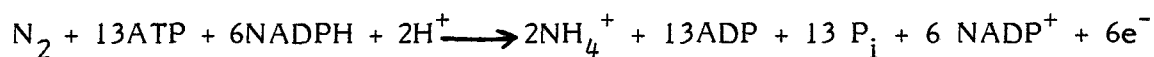
Dans un premier temps, par chimiotactisme vis-à-vis des exsudats racinaires des plantes hôtes, les *Rhizobia* s'attachent aux poils radiculaires et forment par la suite un cordon infectieux qui progresse dans le poil en se ramifiant. Le cordon infectieux pénètre alors dans les cellules végétales où il se désagrège en libérant les bactéries. Les cellules de *Rhizobium* se différencient en "bactéroïdes" : elles prennent une morphologie très variable (pléimorphe), différente de la forme bacillaire qu'elles possèdent habituellement.

Ces bactéroïdes acquièrent alors le pouvoir de fixer l'azote atmosphérique grâce à la nitrogénase. Cet enzyme est régulé par la légghémoglobine qui assure le transport de l'oxygène du cytosol anaérobique des cellules hôtes aux bactéroïdes, tout en protégeant la nitrogénase de l'inactivation par l'oxygène.

Rhizobium	Plantes
Rhizobium meliloti	Medicago (Luzernes), Melilotus (Mélilots), Trigonella (fenu-grec)
Rhizobium leguminosarum	
biovar viceae	Pisum (Pois), Leus (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 NGR 234	Parasponia
Bradyrhizobium sp.	(non légumineuse)

Tableau 1 - Exemples d'associations Rhizobium-plante.

La réduction de l'azote en ammonium peut se résumer comme suit :



II. - NUTRITION CARBONÉE DES CELLULES LIBRES DE RHIZOBIUM

De nombreux auteurs se sont intéressés aux substrats carbonés à partir desquels les espèces de **Rhizobium** tirent leur énergie.

Le tableau 2 représente les sources de carbone utilisées par les espèces de **Rhizobium**.

Chez les Rhizobia à croissance rapide, une grande variété de substrats carbonés est utilisée (hexoses, pentoses, polyols, acides organiques, bi et trisaccharides).

Par contre, les Rhizobia à croissance lente sont incapables d'utiliser les acides organiques, les bi et trisaccharides.

Les acides organiques sont cependant transportés et oxydés par ce second groupe de **Rhizobium** (KEELE et coll., 1970 ; STOWERS et ELKAN, 1984).

Le glycérol constitue la source de carbone la plus universelle pour la croissance de toutes les espèces de **Rhizobium** (ARIAS et MARTINEZ-DRETS, 1976).

III. - TRANSPORT ET METABOLISME ENERGETIQUE DES SUBSTRATS CARBONES CHEZ LES CELLULES LIBRES DE RHIZOBIUM

3.1. Le transport

L'étude des mécanismes de transport chez **Rhizobium** a été effectuée dans la majorité des cas sur les cellules libres de **Rhizobium**. Les auteurs ont pu démontrer que, contrairement à la plupart des autres espèces bactériennes, le transport n'est pas réalisé par le système PTS (phosphotransférase system) et

Source de carbone	Rhizobium à croissance rapide	Rhizobium à croissance lente
Glucose	+ ^a	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Gluconate	ND ^b	+
Mannose	+	+
Mannitol	+	+
Rhamnose	+	ND
Dulcitol	+ ^c	ND
Arabinose	+	+
Xylose	+	+
Raffinose	+	ND
Saccharose	+	+
Lactose	+	±
Tréhalose	+	ND
Glycérol	+	+
Pyruvate	+	±
Citrate	+	±
Succinate	+	±
Fumarate	+	ND
Malate	+	± ^d

Tableau 2. Nutrition carbonée chez *Rhizobium*.

a : la majorité des souches sont capables d'utiliser la source de carbone

b : croissance non déterminée

c : au moins une souche est capable d'utiliser le substrat carboné

d : aucune souche n'est capable d'utiliser la source de carbone

que les hexoses se trouvent dans le cytoplasme sous une forme chimiquement inaltérée. Ceci a été mis en évidence en extrayant et en identifiant le "pool" accumulé. Pour cela, les auteurs ont soit utilisé des analogues structuraux de l'hexose, non métabolisables par la souche étudiée, soit des mutants incapables de dégrader l'hexose transporté.

Il a été démontré que l' α -méthyl glucose (analogue non métabolisable du glucose) chez *R. leguminosarum* WU235 (HUDMANN et GLENN, 1980) ainsi que le fructose (chez un mutant fructokinase négative de la souche MNF 3841) (GLENN et coll., 1984a) de la même espèce et chez *R. meliloti* L5-30 (GARDIOL et coll., 1980) sont accumulés sous une forme non phosphorylée.

3.1.1. Transport des disaccharides

Les Rhizobia à croissance lente sont incapables de transporter les disaccharides (ELKAN et KWIK, 1968) ; par contre, ceux à croissance rapide possèdent au moins 2 systèmes de transport, un commun au saccharose, maltose et tréhalose, et l'autre spécifique au lactose (GLENN et DILWORTH, 1981).

3.1.2. Transport des hexoses

Le transport du glucose, fructose et mannose a été établi chez *Rhizobium*.

Les caractéristiques importantes de chacun de ces transports sont résumées dans le tableau 3.

- Le glucose est transporté activement par énergisation de la membrane plasmique (HUDMAN et GLENN, 1980 ; DE VRIES et coll., 1982 ; STOWERS et ELKAN, 1983).

HORNEZ et coll. (1984) ont montré, chez *Rhizobium meliloti* M5N1, que le succinate réprime la glucose-perméase et que cette répression est levée par l'addition d'AMPc.

La perméase au glucose possède des fonctions thiols libres et son fonctionnement est favorisé par des métaux tels que le magnésium et le

Espèces et souches étudiées	Substrat transporté	Paramètres cinétiques				Inhibition du transport par					Nature de l'accumulation	Nature du système	Références
		Km(a)		Vmax(b)		Découplants énergétiques	NEM	Cyanure	Fluorure	Arséniate			
		(c) Km ₁	(c) Km ₂	(c) Vmax ₁	(c) Vmax ₂								
R. leguminosarum													
WU235	glucose αMeG	1670 297			ND ND	++	++	++	-	-	active par énergisation de la membrane	constitutif	Hudmann et Glenn, 1980
RBL ₁	glucose 2DG αMeG	2,3 54 12,2	29 5800 146	7,6 20,5 2,9	11,5 6,1 12,5	++ ++	++ ND	± ±	ND ND	ND ND	"	"	De Vries et coll., 1982
MNF 3841	fructose	ND			ND	++	ND	ND	ND	ND	"	"	Glenn et coll., 1984
R. meliloti													
L5-30	fructose	2			ND	++	ND	ND	ND	ND	"	inductible	Gardiol et coll., 1980
L5-30	mannose				ND	++	++	++	-	-	"	constitutif	Arias et coll., 1982
R. cowpea													
32 H ₁	glucose	ND			ND	++	+	++	ND	±	"	ND	Stowers et Elkan, 1983
NCR 234	fructose	ND			ND	++	ND	ND	ND	ND	"	inductible	Saroso et coll., 1984

Tableau 3. Les différents systèmes de transport des hexoses et leurs caractéristiques chez les cellules libres de **Rhizobium**.

Abréviations utilisées :

ND : non déterminé ; ++ : inhibition supérieure à 80 % ; + : inhibition entre 55 et 80 % ; ± : inhibition entre 45 et 55 % ; - pas d'inhibition ; (a) valeurs exprimées en μMolaire ; (b) valeurs exprimées en nmoles/min x mg de protéines ; (c) quand un système multiple de transport existe, "1" est le système de forte affinité, "2", de faible affinité.

manganèse. De plus, elle est très spécifique du glucose ; sa stéréospécificité semble être liée à la nature et à la position des substituants des carbones en position 2 et 4 de la molécule du glucose.

- Le fructose est aussi, comme le glucose, transporté par un processus actif dépendant de l'énergisation de la membrane et subissant une répression catabolique AMPc-dépendante par le succinate (HORNEZ et coll., 1984).
- Comme le glucose et le fructose, le mannose est accumulé par un transport actif. La perméase au mannose est inhibée par le N-éthyl-maléimide indiquant qu'elle contient des groupements thiols libres, et elle est réprimée lorsque les cellules sont cultivées sur succinate (ARIAS et coll., 1982).

Les systèmes de transport de ces hexoses ne semblent pas intervenir dans le phénomène de la symbiose. En effet, le mutant fructose-perméase négatif de *R. trifolii*, isolé par RONSON et PRIMROSE (1979), continue à noduler et à fixer l'azote atmosphérique.

En plus des découplants énergétiques du cyanure, qui sont des inhibiteurs du transport d'électrons et qui provoquent une inhibition très sévère de tous les systèmes de transport étudiés, l'utilisation de mutants métaboliques a permis de montrer la nature active de ces systèmes de transport. Ainsi, les mutants fructokinase négatifs de *R. meliloti* (GARDIOL et coll., 1980) et *R. leguminosarum* (GLENN et coll., 1984a) et le mutant phosphoglucose-isomérase négatif de *R. meliloti* M5N1 (EL GUEZZAR et coll., 1988) accumulent le fructose à l'intérieur des cellules.

En conclusion, le transport des hexoses se fait par un mécanisme actif et à travers une membrane énergisée par un gradient de protons, et il semble que ces systèmes ne sont pas énergisés directement par l'ATP du fait que l'arséniate, qui est un inhibiteur de la constitution du "pool" intracellulaire d'ATP issu du métabolisme intermédiaire, a peu ou pas d'effet sur l'accumulation des hexoses.

3.1.3. Le transport des acides dicarboxyliques

Le transport des acides dicarboxyliques a été étudié chez les différentes espèces de *Rhizobium* (GLENN et coll., 1980 ; McALLISTER et LEPO, 1983 ; SAROSO et coll., 1984 ; ENGELKE et coll., 1987 ; HORNEZ et coll., 1989).

Le tableau 4 résume les études faites sur la malate- et la succinate-perméase chez les cellules libres de *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. cowpea* et *Bradyrhizobium japonicum*.

L'organisation et la régulation des gènes de structure du système de transport des acides dicarboxyliques ont même été caractérisées chez *R. leguminosarum* (RONSON et coll., 1984) et chez *R. meliloti* (BIRKENHEAD et coll., 1988).

Les cinétiques d'accumulation montrent que les perméases spécifiques à ces acides fonctionnent comme des enzymes mickaéliennes et les Km apparents sont de l'ordre du millimolaire et varient en fonction des espèces étudiées.

Chez *Bradyrhizobium japonicum* USD 110 et USDA 217, McALLISTER et LEPO (1983) démontrent que le transport du succinate est sévèrement inhibé par le cyanure, l'azide et le 2,4-dinitrophénol ; par contre, l'arséniate est sans effet. Ce résultat suggère que le succinate est transporté par un mécanisme actif dépendant de l'énergisation de la membrane.

Quant à la nature inductible ou constitutive de ces perméases, les études effectuées ont montré des différences en fonction des espèces et des souches étudiées. Ainsi chez *R. leguminosarum* WU 235, *Bradyrhizobium japonicum* USDA I-110 et *R. cowpea* USDA 3278, la succinate- et la malate-perméase sont constitutives.

Par contre, chez *R. leguminosarum* GF 160 et GF 252, *R. trifolii* CF 7012 et *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 et USDA 117, le système de transport du succinate est inductible. En effet, ces souches cultivées sur d'autres substrats montrent une très faible accumulation du succinate.

Le fumarate et le malate sont transportés par le même système, en vertu de l'inhibition compétitive exercée par ces substrats lors du transport du

Espèce et souche étudiées	Substrat transporté	Paramètres cinétiques		Inhibition du transport par				Nature de l'accumulation	Nature du système	Références
		Km(a)	Vmax(b)	Découplants énergétiques	NEM	Cyanure	Arséniate			
R. leguminosarum										
GF 160	succinate malate	2,6	78,0					Active par énergisation de la membrane		Finan et coll., 1981
CFS 18	succinate malate	1,9	36,0	++	ND	ND	-		Inductible	
WU 235	succinate	ND	ND	++	++	++	-		constitutif	Glenn et coll., 1980
R. cowpea										
NGR 234	succinate	ND	ND	++	ND	ND	ND	"	Inductible	Saroso et coll., 1984
USDA 3278	succinate	10,0	23,0	++	++	++	-	"	constitutif	San Francisco et Jacobson, 1985
	malate	6,1	7,7	++	++	++	-	"		
B. japonicum										
USDA I-110	succinate	7,5	22,5	++	++	++	-	"	"	San Francisco et Jacobson, 1985
	malate	6,7	12,6	++	++	++	-	"	"	
USDA 110	succinate	3,8	1,6	++	ND	++	-	"	plutôt Inductible	McAllister et Lepo, 1983
USDA 217	succinate	1,8	3,3	++	ND	++	-	"		
R. trifolii										
CF 7012	succinate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Inductible	Ronson et coll., 1981

Tableau 4. Le transport des acides dicarboxyliques en C₄ et sa régulation chez les cellules libres de Rhizobium (d'après THEODOROPOULOS, 1986).

Abréviations utilisées :

ND : non déterminé ; ++ : inhibition supérieure à 80 % ;
 = : inhibition entre 55 et 80 % ; + : inhibition entre 45 et 55 % ;
 - : pas d'inhibition ; (a) valeurs exprimées en μ Molaire ; (b) :
 valeurs exprimées en nmoles.mn x mg de protéines.

succinate (FINAN et coll., 1981 ; RONSON et coll., 1981) et aussi du fait que les mutants déficients au niveau de la perméase au succinate n'utilisent pas non plus les deux autres acides dicarboxyliques.

Le système de transport des acides dicarboxyliques est d'une importance majeure dans le phénomène de la fixation d'azote chez diverses espèces de *Rhizobium*. Ainsi des mutants de *R. meliloti* (BOLTON et coll., 1986 ; ENGELKE et coll., 1987 ; HORNEZ et coll., 1989), *R. trifolii* (RONSON et coll., 1981) et *R. leguminosarum* (FINAN et coll., 1981), incapables de transporter les acides dicarboxyliques en C₄, forment des nodules inefficients. Ces nodules sont blanchâtres et dépourvus de légghémoglobine.

3.2. Le métabolisme énergétique

Les études, entreprises sur le métabolisme énergétique des cellules libres de *Rhizobium*, montrent qu'un grand nombre de substrats carbonés est utilisé par *Rhizobium* pour la croissance et la production d'énergie.

Les principales voies de dégradation de ces substrats carbonés sont représentées sur les figures 1 et 2.

3.2.1. Dégradation des disaccharides

L'assimilation des disaccharides tels que le saccharose, le lactose est réduite aux Rhizobia à croissance rapide.

L'invertase, l'enzyme dégradant le saccharose, est détectée uniquement dans les extraits cellulaires de *R. meliloti*, *R. leguminosarum* et *R. trifolii* (MARTINEZ-DRETS et coll., 1974).

La nature inductible de cet enzyme est justifiée par son activité élevée quand les cellules sont cultivées sur saccharose.

La β -galactosidase qui hydrolyse le lactose en glucose + galactose est présente, elle aussi, dans les extraits cellulaires de *R. meliloti*, *R. leguminosarum* et *R. trifolii* en croissance sur le lactose (GLENN et

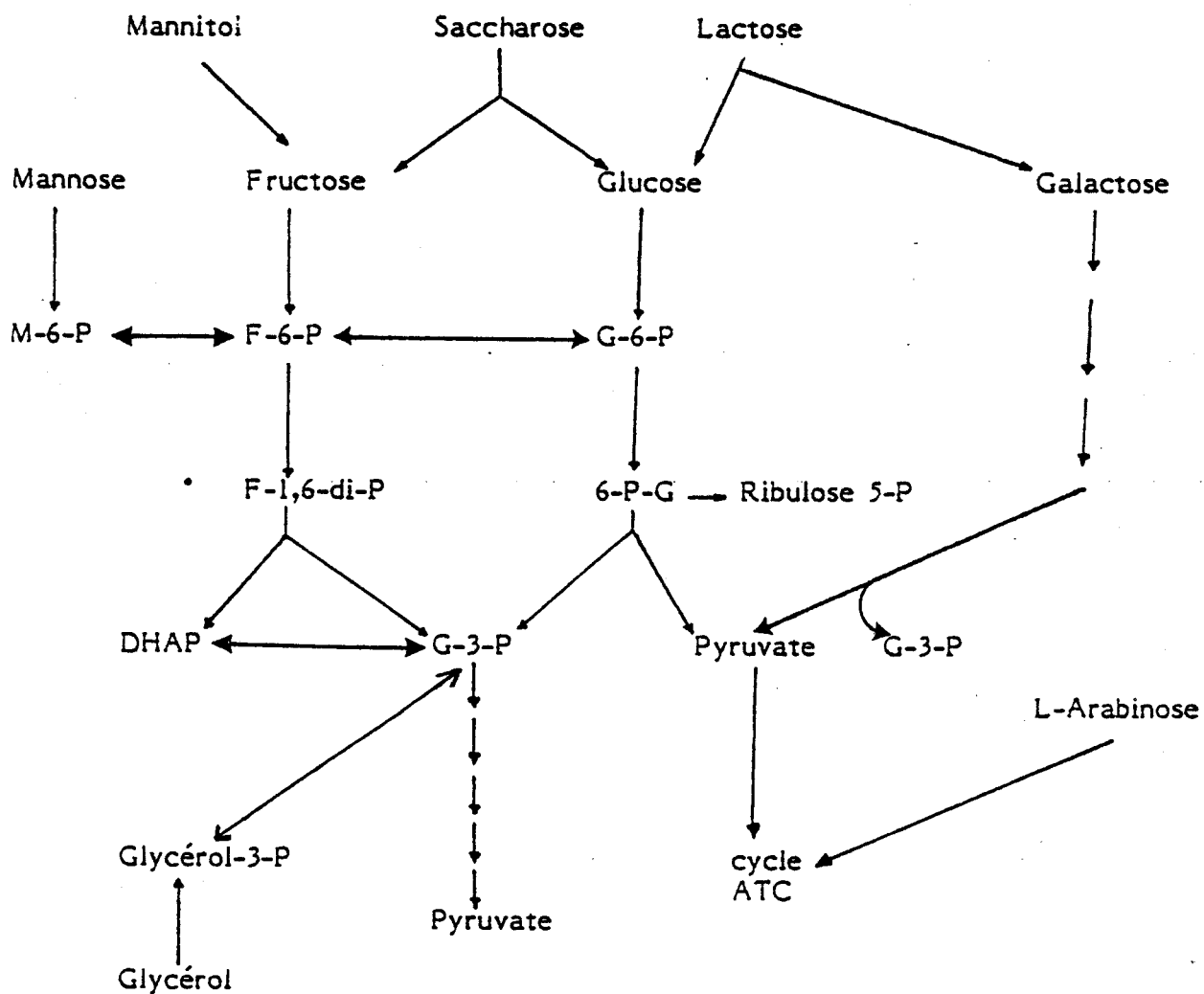


Figure 1. Métabolisme des substrats carbonés chez *Rhizobium* à croissance rapide (d'après EL GUEZZAR, 1987).

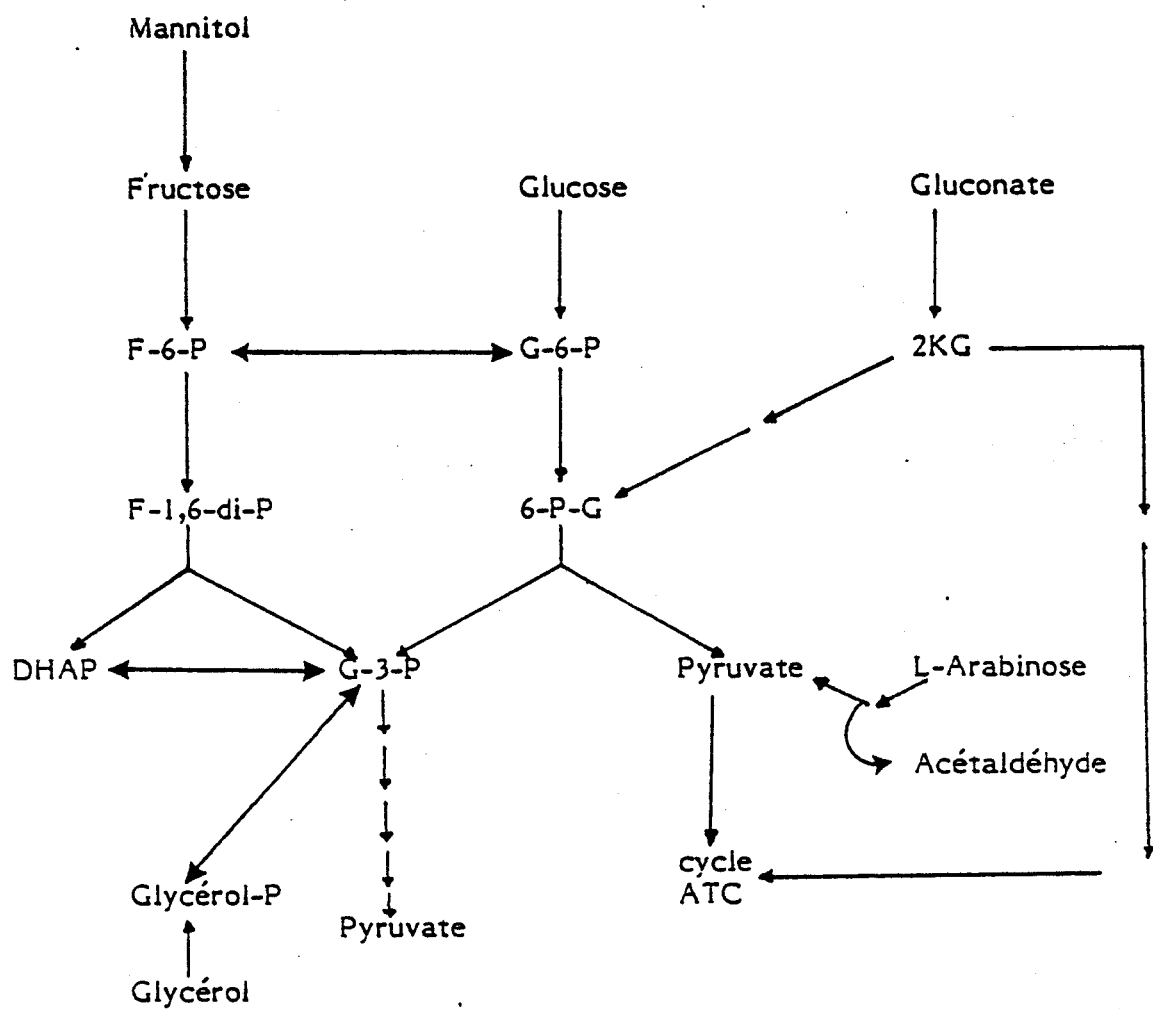


Figure 2. Métabolisme des substrats carbonés chez *Rhizobium* à croissance lente (d'après EL GUEZZAR, 1987).

DILWORTH, 1981), et la nature inductible ou constitutive est dépendante de la souche étudiée.

UCKER et SIGNER (1978) observent que le taux de la β -galactosidase est réduit quand la souche de *R. meliloti* croît sur un mélange de lactose et de succinate, concluant ainsi que le succinate réprime la β -galactosidase.

3.2.2. Dégradation des hexoses

Le métabolisme des hexoses est largement étudié chez *Rhizobium* (KATZNELSON et ZAGALLO, 1957 ; KEELE et coll., 1970 ; GLENN et coll., 1984b ; STOWERS et EAGLESHAM, 1984 ; CHAKRABARTI et coll., 1987).

Les dosages enzymatiques et les analyses radiorespirométriques illustrent l'importance de la voie d'Entner-Doudoroff dans la dégradation des hexoses chez la majorité des espèces de *Rhizobium*.

La gluconate-6-phosphate déshydratase et la 2-céto-3-désoxy-gluconate-6-phosphate aldolase, enzymes clefs de cette voie, ont été détectées chez des espèces de *Rhizobium* en croissance sur glucose (KEELE et coll., 1969 ; MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1972 ; STOWERS et ELKAN, 1983 ; GLENN et coll., 1984b).

La voie d'Embden-Meyerhoff Parnas est présente chez *Bradyrhizobium japonicum* (MULONGOY et ELKAN, 1977), *R. cowpea* (STOWERS ET ELKAN, 1983) et absente chez *R. trifolii* (RONSON et PRIMROSE, 1979), *R. leguminosarum* (GLENN et coll., 1984b) et *R. meliloti* (ARIAS et coll., 1979).

La voie de Dickens-Horecker ou voie des pentoses phosphates est rencontrée exclusivement chez les *Rhizobia* à croissance rapide (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1972).

Chez *R. meliloti*, à côté des voies du métabolisme énergétique du glucose, celui-ci peut emprunter d'autres voies annexes. En effet, la souche de *R. meliloti* M5N1, cultivée sur le glucose, provoque une acidification du milieu d'incubation qui est due à la production d'acide 2-cétogluconique (HORNEZ et coll., 1976).

Le métabolisme du fructose a été étudié chez *R. meliloti* (GARDIOL et coll., 1980 ; EL GUEZZAR et coll., 1988) et chez *R. leguminosarum* (GLENN et coll., 1984a) en utilisant des mutants fructokinase négative et phosphoglucose isomérase négative, incapables d'utiliser le fructose. La capacité des mutants fructokinase⁻ à croître sur glucose ou mannose indique la spécificité de la fructokinase pour son substrat. D'autre part, GLENN et coll. (1984b) ont montré, chez *R. leguminosarum*, que le fructose rejoint le 6-P-G respectivement par l'intermédiaire de la fructokinase, de la glucose-6-phosphate isomérase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Le gluconate-6-phosphate est ensuite métabolisé par les voies ED et PP.

Comme le glucose, le fructose à côté des voies du métabolisme énergétique peut emprunter d'autres voies annexes, notamment chez *R. meliloti*, le fructose favorise la production d'exopolysaccharides (COURTOIS et coll., 1983). Ce critère a été utilisé pour différencier *R. meliloti* des autres espèces de *Rhizobium* à croissance rapide.

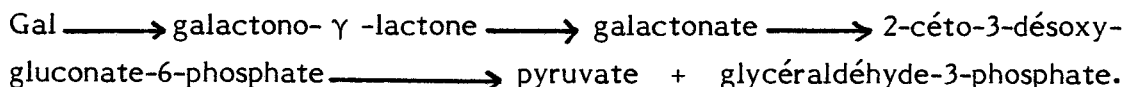
Chez *Rhizobium meliloti*, le mannose donne, en présence d'une mannokinase, le mannose 6-P qui, par isomérisation, donne le F-6-P (ARIAS et coll., 1982). Ce dernier est utilisé par la voie ED.

Pour le galactose, deux voies d'utilisation sont connues chez les bactéries :

- la voie Leloir présente chez les Entérobactéries (MAXWELL et coll., 1962) :



- et la voie De Ley-Doudoroff (DE LEY et DOUDOROFF, 1957) présente chez les espèces de *Pseudomonas* :



La présence d'activité galactose déshydrogénase chez *R. meliloti* (CERVENANSKY et ARIAS, 1984) et *R. trifolii* (RONSON et PRIMROSE, 1979), ainsi que la capacité des mutants G-6-P déshydrogénase⁻ et ED⁻ à

croître sur galactose suggèrent que la voie Leloir n'est pas fonctionnelle chez *Rhizobium*.

D'autre part, ARIAS et CERVENANSKY (1986) ont montré chez *R. meliloti* la présence des enzymes de la voie de De Ley-Doudoroff et l'incapacité des mutants 2-céto-3-désoxy-galactonate-6-phosphate aldolase⁻ à croître sur galactose.

3.2.3. Dégradation des polyols

Chez *R. meliloti*, le mannitol et l'arabitol utilisent une même déshydrogénase (MARTINEZ-DRETS et ARIAS, 1970) tandis que le sorbitol est métabolisé en fructose par une déshydrogénase spécifique.

Le glycérol est transformé en glycérate-3-phosphate par l'intermédiaire de la glycérol-kinase et de la glycérol-phosphate-déshydrogénase. Le glycérate-3-phosphate est ensuite métabolisé en pyruvate (ARIAS et MARTINEZ-DRETS, 1976).

3.2.4. Dégradation des pentoses

Chez les *Rhizobia* à croissance lente, l'arabinose est d'abord déshydrogéné en L-arabinolactone, qui est hydrolysé en arabonate. Celui-ci est déshydraté en 2-céto-3-désoxy-arabonate, qui se scinde en pyruvate et acétaldéhyde par l'intermédiaire d'une aldolase (PEDRODZ et ZANCAN, 1974). Par contre, les *Rhizobia* à croissance rapide, chez qui l'aldolase est absente, utilisent préférentiellement la 2-céto-3-désoxy-arabonate déshydratase (MARTINEZ-DRETS, 1972 ; DUNCAN et FRAENKEL, 1979).

Les voies d'utilisation du xylose et du ribose sont mal connues chez *Rhizobium*. Ainsi, le mutant ribokinase⁻ de *R. leguminosarum* (DILWORTH et coll., 1986) est incapable de croître sur ribose, mais continue à consommer ce pentose à la même vitesse que la souche sauvage.

Chez *R. meliloti*, le mutant G-6-P isomérase⁻, bloqué au niveau du F-6-P, est incapable d'utiliser le xylose ou le ribose. Le métabolisme de ces deux substrats a lieu via le F-6-P (ARIAS et coll., 1979).

3.2.5. Métabolisme des acides organiques

Le succinate, le fumarate et le malate sont métabolisés suivant le cycle des acides tricarboxyliques (KEELE et coll., 1970 ; MULONGOY et ELKAN, 1977a ; STOWERS et ELKAN, 1984).

Le mutant succinate déshydrogénase⁻ de *R. meliloti* (GARDIOL et coll., 1982) est incapable d'utiliser le succinate, le glutamate, l'acétate, le pyruvate ou l'arabinose comme source de carbone. Ces substrats rejoignent le cycle des ATC.

Le gluconate est utilisé chez *B. japonicum* (KEELE et coll., 1970) et *R. cowpea* (STOWERS et ELKAN, 1984) principalement par la voie ED et à un degré moindre par la voie céto-gluconate (KG) suivant laquelle le 2-céto-gluconate, issu de la déshydrogénation du gluconate, est soit phosphorylé en 2-céto-6-phosphogluconate puis réduit en 6-phosphogluconate, soit soumis à la voie non phosphorylée qui conduit à l' α -céto-glutarate.

IV. - TRANSPORT ET METABOLISME DES SUBSTRATS CARBONES CHEZ LES BACTEROÏDES

4.1. Transport

Les cellules libres de *Rhizobium* sont capables d'oxyder une variété de substrats carbonés : glucose, fructose, mannitol, succinate, etc...

Cependant, les bactéroïdes des espèces de *Rhizobium* à croissance rapide ou lente ne sont capables d'oxyder que les acides dicarboxyliques.

L'accumulation des hexoses chez les bactéroïdes est très faible ou absente (Tab. 5). La plupart de ces accumulations ont été réalisées en anaérobiose, mais celle du glucose, chez *R. leguminosarum* (DE VRIES et coll., 1982), a été effectuée dans des conditions aérobies, anaérobies ou microaérobies. Cette étude a montré que, quelle que soit l'aération du milieu, le transport du glucose reste très faible.

Bactéroïdes	Substrats transportés	Nature de l'accumulation	Références
R. leguminosarum			
WU 235	glucose	passive	Hudmann et Glenn, 1980
RBL ₁	glucose	passive	De Vries et coll., 1982
MNF 3841	fructose	passive	Glenn et coll., 1984
RPL 1003	glucose fructose	passive passive	Hooymans et Logman, 1984
R. cowpea			
NCR 234	fructose	passive	Saroso et coll., 1984
B. japonicum			
USDA 110, USDA 138, 8-D et 8-T	glucose	passive	Reibach et Streeter, 1984

Tableau 5. Le transport des hexoses chez les bactéroïdes isolés des nodules.

Les différentes études sur les systèmes de transport des acides dicarboxyliques en C_4 et leur régulation chez les bactéroïdes sont représentées dans le tableau 6.

4.2. Métabolisme

Les études entreprises sur le métabolisme des substrats carbonés chez les bactéroïdes ont permis de montrer que, généralement, les glucides ne sont pas métabolisés par les bactéroïdes de *Rhizobium* (TUZIMURA et MEGURO, 1960 ; REIBACH et STREETER, 1983 ; KARR et coll., 1984).

On note l'absence des voies d'Entner-Doudoroff, de Dickens-Horecker et d'Embden-Meyerhof. Cependant, chez les bactéroïdes de *Bradyrhizobium japonicum*, on observe une activité thréalase qui fournit le glucose, lequel est métabolisé par la voie des pentoses phosphate (SALMINEN et STREETER, 1986 ; SALMINEN et STREETER, 1987).

KARR et coll. (1984) ont montré que les activités enzymatiques observées dans la dégradation des hexoses des bactéroïdes sont très faibles comparativement aux activités des enzymes du cycle de Krebs.

Tous les mutants déficients au niveau du métabolisme des sucres (ARIAS et coll., 1979 ; GARDIOL et coll., 1980 ; DUNCAN, 1981 ; ARIAS et coll., 1982 ; CERVENANSKY et ARIAS, 1984 ; GLENN et coll., 1984a ; EL GUEZZAR et coll., 1988) continuent à noduler et à fixer l'azote atmosphérique normalement. Ceci implique que les sucres ne doivent pas jouer un rôle primordial dans l'établissement d'une symbiose efficace.

Par contre, les mutants déficients au niveau du transport ou du métabolisme des acides dicarboxyliques (DUNCAN et FRAENKEL, 1979 ; GARDIOL et coll., 1982 ; HORNEZ et coll., 1989) sont inefficients et donnent des nodules blanchâtres dépourvus de la lég'hémoglobine.

Les acides dicarboxyliques en C_4 peuvent donc jouer à la fois le rôle de substrats énergétiques pour la fixation d'azote et aussi être les précurseurs de la biosynthèse de l'hème (AVISSAR et NADLER, 1978 ; RONSON et coll.,

Bactéroïdes	Substrat transporté	Paramètres cinétiques		Inhibition du transport par			Nature de l'accumulation	Nature du système	Références	
		Km(a)	Vmax(b)	Découplants énergétiques	NEM	Cyanure				Arséniate
<i>R. leguminosarum</i>										
WU 235	succinate	ND	ND	++	ND	ND	-	active	constitutif	Glenn et coll., 1980 De Vries et coll., 1982 Glenn et coll., 1984b Finan et coll., 1983 Finan et coll., 1983
RBL 1	succinate	ND	ND	++	ND	ND	-	"	"	
MNF 3841	succinate	ND	ND	++	ND	ND	-	"	"	
GF 160	succinate	1,5	23,00	+	ND	ND	-	"	inductible	
GF 252	succinate	2,5	9,20	ND	ND	ND	ND	"	"	
<i>R. japonicum</i>										
USDA I-110	succinate	10,1	3,00	+	++	++	-	"	constitutif	San Francisco et Jacobson, 1985 Reibach et Streeter, 1984
USDA I-110	malate	20,4	2,00	+	++	++	+	"	"	
USDA 111, USDA 138, 8-D et 8-T	succinate malate	40,0 40,0	2,72(c) 1,05(c)	+	ND	ND	ND	"	ND ND	
<i>R. cowpea</i>										
USDA 3278	succinate malate	10,4 15,1	0,70 0,27	++ +	++ ++	++ ++	- -	" "	inductible "	San Francisco et Jacobson, 1985

Tableau 6. Le transport des acides dicarboxyliques en C₄ et sa régulation chez des bactéroïdes isolés des nodules (d'après THEODOROPOULOS, 1986).

Abréviations utilisées :

ND : non déterminé ; ++ : inhibition supérieure à 80 % ;
= : inhibition entre 55 et 80 % ; + : inhibition entre 45 et 55 % ;
- : pas d'inhibition ; (a) valeurs exprimées en μMolaire ; (b) :
valeurs exprimées en nmoles.mn x mg de protéines ; (c) : valeurs
exprimées en nmoles.mn x mg de bactéroïdes.

1981 ; FINAN et coll., 1983), molécule responsable de la coloration rosâtre des nodules.

V. - REGULATION

Pour être assimilé, le substrat doit se trouver au contact d'enzymes capables de le transformer, de l'oxyder au cours d'une ou plusieurs étapes. Le transport est donc la première étape de l'utilisation d'un substrat. Il est, en général, assuré par des protéines enzymatiques qui, comme les autres enzymes, sont régulés génétiquement au niveau de leur synthèse.

Deux aspects de régulation sont ici abordés : l'un est commun à l'ensemble des systèmes enzymatiques (effets glucose), l'autre est spécifique de la régulation des perméases autres que les PTS.

5.1. Les "effets glucose"

Les "effets glucose", que l'on peut observer en comparant une culture d'*E. coli* croissant soit sur glucose, soit aux dépens d'autres substrats carbonés, peuvent être classés en trois catégories fonctionnellement liées :

- la répression transitoire : processus de régulation qui correspond au fait que l'expression d'opérons responsables du catabolisme d'autres substrats carbonés est immédiatement et transitoirement arrêtée au moment de l'addition du glucose ;
- la répression catabolique permanente : phénomène selon lequel le glucose réprime plus ou moins sévèrement l'expression des enzymes cataboliques. Dans certains cas, d'autres substrats, rapidement métabolisables, ont le même effet ;
- l'exclusion des "inducteurs" : la présence du glucose empêche l'entrée dans la cellule des autres substrats carbonés (eux-mêmes, en général, aussi inducteurs).

Ces trois phénomènes sont liés dans le phénomène de diauxie : la croissance d'*E. coli* dans un milieu contenant du glucose à concentration limitante et un autre substrat comme le lactose à concentration élevée, se traduit par une première phase de croissance aux dépens du seul glucose. Cette première phase, qui s'arrête brusquement, est suivie d'un temps de latence, souvent supérieur à un temps de génération, qui précède la reprise de la croissance aux dépens du lactose.

5.1.1. La répression catabolique et rôle de l'AMPc

Le phénomène de la répression catabolique a été largement étudié. Dès 1942, EPPS et GALE démontrent que la présence du glucose dans le milieu de culture d'*E. coli* exerce un effet sur l'expression des enzymes cataboliques.

Un peu plus tard, MONOD (1943) décrit les phénomènes de croissances diauxiques avec des mélanges de glucose et de xylose et démontre que le glucose inhibe la formation d'enzymes essentiels à la dégradation d'autres hydrates de carbone.

D'autres travaux, notamment ceux de MAKEMAN et SUTHERLAND (1965) et ceux d'ULLMANN et MONOD (1968) ont permis d'observer que :

- des substrats rapidement métabolisables provoquent la diminution de l'AMPc intracellulaire, ce qui entraîne une inhibition de l'expression de certains gènes inductibles ou constitutifs ;
- l'addition d'une concentration élevée d'AMPc à une culture soumise à diauxie fait disparaître le phénomène.

Ces observations sont à l'origine de nombreuses interprétations du rôle de l'AMPc dans ces phénomènes de régulation et plus particulièrement dans le contrôle de l'expression des opérons responsables du catabolisme ("opérons cataboliques"). Il a fallu pour cela rechercher les gènes impliqués dans la synthèse de l'AMPc et dans son utilisation. Deux gènes furent mis en évidence : le gène cya déterminant la synthèse de l'AMPc (PERLMAN et PASTAN, 1969) et le gène crp cible de son action (SCHWARTZ et BECKWITH, 1970). Au cours de ces études, ainsi que d'études biochimiques

destinées à l'identification du récepteur potentiel de l'AMPc, un modèle se fit jour : l'AMPc, via son récepteur, la protéine CAP (Catabolite Activator Protein), contrôle de façon positive l'expression des opérons cataboliques. En effet, dans des souches *cya*⁻, qui ne produisent pas d'AMPc, de même que dans des souches *crp*⁻, dépourvues de récepteur, la plupart des opérons cataboliques (opéron lactose, régulon maltose, tryptophanase, ...) ne s'expriment pas et il suffit d'ajouter l'AMPc (dans le premier cas, tout au moins) pour restaurer cette expression.

Un schéma fonctionnel fut ainsi élaboré (Fig. 3) : le complexe CAP-AMPc serait un activateur de la transcription des opérons cataboliques, nécessaires au bon démarrage de l'ARN polymérase.

Il convient cependant de remarquer que ce modèle repose pour l'essentiel sur l'étude d'un seul cas, celui de l'opéron lactose et que les autres exemples (opéron arabinose ou opéron galactose) sont d'une beaucoup plus grande complexité.

Il faut aussi remarquer que le complexe CAP-AMPc n'est pas le régulateur exclusif de la répression catabolique, en effet :

- chez *P. aeruginosa* (SIEGEL et coll., 1977 ; PHILLIPS et MULFINGER, 1981) la répression catabolique existe mais l'AMPc ne semble pas intervenir ;
- chez *Bacillus megaterium*, l'AMPc et les enzymes responsables de son métabolisme : adényl cyclase et phosphodiesterase sont absents. Néanmoins, cet organisme subit une répression catabolique qui est d'ailleurs levée par l'addition de l'AMPc ;
- lors de cultures sur milieu minimum glucosé, ULLMANN et coll. (1976) ont montré qu'*E. coli* produisait un facteur qu'ils ont appelé CMF (Catabolite Modulator Factor). Ce facteur, responsable de la répression des opérons galactose, lactose et de la tryptophanase, n'a été caractérisé que partiellement. Il est de petit poids moléculaire, stable aux acides, aux bases et au chauffage.

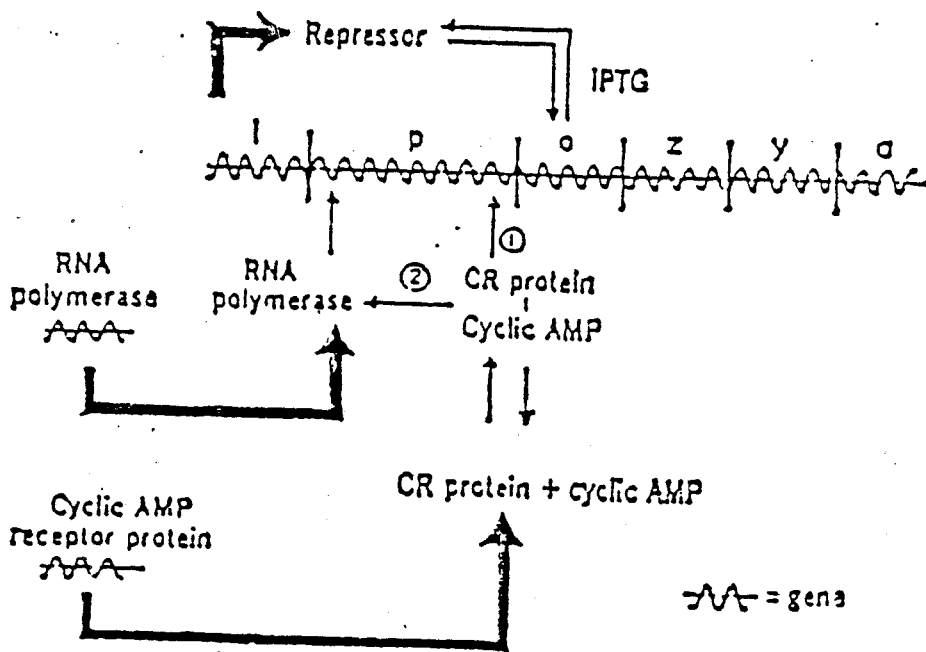


Figure 3. Mode d'action de l'AMPc sur l'opéron lactose (d'après PASTAN et PERLMAN, 1970).

L'AMPc n'est donc pas le seul modulateur et le taux intracellulaire de ce nucléotide est plutôt la conséquence et non la cause de la répression catabolique (ULLMANN, 1985).

L'hypothèse la plus récente, proposée par ULLMANN (1985), suggère que l'expression des gènes est régulée soit négativement par des catabolites, soit positivement par le complexe AMPc-CAP (Fig. 4).

La répression catabolique ne peut pas être uniquement attribuée au taux d'AMPc intracellulaire et la répression, régulée par le système CAP-AMPc, doit constituer une forme possible de répression catabolique parmi d'autres.

5.1.2. Relation entre répression catabolique et exclusion d'inducteur

La répression des gènes cataboliques peut aussi être due à la non pénétration de l'inducteur dans la cellule bactérienne. Ceci est certainement vrai pour les enzymes inductibles, mais ne l'est pas pour les systèmes constitutifs.

La comparaison des systèmes constitutifs et inductibles a permis de dissocier la contribution de chacun de ces deux phénomènes (répression catabolique ou exclusion d'inducteur) au niveau de l'inhibition des activités enzymatiques par le glucose (HEFFERMAN et coll., 1976 ; TAYLOR et YUDKIN, 1978 ; JOSEPH et coll., 1981).

Le tableau 7 (ULLMANN, 1985) résume ces travaux et montre la comparaison de cinq systèmes cataboliques.

Dans le cas de la β -galactosidase et de la tryptophanase, l'effet du glucose est identique que la souche étudiée, soit constitutive ou inductive. On conclut donc, dans ce cas, que le seul "effet glucose" est la répression catabolique.

Par contre, en ce qui concerne l'activité de l'amylomaltase et de l'UDP-Gal-épimérase, on constate que les pourcentages des activités enzymatiques sont très différents selon les souches. En effet, l'action du glucose chez la souche inductible est très importante comparativement à la souche constitutive. Dans ce cas, l'exclusion d'inducteur apparaît être le majeur ou le seul effet inhibiteur de ces enzymes.

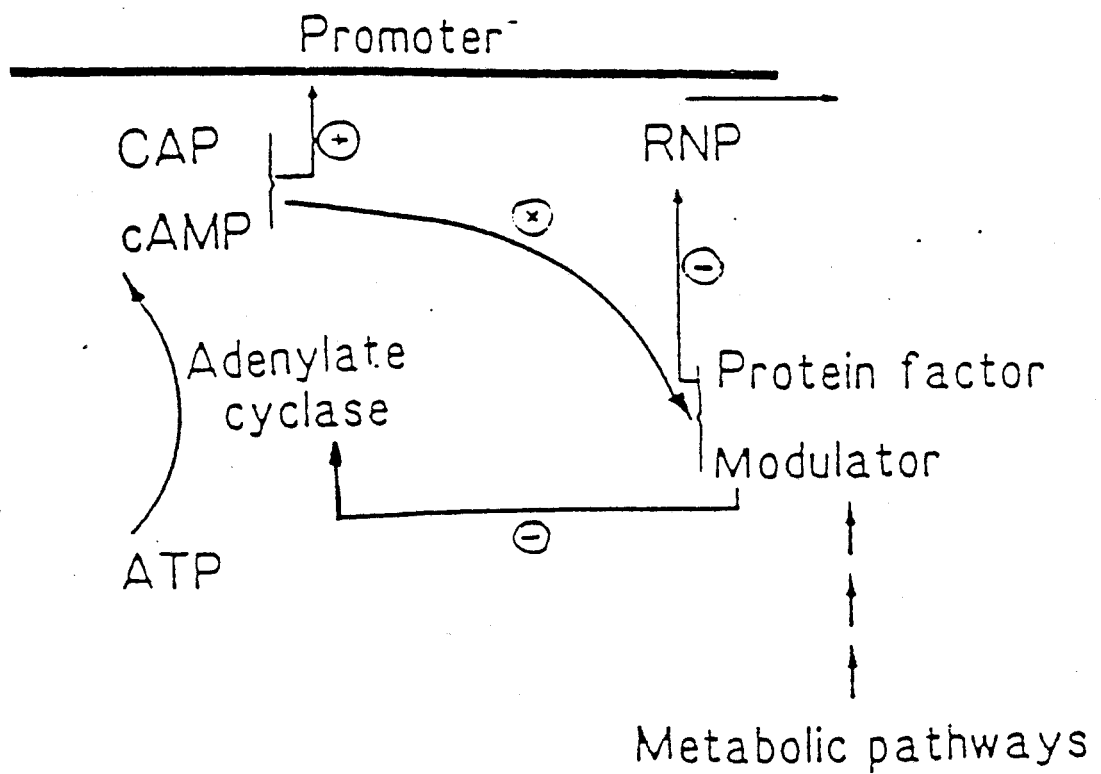


Figure 4. Modèle schématique de la relation entre le contrôle positif de l'expression des gènes et la régulation négative de la répression catabolique (d'après ULLMANN, 1985).

		Souche sauvage (inductible)	Souche constitutive	Nature de l'inhibition
β -galactosidase	(lac)	40	40	répression catabolique
Amylomaltase	(mal)	4	60	exclusion d'inducteur
UDP-Gal-épipimérase	(gal)	35	100	exclusion d'inducteur
Tryptophanase	(tna)	3,7	3,2	répression catabolique
L-arabinose-épipimérase	(ara)	25	60	répression catabolique et exclusion d'inducteur

Tableau 7. Comparaison de quelques activités enzymatiques chez des souches sauvages et constitutives d'*E. coli*.

Les résultats sont exprimés en % de l'activité enzymatique chez des cellules cultivées sur glucose par rapport à l'activité mesurée chez les cellules cultivées sur glycérol (d'après ULLMANN, 1985, modifié).

En ce qui concerne enfin la L-arabinose épimérase, les deux effets doivent être impliqués dans la régulation de l'expression de l'opéron arabinose.

5.2. Régulation de la synthèse de l'AMPc : intégration par le système des phosphotransférases

Dans le cadre du contrôle de l'activité de la cyclase, existe une relation phénoménologique entre le système de transport de sucres apparentés au glucose, dépendant d'une transphosphorylation dont la source est le phosphoénol-pyruvate (système de phosphotransférases ou PTS) et l'activité de l'adénylate cyclase. Un modèle illustratif, permettant aujourd'hui d'expliquer le mode de contrôle de l'activité cyclase par le PTS ainsi que d'élucider en grande partie les "effets glucose", a été proposé par ULLMANN et DANCHIN (1983) (Fig. 5).

Le glucose et d'autres hydrates de carbone comme le mannitol, le sorbitol, le mannose ou le fructose sont transportés au sein de la cellule sous la forme de composés phosphorylés aux dépens du phosphoénol-pyruvate (PEP). Cette phosphorylation résulte d'une cascade de réactions.

Les deux premières étapes sont indépendantes de la nature chimique du sucre transporté.

Dans le cas du transport du glucose, il existe une perméase spécifique (Enzyme II^{Glc}) qui ne permet la phosphorylation du glucose qu'à la suite d'une étape supplémentaire requérant une nouvelle étape de phosphorylation.

Un enzyme III^{Glc} est phosphorylé par la forme Hpr-phosphate et c'est cet enzyme III^{Glc}-phosphate qui seul phosphoryle le glucose (cf. Fig. 5). Le rôle de cet enzyme est fondamental. En effet, il apparaît que la forme phosphorylée de l'enzyme III^{Glc} est nécessaire pour assumer la pleine activité de l'adénylate cyclase. Par ailleurs, il a été montré que la forme non phosphorylée inhibait les perméases des sources de carbone ne dépendant pas du PTS.

Donc, lorsque les bactéries croissent en présence de glucose, l'entrée du sucre conduit immédiatement à une diminution de la concentration intracellulaire de

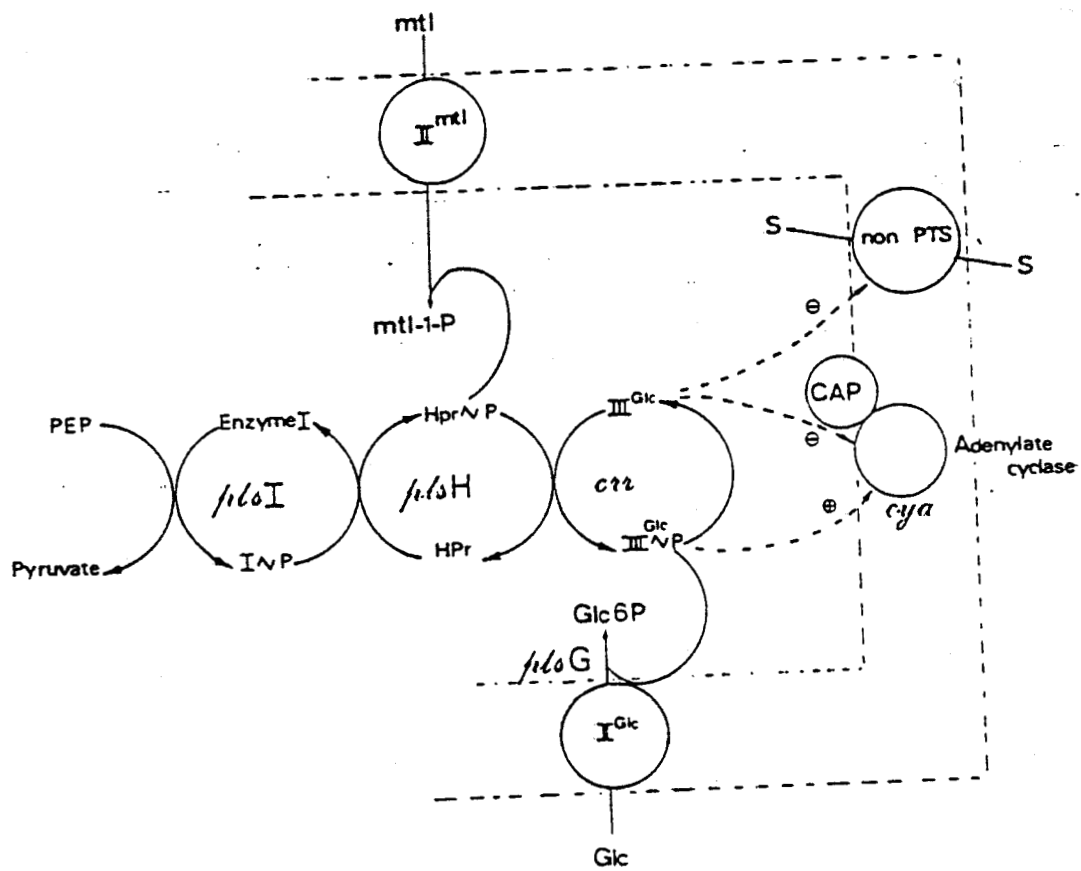


Figure 5. Régulation des systèmes non-PTS par le système PTS (d'après ULLMANN et DANCHIN, 1983 modifié).

la forme phosphorylée de l'enzyme III^{Glc}, ce qui diminue la synthèse d'AMPc et diminue donc l'expression des opérons cataboliques ; par ailleurs, la concentration de la forme non phosphorylée croît ce qui inhibe les autres perméases et explique ainsi directement l'exclusion des substrats autre que le glucose.

Dans notre travail, nous avons effectué une mutagénèse biologique en utilisant un transposon. Nous avons donc consacré le chapitre suivant aux éléments génétiques transposables.

VI. - LES ELEMENTS GENETIQUES TRANSPOSABLES

Ces éléments n'obéissent pas aux règles habituelles de la recombinaison génétique et réunissent des fragments d'ADN non apparentés. Ils transfèrent ainsi des groupes de gènes d'un ADN à l'autre entre plasmides, virus et cellules.

6.1. Découverte

La découverte des éléments transposables chez les bactéries a été réalisée pour la première fois à la fin des années soixante par SHAPIRO (1969) qui a mis en évidence un nouveau type de mutation affectant les gènes d'une souche d'*E. coli*. Ces mutations étaient inhabituelles en ce que leurs effets se répercutaient au delà des limites d'expression des gènes mutés eux-mêmes et cette propriété ne pouvait être expliquée par aucun mécanisme de mutation connu.

Les expériences ont été réalisées avec des particules de phage lambda portant le gène bactérien codant pour l'utilisation du galactose (gal^+) et des particules lambda portant le gène muté (gal^-).

Les virus ont été centrifugés dans une solution de chlorure de césium. Les particules gal^- se sont révélées plus denses que les autres. A l'issue de ces expériences, il apparut que l'ADN muté était plus long que l'ADN normal : la mutation gal^- était due à l'insertion de fragments d'ADN. Il se révéla par la

suite qu'un nombre limité d'autres fragments d'ADN reconnaissables ayant jusqu'à 2 000 nucléotides de long pouvait également s'intégrer dans de nombreux gènes différents interrompant ainsi leur continuité et inhibant leur activité. On donna à ces éléments le nom de séquences d'insertion ou IS.

D'autres résultats semblables, où des gènes de résistance aux antibiotiques étaient transférés d'une molécule d'ADN à une autre à l'intérieur d'une même cellule, ont été mentionnés et la première preuve directe de ce type de transfert a été publié par HEDGE et JACOB (1974) qui ont trouvé qu'après transfert, d'un plasmide à un autre, du gène conférant la résistance à l'ampicilline et à la pénicilline, on observait un accroissement de taille du plasmide receveur.

Ces auteurs ont donné le nom de transposon à ce type de fragment d'ADN portant le gène de résistance à l'ampicilline et qui pouvait être "transposé" ou se déplacer d'une molécule d'ADN à une autre.

6.2. Les différents groupes

Habituellement, les éléments transposables sont classés en quatre groupes, selon leur taille et selon les gènes qu'ils portent.

6.2.1. Les séquences d'insertion "IS"

Les transposons les plus simples sont appelés séquences d'insertion. Ce sont des éléments simples de taille inférieure à 2 000 paires de bases. Ils sont des constituants normaux des chromosomes bactériens et des plasmides. Par exemple, une souche standard d'*E. coli* possède 8 copies de IS1 et 5 copies de IS2.

Ces éléments sont des unités autonomes, codant seulement pour les protéines nécessaires à leur propre transposition.

Bien que tous les éléments IS diffèrent dans leurs séquences, ils partagent une même forme commune d'organisation.

Les caractéristiques de quelques éléments IS courant sont résumées dans le tableau 8.

La plupart des transposons s'insèrent au hasard dans des sites, au sein de l'ADN hôte. Certains montrent des préférences pour des points chauds ("hot spots").

6.2.2. Les transposons : Tn

Ils sont beaucoup plus complexes que les séquences d'insertion. Leur taille est supérieure à 2 000 paires de bases et ils sont constitués d'une région centrale qui porte, en plus des gènes nécessaires à la transposition, de(s) marqueur(s) de résistance aux drogues. Cette région centrale est bordée, de chaque côté, de bras. Ceux-ci sont constitués par des éléments IS qui peuvent être soit dans la même orientation, soit (plus fréquemment) dans l'orientation opposée et puisque chaque IS a la structure habituelle qui se termine par des répétitions inversées, les transposons se terminent également par les mêmes courtes répétitions inversées.

Signalons également que certains transposons portent d'autres gènes autres que ceux de la résistance aux antibiotiques, exemple du Tn951 qui porte l'opéron lactose (CORNELIS et coll., 1978 ; CORNELIS et coll., 1981) et le transposon Tn501 qui code pour la résistance aux ions mercuriques (STANISICH et coll., 1977).

Les propriétés de quelques transposons sont résumées dans le tableau 9.

6.2.3. Episomes

Ce sont des éléments transposables géants contenant souvent des séquences d'insertion (IS) et des transposons (Tn). Leur réplication est autonome et peut donner plusieurs copies de la molécule par cellule. Le facteur F d'*E. coli* porte une séquence d'insertion IS3 qui permet son intégration en divers endroits du chromosome (PTASHNE et COHEN, 1975).

Élément	Longueur	Répétitions terminales inversées	Répétitions directes au site cible	Protéines nécessaires à la transposition
IS1	768 pb	23 pb	9 pb	2
IS2	1 327 pb	41 pb	5 pb	1
IS4	1 428 pb	18 pb	11 ou 12 pb	1
IS5	1 195 pb	16 pb	4 pb	1
IS10R	1 329 pb	22 pb	9 pb	1
IS50R	1 531 pb	9 pb	9 pb	1
IS903	1 057 pb	18 pb	9 pb	1

Tableau 8. Caractères de quelques séquences d'insertion.

Transposons	Résistance aux antibiotiques	Origine plasmidique	Taille approximative (en paires de bases)	Extrémités en répétition (en paires de bases)	Spécificité du site d'insertion	Génération de délétions	Duplication au niveau du site d'insertion (en paires de bases)
Tn1	Ap	RP4	4 800	140, inversées	incertaine	oui	ID
Tn2	Ap	RSF1030	4 800	140, inversées	faible	ID	ID
Tn3	Ap	R1	4 957	140, inversées	faible	ID	5
Tn4	Ap, Su, Km	R1	20 500	140, inversées	faible	ID	ID
Tn5	Km	JR67	5 700	1532, inversées homologues à IS50	faible	oui	9
Tn6	Km	JR72	4 100	ID	ID	ID	ID
Tn7	Sm, Tp	R483	ID	ID	élevée	ID	ID
Tn9	Cm	pSM14	2 638	800, non-inversées homologues à IS1	incertaine	oui	9
Tn10	Tc	R222	9 300	1400, inversées homologues à IS3	moyenne	oui	9

Tableau 9. Caractères des neuf premiers transposons.

Symboles :

Ap = ampicilline ; Su = sulfonamide ; Km = kanamycine ; Tp = triméthoprime ; Cm = chloramphénicol ; Tc = tetracycline ; Sm = streptomycine ; ID = indéterminé.

6.2.4. Bactériophages

Certains bactériophages peuvent intégrer leur ADN dans le chromosome bactérien, donnant ainsi un "prophage" latent qui coexiste avec la bactérie et se transmet à sa descendance lorsqu'elle se divise ; exemple du bactériophage Mu. Cependant, contrairement aux autres phages tempérés, celui-là peut s'insérer en de nombreux points du chromosome créant ainsi un grand nombre de mutations différentes chez l'hôte bactérien.

Quand le phage Mu quitte son site d'insertion, il emporte un nombre important de nucléotides de l'hôte, engendrant ainsi des délétions irréparables.

Si ce phage infecte une nouvelle cellule, il perd l'ancien ADN bactérien et il est transposé sur un site du chromosome du nouvel hôte (TAYLOR, 1963).

De même, l'ADN du bactériophage λ peut être considéré comme élément transposable lors du phénomène de lysogénisation uniquement parce que son intégration est indépendante du fonctionnement du gène recA. Cependant, son mécanisme d'intégration dans le chromosome d'*E. coli* est différent de celui des éléments transposables (NASH et coll., 1967).

Dans notre travail, nous avons utilisé le transposon Tn5. L'intérêt de cette utilisation réside dans son insertion en de multiples points provoquant des mutations polaires. Nous avons donc jugé nécessaire d'exposer dans le paragraphe suivant sa structure et ses propriétés.

6.3. Structure et propriétés du transposon Tn5

Le transposon Tn5, composé d'une région centrale de 2,7 Kb flanquée par deux modules IS50 de 1,5 Kb, notés respectivement IS50L (Left) et IS50R (Right) (BERG et coll., 1980 ; BERG et coll., 1982 ; MAZODIER et coll., 1985), confère la résistance à la kanamycine (GUIDO et coll., 1984) (Fig. 6).

Les deux séquences d'insertion IS50 n'ont pas la même fonction. L'une des extrémités est nécessaire à la transposition et code pour deux protéines dont l'une est la transposase et l'autre un inhibiteur de la transposition

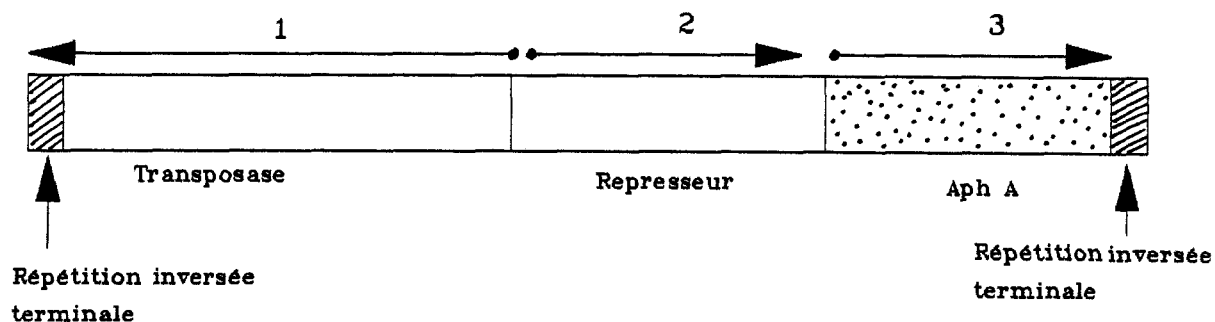


Fig. 6 : STRUCTURE DU Tn5

La région 1: code pour un enzyme nécessaire à la
transposition : transposase

La région 2: code pour une protéine répresseur qui controle
la transcription des gènes de la transposition des gènes de
la transposase et du répresseur lui-même .

La région 3: code pour un enzyme l'aminoglycoside 3 phospho-
transférase I (Aph A) qui confère la résistance
à la kanamycine .

Les flèches indiquent le sens dans lequel est transcrit l'ADN
des différentes régions

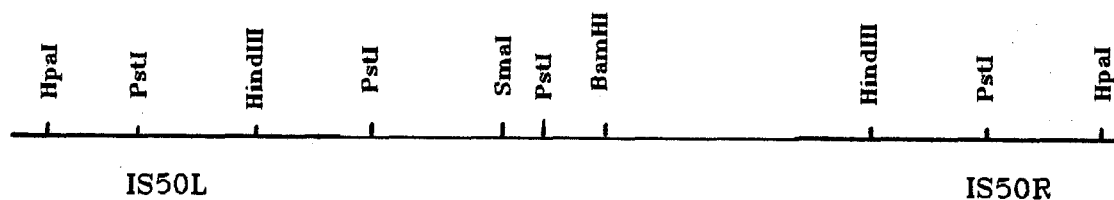


Fig. 7 : CARTE DE RESTRICTION DU Tn5

Le moyen utilisé pour introduire les transposons chez *R. meliloti* est l'utilisation de plasmides "suicides" : plasmides ayant une spécificité d'hôte étroite (incapables de se répliquer chez la bactérie réceptrice).

L'utilisation de ces plasmides suicides constitue donc un moyen intéressant de mutagenèse par insertion de transposons.

6.4. Intérêt de mutagenèse par transposition

Contrairement à la mutagenèse chimique ou physique, la mutation par transposition constitue un moyen de mutagenèse biologique qui ne présente pas beaucoup de danger.

En effet, dans la mutagenèse "classique" on utilise des agents chimiques (N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, éthyl méthyl sulfonate, etc...), physiques (rayons X, UV, etc...) qui sont dangereux pour la santé des manipulateurs et dont la plupart sont cancérogènes par contamination de la peau ou par respiration de ces produits lors de la manipulation.

En outre, l'utilisation des transposons en Génie Génétique se traduit par d'importantes propriétés (BERG et coll., 1980 ; CASADESUS et coll., 1980 ; BERG et coll., 1984).

- 1 - Les transposons peuvent se trouver insérés en de nombreux points du chromosome bactérien et conférant ainsi la résistance aux antibiotiques.
- 2 - Les gènes bactériens affectés perdent complètement leur fonction.
- 3 - La réversion est aisée par excision précise avec perte de la résistance contrairement à la mutagenèse par NTG où les mutants sont généralement stables avec un certain endommagement de la cellule.
- 4 - L'insertion se comporte comme une mutation ponctuelle utile pour l'établissement d'une carte génétique.
- 5 - Les mutations peuvent être trouvées à haute fréquence.

- 6 - L'insertion peut être obtenue de façon spécifique.
- 7 - Leurs insertions dans des opérons sont fortement polaires.
- 8 - L'insertion des transposons peut provoquer une délétion adjacente.

6.5. Utilisation du Tn5 pour l'obtention de mutants chez Rhizobium

Plusieurs équipes ont effectué des travaux dans ce domaine afin d'élucider le phénomène de la symbiose.

Chez *R. leguminosarum* (GLENN et coll., 1984b) et *R. meliloti* (DUNCAN, 1981), des mutants fructokinase⁻, mannitol-déshydrogénase⁻, ribokinase⁻ et xylose-isomérase⁻ étaient capables de noduler et de fixer l'azote atmosphérique. Ceci suggère que chez ces souches, la capacité d'utiliser les sucres n'est pas essentielle dans la symbiose.

Le Tn5 est aussi utilisé pour l'obtention de mutants symbiotiques et auxotrophes (MEADE et coll., 1982 ; FORRAI et coll., 1983 ; HIRSCH et coll., 1983 ; ZIMMERMAN et coll., 1983 ; ALI et coll., 1984 ; NOEL et coll., 1984 ; SCHERMAN et coll., 1984 ; SELVARAJ et coll., 1987).

Les mutants auxotrophes inefficients constituent une approche indirecte de la localisation des gènes *nif* sur le matériel génétique. Certains auteurs ont remarqué, chez différentes espèces de *Rhizobium* (*meliloti*, *trifolii*, *leguminosarum*), que les exigences en bases nucléiques et en leucine ou histidine sont étroitement associées à l'efficiencia : le passage à l'état prototrophe de ces mutants provoque le retour de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique. Ce qui n'est pas le cas après addition de l'exigence (SCHWINGHAMER, 1968 ; DENARIE, 1969 ; SCHERRER et DENARIE, 1971 ; DENARIE et coll., 1976).

L'étude de certains mutants symbiotiques a permis de localiser les régions d'insertion du Tn5 et, par combinaison de critères physique et génétique, certains auteurs ont démontré que dans la plupart des cas, il existe une corrélation entre l'auxotrophie et la symbiose (FORRAI et coll., 1983).

Le Tn5 est également utilisé pour isoler des mutants altérés au niveau de la synthèse des exopolysaccharides (Exo⁻) (DJORDJEVIC et coll., 1987) ou au niveau de l'expression des cytochromes oxydase o et aa₃ (SOBERON et coll., 1990).

VII. - LES TRANSFERTS GENETIQUES

Les mécanismes de la recombinaison génétique sont très particuliers chez les bactéries. Il est certainement encore difficile d'évaluer la place qu'occupe dans la nature chacune des trois grandes méthodes connues de recombinaison génétique bactérienne.

7.1. La transformation

Le phénomène a été observé pour la première fois par GRIFFITH, en 1928, chez *Streptococcus pneumoniae*, avant même que l'ADN ait été reconnu comme support de l'information génétique. La transformation correspond à l'intégration d'une molécule d'ADN exogène libre dans une bactérie réceptrice.

Cette molécule pourra, par la suite, se répliquer et s'exprimer, intégrée à l'ADN chromosomique bactérien ou, de façon autonome, sous forme plasmidique.

La transformation dépend d'une part des bactéries et de leur aptitude à être réceptrices et, d'autre part, de l'ADN transformant et de ses propriétés.

7.1.1. Compétence naturelle

Pour être transformée, une cellule bactérienne doit être en état de compétence. Cet état peut se définir comme l'aptitude à absorber des fragments d'ADN libres. Les bactéries deviennent compétentes parfois en fin de phase exponentielle, parfois en début de phase exponentielle et, pour certaines espèces, les conditions de milieu semblent très importantes. La compétence est sous contrôle génétique : des mutations font perdre l'aptitude

à absorber l'ADN ; d'autres mutations font perdre l'aptitude à intégrer l'ADN de façon stable dans le génome bactérien bien que l'ADN bactérien pénètre encore dans la cellule.

La compétence semble en relation avec la présence, à la surface de la bactérie, d'un "facteur de compétence". Ce facteur semble être de nature polypeptidique (MERCENIER et CHASSY, 1988). Il peut être éliminé par digestion à la trypsine mais aussi par simple lavage à l'eau. Son rôle n'est pas très bien connu ; il est probable qu'il sert de récepteur pour les molécules d'ADN et participe dans leur passage à travers la membrane. Les causes et les mécanismes de la compétence demeurent obscurs. Le niveau de compétence maximum observable dans une lignée cellulaire est variable selon l'espèce bactérienne concernée.

7.1.2. Compétence induite artificiellement

Certaines bactéries sont naturellement compétentes et absorbent facilement l'ADN exogène. Par contre, d'autres bactéries, comme *E. coli*, *Rhizobium*, n'expriment pas de compétence naturelle et doivent subir des traitements physico-chimiques pour pouvoir fixer et introduire de l'ADN exocellulaire.

7.1.2.1. Utilisation de cations divalents

Les cellules d'*E. coli* traitées à 4°C avec des solutions de CaCl_2 , puis subissant des chocs thermiques répétés deviennent compétentes à l'introduction de l'ADN. Le mode de fixation de l'ADN sur la bactérie réceptrice est actif ; par contre, le mécanisme d'absorption reste inconnu.

Les ADN super-hélicoïdaux, circulaires et circulaires simple brin sont introduits plus efficacement que l'ADN linéaire.

Actuellement, cette technique est considérée comme la méthode standard d'*E. coli*. Les fréquences obtenues atteignent 10^8 transformant par μg d'ADN.

Des variations de cette technique ont été appliquées avec succès à la transformation d'un grand nombre de bactéries à Gram négatif.

7.1.2.2. Transformation avec du polyéthylène-glycol

La technique utilisant du polyéthylène-glycol a été développée par KLEB (1983) pour induire la transformation d'*E. coli* et de *Saccharomyces cerevisiae*. Les fréquences de transformation obtenues atteignent 2.10^6 transformants par μg d'ADN avec *E. coli* HB101 et pBR322. Une variation de cette méthode a été utilisée avec succès par SMITH (1985) avec bactéroïdes spp. et par CHUNG (1988) qui obtient une fréquence de transformation de 2.10^8 transformants par μg d'ADN.

Les cellules sont transformées en présence d'ADN et de PEG 6000 à 25 % à température ambiante à pH 4,5 et en aérobiose ; les bactéries étant au préalable cultivées en présence de MgCl_2 5 mM jusqu'au milieu de la phase exponentielle de croissance. Les fréquences de transformation dépendent énormément de la bactérie réceptrice utilisée (SMITH, 1985). Elles sont beaucoup plus importantes lorsque la souche qui a servi pour extraire le plasmide est la même que celle qui servira à la transformation.

7.2. La conjugaison

La découverte de la transformation révélait, pour la première fois, l'existence d'un mécanisme de recombinaison chez les bactéries présentant des analogies avec la reproduction sexuelle des Eucaryotes. Quelques années seulement après les expériences d'AVERY, en 1944, sur la transformation, LEDERBERG et TATUM en 1946 décrivent un phénomène de recombinaison par conjugaison.

Au cours des phénomènes de transposition, le transfert des plasmides suicides se fait par conjugaison, les fréquences de transfert varient selon la souche réceptrice.

VIII. - CONCLUSION

Les travaux réalisés sur le métabolisme énergétique chez les cellules libres de *Rhizobium* ont permis de montrer que :

- le métabolisme des hydrates de carbone se fait essentiellement par la voie d'Entner-Doudoroff et la voie de Dickens-Horecker ;
- les acides organiques jouent un rôle déterminant dans la réduction de l'azote par les bactéroïdes ;
- le succinate réprime un certain nombre d'activités telles que la fructose-perméase, la glucose-perméase et la β -galactosidase.
Par contre, le mécanisme de régulation et d'expression des gènes impliqués dans ce cadre est peu étudié.

Chez *E. coli*, les études entreprises dans ce domaine ont montré que :

- l'expression d'un grand nombre d'unités génétiques nécessite la présence d'un complexe fonctionnel entre l'AMPc et son récepteur : la protéine CAP ;
- le glucose est à l'origine d'un mécanisme de répression catabolique AMPc-dépendant ;
- les mutants pléiotropes d'*E. coli* sont altérés soit au niveau de la synthèse de l'AMPc, soit au niveau de la synthèse de la protéine CAP.

Chez *Rhizobium*, le succinate exerce un effet régulateur semblable à la répression catabolique déjà décrit chez *E. coli*. Mais le rôle de l'AMPc dans la levée de la répression est souvent mis en question.

En partant d'un résultat déjà établi au Laboratoire, montrant que le succinate réprime le système de transport du glucose (HORNEZ, 1987), nous allons essayer d'élucider le rôle de l'AMPc dans la régulation du métabolisme énergétique de *R. meliloti* M5N1, en utilisant des mutants métaboliques isolés par insertion du transposon Tn5.

MATERIEL ET METHODES

I. - SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES

Nous avons utilisé la souche sauvage de *Rhizobium meliloti* M5N1 efficace pour la Luzerne (*Medicago sativa*), comme souche réceptrice du transposon Tn5.

La souche d'*E. coli* WA803, qui renferme le plasmide suicide (pGS9), est utilisée comme souche donatrice.

La souche d'*E. coli* HB101 est utilisée pour l'extraction du plasmide pBR322.

La souche d'*E. coli* CH208 est utilisée pour les expériences de complémentation.

L'origine et le phénotype de ces souches sont mentionnés dans le tableau 10.

II. - TAMPONS ET MILIEUX DE CULTURE

2.1. Tampon de non prolifération (TNP)

MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
QSP 1 l d'eau distillée, pH 7,2 à 7,4	

Nous employons ce tampon dépourvu d'azote pour laver la culture de *Rhizobium* avant de l'introduire dans le milieu de culture.

2.2. Milieu minimum de croissance (RHB1)

Tampon R

K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ NO ₃	1,0 g
QSP 1 l d'eau distillée, pH 7,2 à 7,4	

Souches	Origine	Phénotype
R. meliloti M5N1	Université des Sciences et Techniques de Lille Laboratoire de Microbiologie	sauvage
E. coli WA803 (pGS9::Tn5) HB101(pBR322) CH208	V.N. Iyer, Carleton Université, Canada BOLIVAR et coll. (1977) Laboratoire de Chimie bactérienne Université de Marseille	$Met^{-}, Thi^{-}, x^{-}k, m^{-}k$ ($Tra^{+}, Km^{r}/Nm^{r}, Ble^{r}$) Cm^{r} $F^{-}, hsdS20, (hsdM hsdR), ara-14$ $lacY1, galK12, xyl-5, proA2$ $leuB6, thi-1, SupE44, endoI$ $recA13, rpsL20 (Sm^{r})$ $Gal^{-}, AraD139, \Delta(LacU169),$ $zab::Tn5, \lambda p19-1, rpsL$ $\Delta crp, Km^{r}, Sm^{r}$

Tableau 10. Les souches bactériennes utilisées.

Pour le milieu gélosé, on ajoute de l'agar Difco à 15 g/l. Le tampon R est utilisé couramment pour les dilutions. Le milieu minimum de croissance est le tampon R complété en glucose à 1 % (P/V), biotine à 0,01 µg/ml, thiamine à 0,5 µg/ml (concentration finale) : RglcHB1.

2.3. Milieu riche TY (Tryptone-Yeast)

Tryptone	5,0 g
Extrait de levure (Difco)	3,0 g
CaCl ₂ , 6H ₂ O	1,3 g
QSP 1 l d'eau distillée ; pH 7,2 à 7,4	

2.4. Milieu de Luria Burrous (LB)

C'est un milieu riche. Sa composition est la suivante :

Extrait de levure	5,0 g
Tryptone	10,0 g
NaCl	10,0 g
QSP 1 l d'eau distillée	

Le pH est ajusté à 7,2 avec NaOH ou HCl suivant le pH initial. Ce milieu peut être préparé gélosé par adjonction d'agar à 15 g/l.

2.5. Milieu de NICOL et THORNTON (1941)

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
FePO ₄	1,0 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2,0 g
FeCl ₃ , 6H ₂ O	1,0 ml d'une solution mère à 10 g/l
QSP 1 l d'eau distillée ; pH 6,8 à 7,2	

Ce milieu est utilisé pour la culture des graines de Luzerne.

Tous les milieux et tampons utilisés sont stérilisés à 120°C pendant 20 min sauf le milieu de NICOL et THORNTON (1941) dont la stérilisation s'effectue à 105°C pendant 30 min pour éviter la variation du pH.

III. - CONDITIONS DE CULTURE

3.1. Croissance bactérienne

1 l du milieu RHB1, additionné de la source de carbone, est inoculé avec 10 ml d'une préculture de même composition que le milieu d'incubation. Les cultures sont réalisées dans des erlen-meyers et des fioles à toxine de 2 l placés sur une table d'agitation rotative à 30°C.

3.2. Cultures en microbiomètre

Les cultures sont réalisées dans des tubes qui sont placés dans un appareil prototype, le microbiomètre. Celui-ci permet le suivi de croissance par la mesure automatique de la densité optique (DO) dans des conditions précises d'agitation et de température.

IV. - ANTIBIOTIQUES

4.1. Solution d'antibiotiques

Les antibiotiques utilisés sont préparés et additionnés aux concentrations convenables dans les milieux à partir des solutions-mères suivantes : streptomycine-monosulfate (Sm), 20 mg/ml ; kanamycine-monosulfate (Km), 20 mg/ml ; ampicilline-sodium (Ap), 10 mg/ml ; tétracycline-HCl (Tc), 1 mg/ml ; chloramphénicol (Cm), 10 mg/ml d'une solution aqueuse d'éthanol à 50 %.

Ces solutions d'antibiotiques sont conservées à + 4°C.

La stérilisation s'effectue par filtration sur unité de filtration stérile Millipore "Millex" de porosité 0,2 µm.

4.2. Détermination de la résistance aux antibiotiques

Cette méthode consiste à repiquer les clones testés sur des boîtes de Petri renfermant du milieu gélosé auquel on ajoute l'antibiotique convenable à la concentration désirée.

Le repiquage se fait à l'aide d'un fil de platine sur une boîte placée au-dessus d'une grille permettant de les repérer. On peut ainsi tester jusqu'à 40 colonies par boîte.

V. - TRANSPORT DES SUBSTRATS CARBONES

5.1. Préparation des cellules pour les études de transport

Les cellules utilisées pour les essais d'accumulation sont obtenues à partir des cultures en fin de phase exponentielle de croissance.

Le culot cellulaire, obtenu par centrifugation à 8 000 g pendant 20 min, est lavé 2 fois avec du TNP puis repris dans un petit volume de ce même tampon.

La suspension cellulaire obtenue est conservée à 4°C après avoir mesuré son absorbance à 600 nm.

5.2. Accumulation des substrats

Les sucres radiomarqués D[U-¹⁴C]glucose (2,22 µci/µmol), D[U-¹⁴C]fructose (2,22 µci/µmol) et D[U-¹⁴C]galactose (2,0 µci/µmol) sont fournis par le Centre Radiochimique Amersham ; l'acide succinique [U-¹⁴C] (144 µci/µmol) provient du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay.

Les mesures d'incorporation sont réalisées sur 1 ml de la suspension cellulaire à DO1 ($1,2 \cdot 10^9$ cellules/ml) pré-incubée 15 min avant l'addition du substrat à 0,1 mM. Des prélèvements de 100 µl sont effectués à différents temps d'incubation, filtrés immédiatement sur filtres Millipore de 0,45 µm et rincés par 2 ml de TNP + NaCl à 5 % à 0°C.

Les filtres sont séchés sous lampe infra-rouge pendant 30 min, puis déposés dans des pots à scintillation. On ajoute 7,5 ml de liquide scintillant (Lipoluma).

La radioactivité est déterminée sur le compteur à scintillation liquide de type "Beckman" LS-2800.

Les résultats sont exprimés en nmoles de substrats accumulées par mg de protéines totales.

VI. - DETERMINATION DU COEFFICIENT DE TRANSFERT EN OXYGENE : LE KLa

Nous avons appliqué la méthode chimique pour la mesure des KLa en milieu placé en microbiomètre dans des conditions variables d'agitation.

La méthode utilisée est celle qui a été proposée par COOPER (1944) : l'évaluation de la capacité de transfert du dispositif est ramenée à celle de la vitesse d'oxydation d'une solution de sulfite de sodium en sulfate, placée dans le milieu et soumise aux conditions d'agitation dans lesquelles on veut évaluer le KLa.

VII. - DOSAGE DES PROTEINES

Il est effectué par la méthode de LOWRY et coll. (1951), utilisant la sérum albumine bovine comme standard.

VIII. - DETERMINATION DES PROPRIETES SYMBIOTIQUES

8.1. Infectivité

C'est pour le genre *Rhizobium* la capacité d'infecter les racines de certaines Légumineuses et d'y provoquer l'apparition de nodules. Ce caractère noté

Nod⁺ est le seul critère réel pour vérifier l'appartenance d'une souche isolée au genre *Rhizobium*.

8.1.1. Stérilisation des graines de Luzerne et prégermination

Elle s'effectue de la façon suivante : une centaine de graines sont déposées dans une boîte de Petri. On ajoute 20 ml de chlorure mercurique à 2,5 %, puis on met une goutte de détergent (Teepol). On laisse agir pendant 5 min en agitant puis on vide stérilement cette solution. Le désinfectant est ensuite éliminé par plusieurs rinçages à l'eau distillée. Une vingtaine de graines sont déposées stérilement par boîte de Petri contenant le milieu TY. La prégermination dure de 2 à 4 jours à 30°C.

8.1.2. Culture aseptique des Légumineuses

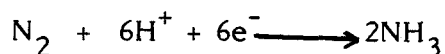
Les graines germées, d'une longueur de 1 à 2 cm, sont placées sur le support à raison de 2 plantules par tube. L'incubation s'effectue à 26°C avec 16 h d'éclairage par jour.

8.1.3. Inoculation de la souche à tester

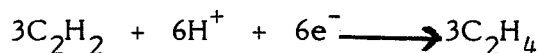
Dès que les racines secondaires sont apparues, les plantules sont inoculées par environ 10⁶ cellules par tube afin de minimiser le risque de réversion. La suspension bactérienne est préalablement centrifugée, lavée avec du TNP et reprise dans le même tampon.

8.2. Efficiéce

Qualité de l'association *Rhizobium*-Légumineuse qui aboutit à la fixation d'azote moléculaire. Ce caractère se note Fix⁺ :



La nitrogénase est l'enzyme qui catalyse la réduction de l'azote en ions ammonium. Elle peut utiliser d'autres substrats analogues à l'azote tel que l'acétylène :



La réduction d'une molécule d'azote est réalisée de la même façon que la formation de 3 molécules d'éthylène à partir d'acétylène. L'activité nitrogénasique est mesurée en utilisant l'acétylène comme substrat.

8.2.1. Conditions expérimentales

Le chromatographe est de type Intersmat I.G.C. 112F.L. Les conditions de dosage sont les suivantes :

Gaz vecteur	N ₂
Température du four	50°C
Température d'injection	70°C
Température de détection	115°C
Détecteur à ionisation de flamme	
Colonne Sphérosil XoBo75 (2 m x 3,1 mm)	

8.2.2. Technique de dosage

Quand les plantules sont bien développées (5 à 6 semaines), elles sont lavées avec de l'eau distillée et mises dans un flacon de 150 ml fermé hermétiquement (8 plantules par flacon). On prélève 17 ml d'air que l'on remplace par 15 ml d'acétylène (10 %, V/V) et 2 ml de propane dilué 100 fois par l'air (témoin interne) de façon à avoir 1,27 µmoles. Le flacon est ensuite agité manuellement. L'incubation se fait à 30°C. La mesure de l'acétylène réduit est effectuée après différents temps d'incubation (0, 3, 6 et 8 h) par injection de 50 ml dans le chromatographe en phase gazeuse.

8.2.3. Calcul de la quantité d'éthylène produite

La formule appliquée pour déterminer la quantité d'éthylène formée dans le flacon est la suivante :

$$Q = C \times K \times \frac{H_1 (\text{C}_2\text{H}_4)}{H_2 (\text{C}_3\text{H}_8)}$$

- où Q = nombre de moles de C_2H_4 produites
 C = nombre de moles de C_3H_8 injectées
 K = coefficient de proportionnalité établi à partir d'un mélange en proportions égales (V/V) de C_3H_8 et de C_2H_4 dans l'air :

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

- où H_1 = hauteur du pic de C_2H_4
 H_2 = hauteur du pic de C_3H_8

$$\Delta Q = Q_6 - Q_0$$

- où Q_6 = nombre de moles de C_2H_4 produites après 6 h d'incubation
 Q_0 = nombre de moles de C_2H_4 produites au temps $t = 0$

8.2.4. Isolement des souches à partir des nodules

On prélève les nodules à partir des racines de Légumineuses et on les lave stérilement à l'eau distillée puis on les désinfecte 5 min dans une solution d' $HgCl_2$ à 2,5 ‰ additionnée d'une goutte de Teepol.

Après plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile, les nodules sont introduits dans des tubes en plastique contenant 2 ml de saccharose à 20 %. Les nodules sont écrasés à l'aide d'un étaleur stérile. On inocule 0,1 ml dans le milieu TY. Après croissance, les cellules sont étalées sur le milieu TY gélosé. Les clones apparus sont analysés pour leurs caractères génétiques.

IX. - METHODES D'EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE

9.1. Technique rapide selon GROSVELD et coll. (1982)

Cette méthode permet, en une journée, l'extraction de petites quantités d'ADN plasmidique assez pour permettre son analyse par électrophorèse ou sa digestion par des enzymes de restriction.

Le protocole expérimental est le suivant.

10 ml d'une culture à 30°C d'*E. coli*, en fin de phase exponentielle de croissance, sont centrifugés à 6 000 g pendant 15 min. Le culot obtenu est remis en suspension dans 400 µl de tampon Tris-HCl 25 mM, glucose 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8 (TE glucose). Ensuite, on effectue la lyse alcaline en ajoutant 800 µl d'une solution de NaOH/SDS (NaOH 0,2 N, SDS 1 %, P/V), préparée juste avant l'emploi, puis homogénéisation douce pendant 5 min à température ambiante. La précipitation de l'ADN chromosomique est effectuée par addition de 400 µl d'acétate de potassium 3 M, pH 4,8.

Après homogénéisation par retournement du tube, le mélange est placé 5 min dans la glace, puis on centrifuge 10 min à 10 000 g.

Le surnageant est recueilli puis déprotéinisé par un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1), saturé en TE glucose.

Après homogénéisation pendant 10 min, on centrifuge à 10 000 g pendant 5 min, la phase aqueuse est prélevée puis traitée 2 fois par un volume du mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1). On ajoute ensuite 3/7 de volume d'une solution de NaCl 1 M puis on précipite l'ADN par l'addition de 2 volumes d'éthanol à 95° pendant 2 h au minimum à - 20°C.

L'ADN est récupéré par centrifugation à 10 000 g pendant 25 min à 0°C. Le culot obtenu est séché sous vide puis remis en solution dans 100 µl d'eau distillée stérile.

Le traitement à la RNase est effectué par l'adjonction de 2 μ l de RNase A à 1 mg/ml préparée dans l'acétate de sodium 40 mM, pH 4. Cette solution de RNase A étant préalablement chauffée à 100°C, pendant 10 min, pour éliminer toute trace des DNases.

Le tube est incubé 2 h à 37°C, l'ADN obtenu peut être ensuite précipité par éthanol/NaCl ou être utilisé tel quel sans manipulations supplémentaires.

9.2. Méthode de préparation de plasmides selon ISH-HOROWICZ et BURKE (1981)

Cette méthode est utilisée pour préparer des plasmides de petite taille (< 25 kb), amplifiables chez *E. coli*.

Le protocole expérimental est le suivant.

La souche d'*E. coli*, contenant le plasmide à préparer, est cultivée une nuit dans 10 ml de milieu de Luria avec les antibiotiques dont les résistances sont conférées par le plasmide.

Cette préculture sert à inoculer 250 ml de milieu Luria sélectif (maintien de la pression de sélection). La croissance de la culture bactérienne est suivie par mesure de la DO à 600 nm.

Lorsque celle-ci atteint une valeur comprise entre 0,7 et 0,9, du chloramphénicol (solution mère : 30 mg/ml dans l'éthanol 95 %) est ajouté jusqu'à la concentration finale de 150 μ g/ml. L'incubation est poursuivie une nuit à 30°C. Les bactéries sont récupérées par centrifugation (5 000 g, 15 min, 4°C) et remises en suspension dans 9 ml de TE glucose, pH 8 (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, glucose 50 mM). On ajoute ensuite 1 ml d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml dissous dans du TE glucose. Le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante.

La lyse alcaline est effectuée par l'addition de 20 ml de NaOH 0,2 N, SDS 1 %, cette solution étant préparée extemporanément à partir d'une solution de NaOH 10 N et d'une solution de SDS à 10 %. Après homogénéisation et

incubation 5 min dans la glace, on ajoute 10 ml d'acétate de potassium 3 M, pH 4,8 à 4°C pour précipiter l'ADN chromosomique. Après 15 min dans la glace, le mélange est centrifugé à 6 000 g, 10 min, après avoir ajouté 2,5 ml d'eau.

Le surnageant est filtré à travers une seringue contenant de la fibre de verre pour retenir les agrégats résiduels.

L'ADN plasmidique est précipité par 0,6 volume d'isopropanol glacé à - 20°C pendant 25 min avant d'être centrifugé à 10 000 g pendant 20 min. Le culot est séché sous vide et repris par 2,5 ml de tampon T₁₀E₁₀, pH 8 (Tris 10 mM, EDTA 10 mM). On ajuste ensuite le pH de la solution à 7 par addition de Tris base 2 M (environ 120 µl). Le traitement à la RNase se fait en ajoutant 50 µl d'une solution de RNase A à 2 mg/ml préalablement chauffée 10 min à 100°C puis on laisse incuber le tube 2 h à 37°C.

La purification en gradient de chlorure de césium, de la solution plasmidique obtenue, est réalisée de la façon suivante.

On dissout 4,2 g de chlorure de césium dans 2,4 ml de la solution d'ADN plasmidique. Puis, on ajoute 0,4 ml d'une solution de bromure d'éthidium à 2 mg/ml dans T₁₀E₁₀. Le mélange obtenu est ensuite introduit dans un tube d'ultracentrifugation Beckman de 13 ml en polyallomère. On introduit ensuite, à la surface du mélange précédent, une solution de CsCl dans T₁₀E₁₀ dont l'indice de réfraction est de 1,3780 (soit une masse volumique de 1,470 g/l).

Le tube à centrifuger est complété à 11,5 ml, on obtient ainsi un gradient préformé constitué de 2 couches de CsCl de densités différentes.

La centrifugation est réalisée en 17 h à 50 000 tr/min, soit 170 000 g dans un rotor de type 70.1 Ti à 20°C.

La centrifugation étant terminée, on recueille (sous UV à 320 nm) dans un tube Eppendorf, à l'aide d'une pipette automatique, la bande fluorescente inférieure correspondant à l'ADN plasmidique sous forme superhélicoïdale. Le bromure d'éthidium est extrait plusieurs fois par un volume d'isopropanol

saturé en CsCl et en $T_{10}E_{10}$, jusqu'à disparition complète de la fluorescence de la phase aqueuse en UV (320 nm). Les traces d'isopropanol présentes dans la phase aqueuse sont ensuite extraites par un volume d'éther éthylique. Le chlorure de césium est dilué par adjonction de 3 volumes d'eau distillée. L'ADN est précipité par addition de 2 volumes d'éthanol à -20°C . Le tube est centrifugé (10 000 g, 20 min) après 2 h au minimum d'incubation à -20°C . Le précipité obtenu est séché sous vide et remis en solution dans le tampon approprié à l'utilisation ultérieure du plasmide.

La concentration en ADN est évaluée par électrophorèse en gel d'agarose par rapport à de l'ADN de phage lambda de concentration connue.

X. - EXTRACTION D'ADN TOTAL

La méthode utilisée est la suivante.

10 ml de culture bactérienne en milieu riche parvenue en fin de phase exponentielle de croissance sont centrifugés à 6 000-g pendant 20 min à 20°C . Le culot est remis en suspension dans 3 ml de $T_{50}E_{20}$, pH 8 (Tris 50 mM, EDTA 20 mM). On ajoute ensuite 1 ml de sarkosyl à 5 % (P/V) dans le même tampon et 1 ml de pronase à 2,5 mg/ml de tampon $T_{50}E_{20}$. Le mélange est laissé 1 h au moins à 37°C . Pour parfaire l'homogénéisation, le lysat est passé plusieurs fois à travers une seringue sans aiguille.

Le lysat est ensuite traité par un volume de phénol saturé en Tris-HCl 100 mM. Cette déprotéinisation est effectuée 2 fois. La phase aqueuse est ensuite extraite 4 fois par un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). La solution chloroformique est ensuite centrifugée une dernière fois, le surnageant est prélevé et on ajoute 3/7 de volume d'une solution de NaCl 1 M. L'ADN est ensuite précipité par 2 volumes d'éthanol à 95° à -20°C . Après centrifugation à 10 000 g pendant 20 min à 0°C , le culot est séché sous vide et remis en solution dans 200 μl de $T_{5}E_{0,5}S_{5}$, pH 8 (Tris 5 mM, EDTA 0,5 mM, NaCl 5 mM).

L'ADN purifié ainsi obtenu pourra alors éventuellement subir un traitement à la RNase A, une électrophorèse en gel d'agarose par rapport à de l'ADN de phage lambda pour déterminer sa concentration ou une digestion par des endonucléases de restriction.

XI. - METHODES ELECTROPHORETIQUES

11.1. Electrophorèse horizontale

Ce type d'électrophorèse est utilisé pour estimer la pureté, la concentration, la taille de l'ADN chromosomique, plasmidique ou de fragments d'ADN obtenus après digestion enzymatique.

Le protocole expérimental est le suivant.

- Préparation du gel d'agarose

La concentration du gel utilisé varie de 0,6 à 1,2 % (P/V). Le gel est préparé dans du tampon T.B.E., pH 8,3 (Tris 89 mM, acide orthoborique 89 mM, EDTA 2,5 mM). L'ensemble est porté à ébullition puis maintenu en surfusion à 55-60°C prêt à être utilisé. La solution est ensuite versée dans un support en plastique muni d'un peigne à 8, 10 ou 15 dents.

Après solidification, le peigne est retiré, le gel présente alors des alvéoles dans lesquelles seront effectués les dépôts. Le gel est ensuite placé dans la cuve à électrophorèse et immergé dans le tampon T.B.E.

- Dépôt des échantillons

Dans chaque alvéole formée par le retrait du peigne, on dépose 25 à 60 µl d'échantillon contenant 2/3 de solution d'ADN et 1/3 de tampon d'arrêt pH 7 [saccharose 50 % (P/V), EDTA 50 mM, urée 4 M, bleu de bromophénol 0,1 %].

La migration se fait avec une différence de potentiel de 80 volts pendant 15 min puis à 120 volts 1h30 à pH 8,3 ; l'ADN est chargé négativement et

migre vers l'anode. Le bleu de bromophénol permet de suivre le déroulement de l'électrophorèse.

- Coloration et observation du gel

Le gel est ensuite trempé dans un bain de bromure d'éthidium à la concentration approximative de 2 µg/ml et placé pendant 30 min à l'obscurité, car il s'agit d'un produit instable à la lumière. La décoloration s'effectue ensuite dans un bain d'eau distillée pendant 30 à 45 min, pour avoir un contraste optimum. Les bandes sont visualisées sous éclairage UV à 302 nm.

11.2. Lyse directe sur gel par électrophorèse verticale

La méthode employée dérive de celle d'ECKHARDT (1978) modifiée par PÜHLER et coll. (1982). Elle permet d'analyser le contenu plasmidique des transformants ou des transconjugants.

On procède de la façon suivante : les souches de *Rhizobium meliloti* sont cultivées dans le milieu riche TY jusqu'à l'obtention de la phase exponentielle de croissance. On dépose ensuite 0,5 ml de culture à DO égale à 0,3 dans de petits tubes coniques en plastique "Eppendorf" de 1,5 ml de capacité et on ajoute 1 volume de sarkosyl à 0,2 % dans le tampon Tris 50 mM, Na₂ EDTA 20 mM (TE), pH 8. On mélange en inversant le tube doucement plusieurs fois. Il est ensuite placé dans la glace et après quelques minutes, centrifugé pendant 4 min à température ambiante. Le surnageant est retiré à l'aide d'une seringue et le culot est repris dans 50 µl de tampon d'électrophorèse (Tris 89 mM, Na₂ EDTA 2,5 mM, B(OH) 89 mM) de pH 8,3 contenant du saccharose à 25 %, 1 unité/ml de RNase A et 1 mg/ml de lysozyme (ce dernier est ajouté au moment de l'utilisation). Puis le culot est rapidement homogénéisé et immédiatement transféré dans un puits du gel. Une fois que toutes les alvéoles sont remplies, chaque échantillon est recouvert de 90 µl de T.B.E. contenant 1 % de SDS, 0,05 % de bleu de bromophénol et 0,4 % d'agarose. Après solidification, les alvéoles sont complètement remplies avec de l'agarose à 0,8 % maintenu en surfusion.

- Préparation de gel

On utilise un gel d'agarose à 0,8 % (P/V) dans du T.B.E., pH 8,3, que l'on coule entre deux plaques en verre dépoli séparées par des espaceurs de 1,5 mm. Les puits sont réalisés par un peigne en Téflon à 15 dents introduit lorsque le gel est encore en surfusion.

- Migration

Les plaques de verre contenant le gel et l'échantillon sont transférées dans une cuve à électrophorèse Biorad. La migration est de 1h30 à 30 volts, ce qui permet au SDS de migrer et de lyser les bactéries. Puis le voltage est porté à 130 volts pendant 2h30. Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est coloré et décoloré comme décrit précédemment.

11.3. Electroélution

Ce type d'électrophorèse est utilisé pour isoler des fragments d'ADN de taille déterminée.

Le protocole expérimental est le suivant.

Dans chaque puits d'un gel d'agarose horizontal (0,6 %, P/V), on dépose 40 μ l d'une solution d'ADN digéré contenant 1/3 de volume de tampon d'arrêt. Le premier puits est constitué d'un témoin d'ADN de phage lambda digéré par EcoRI et HindIII. Après migration pendant 4h30 à 110 volts, le gel est découpé au niveau des puits 1 et 2 sur une longueur de 8 cm environ.

Cette bande témoin est prélevée, colorée de façon à localiser la position des fragments de taille intéressante (fragments d'ADN compris entre 4 et 12 kb). On découpe alors dans le gel d'agarose une alvéole de 4 mm de large, sur toute la longueur des puits restants, au niveau des fragments de 4,0 kb. Ensuite, le T.B.E. est introduit dans l'alvéole ainsi formée, puis on rétablit le voltage à 110 volts, l'ADN de taille supérieure à 4,0 kb va migrer en direction de l'alvéole. Au bout de 2 min d'électrophorèse, le tampon est prélevé puis on remplit à nouveau l'alvéole par du T.B.E. Cette opération est

répétée pendant 5 à 6 h de façon à ce que tous les fragments compris entre 4 et 12 kb soient récupérés. L'ADN en solution dans du T.B.E. est ensuite précipité par 3/7 de volume de NaCl 1 M puis 2 volumes d'éthanol à 95 % à - 20°C. Après centrifugation et remise en solution, une partie aliquote est soumise à une électrophorèse en gel d'agarose pour déterminer les tailles des fragments récupérés et la quantité d'ADN ainsi obtenue.

XII. - METHODES DE TRANSFERT D'ADN

12.1. Transformation

- Protocole

100 ml d'une culture d'*E. coli*, incubée à 30°C en milieu LB agité jusqu'à une DO de 0,6, sont placés 15 min dans la glace puis centrifugés à 7 000 g pendant 10 min à 0°C. Les cellules sont doucement remises en suspension dans 50 ml de CaCl₂ 0,1 M glacé. La suspension est laissée ainsi 30 min à 0°C dans la glace avant d'être de nouveau centrifugée à 7 000 g pendant 5 min à 0°C. Le culot est repris avec précaution dans 5 ml de CaCl₂ 0,1 M glacé puis les bactéries sont transférées dans un tube 16/160 en verre et placées 3 h à 0°C en homogénéisant de temps en temps.

Dans un tube en verre 16/160, placé à 0°C, on introduit 50 µl de la solution contenant l'ADN à transférer (soit 10 à 500 µg d'ADN dans 50 µl) et 100 µl de suspension cellulaire. L'ensemble est incubé 30 min à 0°C puis placé rapidement au bain-marie à 42°C pendant 2 min à 0°C avant d'être de nouveau transféré 10 min dans la glace. Les bactéries sont ensuite diluées au dixième en ajoutant du milieu LB préchauffé à 37°C. La suspension est ensuite incubée pendant 120 min à 37°C sans agitation avant d'être diluée et étalée sur milieux sélectifs.

12.2. Transposition

La souche d'*E. coli* WA803 (pGS9) est précultivée dans le milieu de Luria. Celle de *Rhizobium meliloti* dans le milieu TY jusqu'à l'obtention d'une

culture bactérienne en fin de phase exponentielle de croissance (environ $DO = 1$ à 600 nm). Puis on effectue les mélanges suivants :

Témoin <i>Rhizobium</i>	{	1 ml de milieu TY
		1 ml d'une suspension bactérienne de <i>Rhizobium</i>
Témoin <i>E. coli</i>	{	1 ml de Luria
		1 ml d'une suspension bactérienne d' <i>E. coli</i>
Croisement	{	1 ml d'une suspension bactérienne de <i>Rhizobium</i>
		1 ml d'une suspension bactérienne d' <i>E. coli</i>

Après agitation au vortex, on centrifuge les cellules à 4 000 g ; le culot obtenu est remis en suspension dans 0,1 ml de milieu R. Ensuite, les bactéries sont recueillies sur un filtre de nitrocellulose préalablement déposé stérilement dans une boîte de Petri contenant du TY gélosé.

Après incubation à 30°C, pendant 18 à 24 h, les bactéries sont remises en suspension dans 5 ml de tampon R.

On procède de la même manière pour les deux souches qui servent de témoins et qui sont utilisées pour la détermination du taux de mutation spontanée. Ensuite, on effectue des dilutions dans le tampon R jusqu'à 10^{-7} pour les trois mélanges.

On prélève une partie aliquote de 0,1 ml de la dilution appropriée que l'on étale sur les milieux sélectifs.

Les lectures des transconjugants ayant acquis le transposon Tn5 et le *Rhizobium meliloti* sont faites après 4 jours d'incubation à 30°C. Celle d'*E. coli* après 1 jour à 37°C.

Ensuite, nous avons repiqué les "transconjugants" sur milieu minima dont la seule source de carbone est constituée de l'un des sucres et dérivés suivants : glucose, fructose, galactose, mannitol, arabinose, xylose, succinate.

XIII. - UTILISATION DES ENZYMES

13.1. Enzymes de restriction

Tous les enzymes de restriction sont utilisés conformément aux indications décrites par les fournisseurs.

13.2. Ligase

La ligase est utilisée à température ambiante à raison de 1 unité par μg d'ADN selon les indications de KING et coll. (1986).

13.3. Phosphatase alcaline

1 μg d'ADN plasmidique est dissous dans 100 μl de $T_{50}E_{0,1}$, pH 8. On ajoute 1 unité de phosphatase alcaline à la solution qui est incubée pendant 4 h à 37°C. L'enzyme est ensuite inactivé par adjonction de 10 μl d'EGTA 50 mM, pH 8, et chauffage à 65°C pendant 10 min. L'ADN déphosphorylé est alors déprotéinisé par 2 fois 1 volume de phénol/chloroforme (1/1, V/V) puis par 2 fois 1 volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, P/V) avant d'être précipité à l'éthanol/NaCl.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. - ISOLEMENT DE MUTANTS METABOLIQUES ET ETUDE DE LEURS CARACTERISTIQUES

1.1. Obtention des mutants par transposition

Nous envisageons de transférer le plasmide suicide pGS9 de la souche d'*E. coli* WA803 vers la souche de *R. meliloti* M5N1.

Les deux souches étudiées présentent les caractères suivants :

- *E. coli* WA803 : Thi⁻, Met⁻, rk⁻, mk⁻ (Km^r/Nm^r, Cm^r, Tra⁺) ;
- *R. meliloti* M5N1 : type sauvage.

Le plasmide suicide pGS9 porte le transposon Tn5 qui confère la résistance à la kanamycine chez *E. coli* et à la kanamycine, streptomycine chez *R. meliloti* (Fig. 8) (SELVARAJ et coll., 1983).

Nous avons effectué le croisement entre ces deux souches et la sélection des transconjugants est réalisée sur le milieu riche TY, contenant de la streptomycine (100 µg/ml) et de la kanamycine (200 µg/ml). La fréquence de transposition (rapport du nombre de bactéries ayant incorporé le Tn5 au nombre total de bactéries réceptrices) obtenue est de $1,3 \cdot 10^{-6}$; la fréquence de mutation spontanée est de $1 \cdot 10^{-7}$. Les colonies résistantes à la fois à la Sm et à la Km (ayant donc acquis le Tn5) sont ensuite repiquées sur milieu minimum (RHB1) additionné de différents substrats carbonés (glucose, fructose, galactose, mannitol, sorbitol, arabinose, ribose, xylose, succinate). La majorité des colonies manifeste un caractère auxotrophe et ne se développe pas sur le milieu minimum, 20 colonies seulement cultivent sur succinate et demeurent incapables d'utiliser les autres substrats testés (Tab. 11).

1.2. Vérification de l'appartenance des mutants au genre *Rhizobium* : infectivité

Nous avons vérifié l'identité des souches mutantes et leur appartenance au genre *Rhizobium* par leur possibilité d'induire, après inoculation, la nodulation

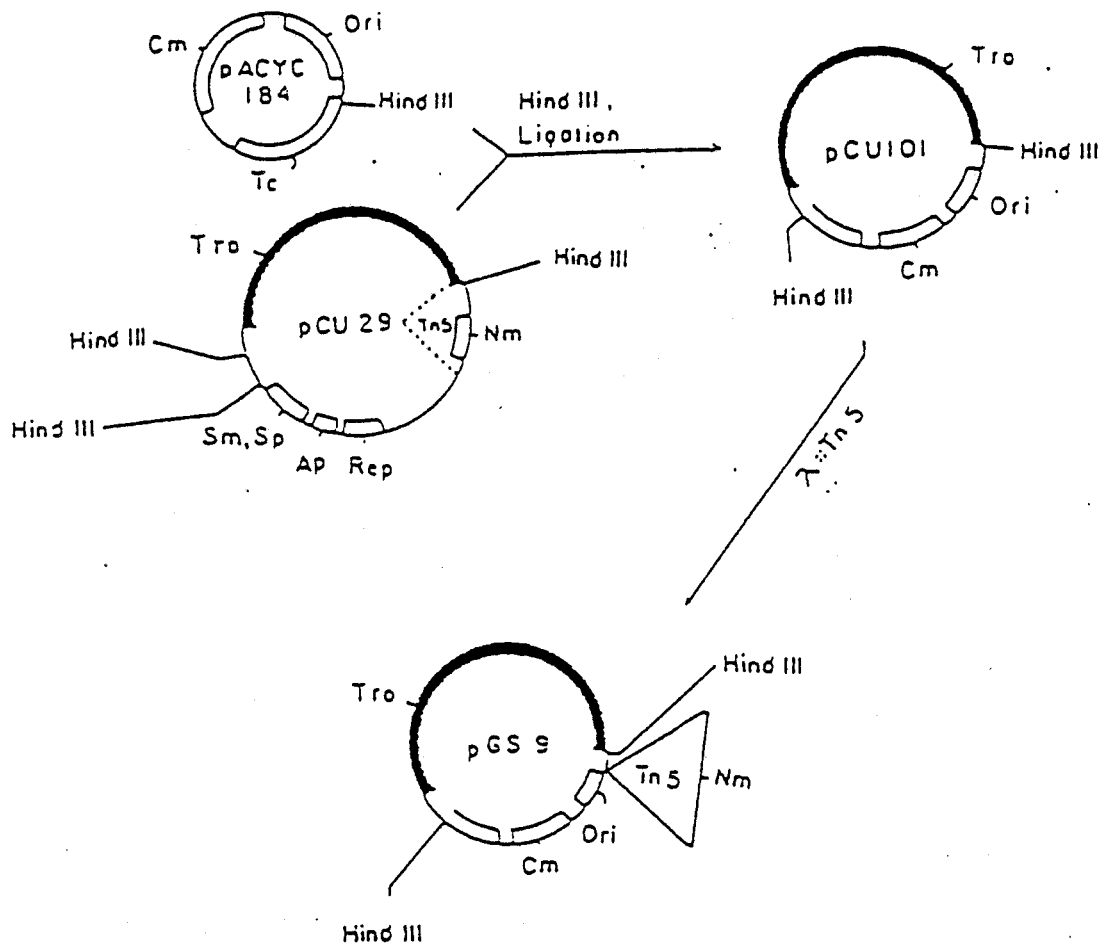


Fig.8 : Construction du plasmide pGS9
(d'après SELVARAJ et IYER , 1983)

Substrats		Souches	
		M5N1	Mutants
Hexoses	Glucose	+	-
	Fructose	+	-
	Galactose	+	-
Pentoses	Ribose	+	-
	Xylose	+	-
	Arabinose	+	-
Polyols	Mannitol	+	-
	Sorbitol	+	-
A.dicarboxyliques	Succinate	+	+
	Fumarate	+	+
	Malate	+	+
Autres	Lactate	+	+
	Glutamate	+	+

Tableau 11. Croissance de *R.meliloti* M5N1 et des mutants sur RHB1 additionné de différentes sources de carbone

+ : Croissance

- : Pas de croissance

de plantules aseptiques de Luzerne (*Medicago sativa*). Nous avons constaté que les 20 souches mutantes développent des nodules rosâtres identiques à ceux obtenus avec la souche sauvage M5N1. Par ailleurs, nous avons vérifié que les nodules contiennent bien la souche avec laquelle ils ont été infectés.

Parmi ces mutants, nous en avons choisi un, nommé 2.10 pour les études ultérieures.

1.3. Caractéristiques du mutant 2.10

1.3.1. Contrôle de la pureté

1.3.1.1. Digestion d'ADN total

Pour s'assurer de la pureté du mutant 2.10, nous avons réalisé, en plus de l'infectivité, une digestion de son ADN total par des endonucléases de restriction et comparé le profil obtenu à celui de la souche sauvage M5N1.

Pour cela, nous avons d'abord extrait l'ADN total du mutant 2.10 et de la souche témoin M5N1, selon la méthode décrite en page 56, puis l'avons coupé par deux enzymes de restriction : BamHI et XhoI.

Les profils des électrophorégrammes (Photo 1) ne montrent pas de différences visibles des fragments d'ADN séparés ; il y a donc une grande communauté entre la souche sauvage et le mutant 2.10.

1.3.1.2. Mesure de l'efficience

La mesure de l'efficience est réalisée après quatre semaines de développement des plantules de Luzerne "*in vitro*". On constate que l'activité nitrogénasique du mutant 2.10 est proche de celle de la souche parentale M5N1 (Tab. 12).

Il semble donc que l'utilisation par *Rhizobium* des hexoses, des pentoses et des polyols (tout au moins ceux testés) n'est essentielle ni pour la nodulation ni pour la fixation d'azote.

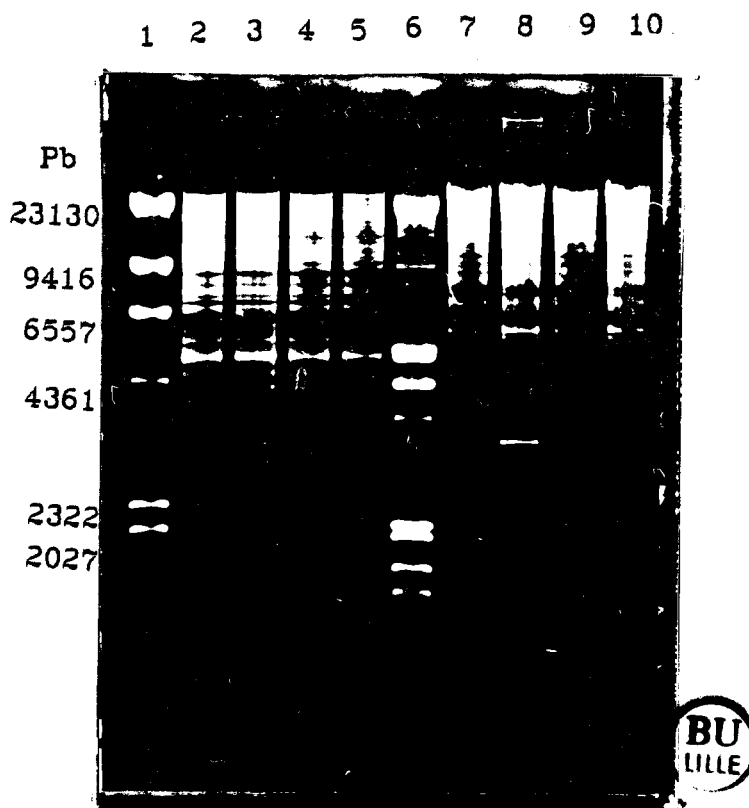


Photo.1: Profils de digestion par BamH1 et Xho1 .

1 = λ / HindIII.

2 = M5N1/BamH1.

3 = 2.10/BamH1

4 et 5 = Révertants/BamH1

6 = λ /EcoR1 et HindIII

7 = M5N1/Xho1.

8 = 2.10/Xho1

9 et 10 = Révertants/Xho1

Souche	Nodulation	Activité nitrogénase nmoles C ₂ H ₄ /plante.h
M5N1	+	28.3
Mutant 2.10	+	20.8

Tableau 12. Propriétés symbiotiques de *R.meliloti* M5N1 et du mutant 2.10

Ce résultat rejoint et conforte l'ensemble des travaux déjà mentionnés par d'autres auteurs concernant le rapport entre les mutations au niveau du métabolisme intermédiaire des sucres et la symbiose. En effet, les mutants phosphoglucose-isomérase⁻ de *R. meliloti* (ARIAS et coll., 1979 ; EL GUEZZAR et coll., 1988), glucokinase⁻, fructokinase⁻ de *R. leguminosarum* (GLENN et coll., 1984b), mannitol-déshydrogénase⁻, ribose-kinase⁻ et xylose-isomérase⁻ de *R. meliloti* (DUNCAN, 1981) restent également efficaces.

1.3.2. Propriétés de croissance

Nous constatons, d'après le tableau 13, que le mutant 2.10 croît à la même vitesse que la souche parentale sur succinate, fumarate, malate, lactate et probablement glutamate. Par contre, le glucose, le fructose, le galactose, le mannitol, le sorbitol, le xylose, le ribose et l'arabinose ne permettent pas la croissance du mutant.

Le succinate, en concentration limitante et additionné de glucose ou de fructose, est à l'origine chez *R. meliloti* sauvage de l'apparition de croissance diauxique (HORNEZ et coll., 1984). Pour la souche sauvage, les 2 temps de génération notés dans le tableau 12 correspondent successivement à celui de la première phase de développement sur l'acide organique et à celui de la seconde phase de développement sur l'hydrate de carbone. Le mutant 2.10, en présence de succinate plus glucose, présente une seule phase de croissance avec une inhibition de la croissance (Fig. 9) et une augmentation du temps de génération (Tab. 13).

1.3.3. Mesure des activités perméasiques

La cinétique d'accumulation du glucose, fructose, galactose et succinate par les cellules de la souche parentale M5N1 et du mutant 2.10 est effectuée selon la technique décrite par THEODOROPOULOS (1986). Les résultats obtenus (Fig. 10, a, b, c et d) montrent que les perméases spécifiques aux glucose, fructose, galactose, ne fonctionnent pas chez le mutant 2.10. Par contre, une forte activité succinate perméasique est observée (Fig. 10, d) et la vitesse initiale d'accumulation du succinate chez ce mutant est identique à celle de la souche parentale.

Source de carbone	Temps de génération (h)	
	M5N1	Mutant
Glucose	+(4)	-
Fructose	+(4)	-
Galactose	+(5)	-
Mannitol	+(4.5)	-
Sorbitol	+(4.5)	-
Xylose	+ ND	-
Ribose	+ ND	-
Arabinose	+ ND	-
Succinate	+(4)	+(4)
Fumarate	+(3)	+(3)
Malate	+(4)	+(3.5)
Lactate	+(2.5)	+(2)
Glutamate	+ ND	+ ND
Succinate + Glucose	4;3,5 a	+ 5
Succinate + Fructose	3;4	+ 5

Tableau 13. Croissance de *R.meliloti* M5N1 et du mutant 2.10 sur différentes sources de carbone

Les cellules sont cultivées sur milieu minimum RHB1 additionné de 0,1% de substrat

+ : croissance

- : pas de croissance

a : les 2 temps de génération lors de la croissance diauxique

ND: Non déterminé

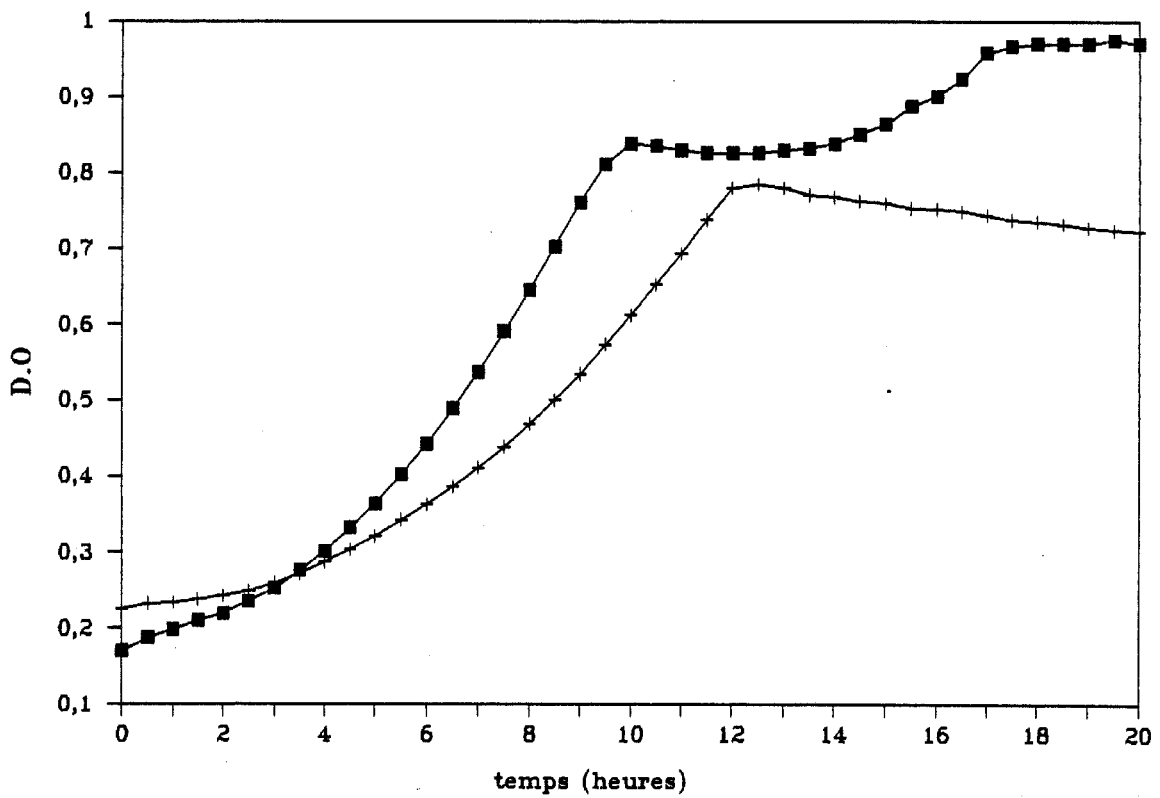


Fig.9 : Croissance , mesurée au microbiomètre , de *R.meliloti* M5N1 (■) et du mutant 2.10+(+) , sur un mélange de succinate et de glucose à 0,1% chacun .

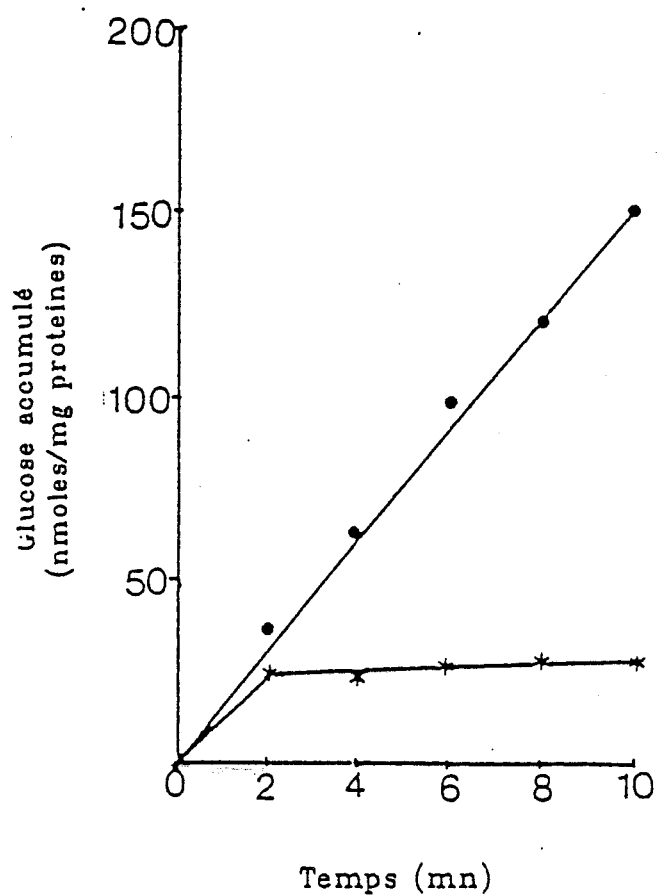


Fig. 10a :

Accumulation du glucose 0,1 mM par les cellules de *R. meliloti* M5N1 (●) et du mutant 2.10 (*) préalablement cultivées sur sur RHBI additionné de lactate.

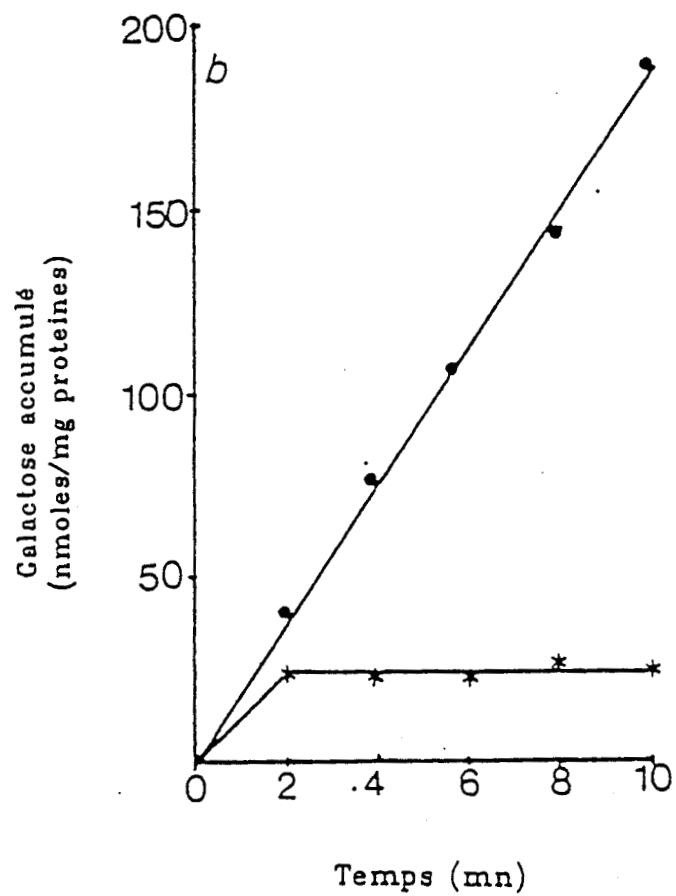


Fig. 10b :

Accumulation du galactose 0,1 mM par les cellules de *R. meliloti* M5N1 (●) et du mutant 2.10 (*) préalablement cultivées sur RHB1 additionné de lactate.

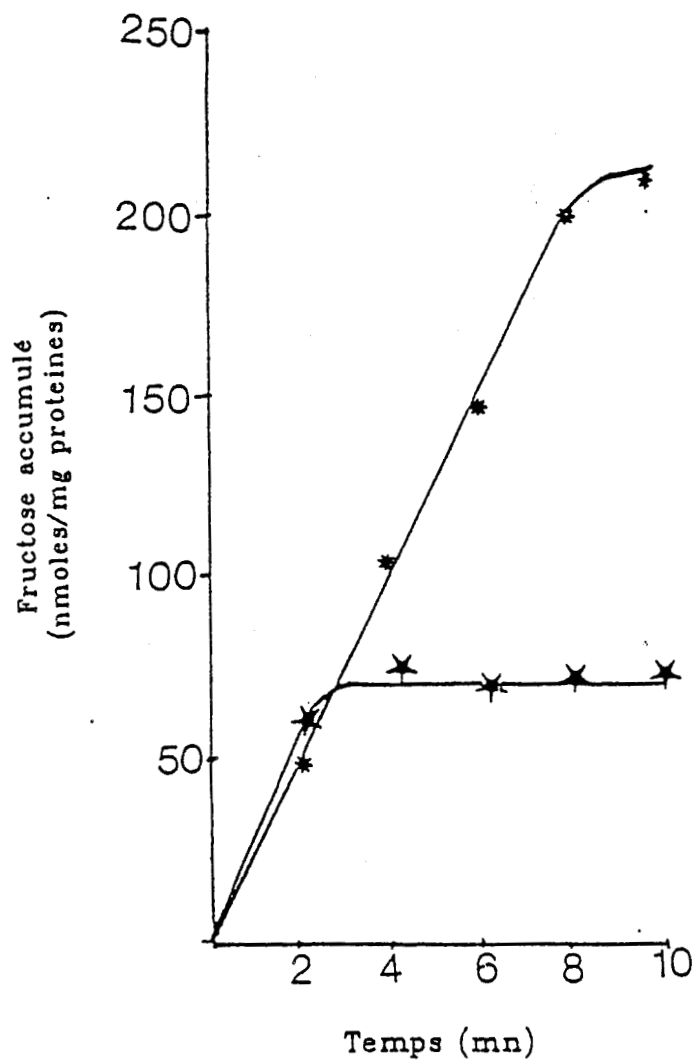


Fig. 10c :

Accumulation du fructose 0,1 mM par les cellules de *R.meliloti* M5N1 (*) et du mutant 2.10 (⊛) préalablement cultivées sur RHB1 additionné de lactate.

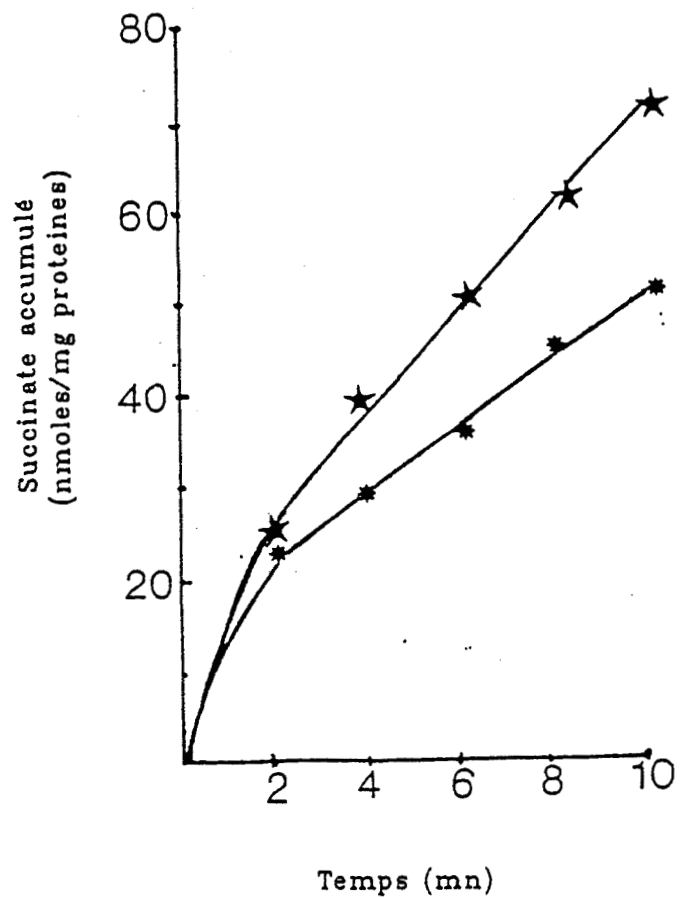


Fig. 10d :

Accumulation du succinate 0,1 mM par les cellules de *R. meliloti* M5N1 (★) et du mutant 2.10 (*) préalablement cultivées sur RHB1 additionné de succinate.

Chez *R. meliloti* M5N1, le glucose, le fructose, le galactose possèdent leurs propres systèmes de transport, et le fait que notre mutant ne peut accumuler ni l'un ni l'autre des sucres testés nous laisse déjà supposer que plusieurs gènes sont mutés en même temps.

1.3.4. Recherche de la modification du contenu plasmidique

Dans le but de rechercher une éventuelle modification de taille des plasmides du mutant par rapport à ceux de la souche d'origine, nous avons analysé le contenu plasmidique du mutant 2.10 en lysant directement celui-ci au sommet d'un gel vertical d'agarose, puis en soumettant ce lysat à une électrophorèse.

Les résultats (Photo 2) montrent :

- que la souche de *R. meliloti* M5N1 possède ses trois plasmides habituels (puits 1) ;
- que la souche mutante 2.10 a perdu son plasmide géant et que deux plasmides supplémentaires sont apparus (puits 2).

Ce résultat peut s'expliquer par un réarrangement génomique qui serait dû à l'introduction du plasmide suicide pGS9 utilisé pour la transposition.

Chez la famille des Rhizobiaceae, des réarrangements génomiques similaires ont été rapportés par différents auteurs :

- soit après le transfert du plasmide symbiotique (CHRISTENSEN et SCHUBERT, 1983 ; DJORDJEVIC et coll., 1983) ;
- soit après introduction du plasmide RP1 chez *Bradyrhizobium japonicum* (BERRY et ATHERLY, 1984) ;
- soit à l'issue du transfert du plasmide suicide pSP601 d'*E. coli* vers *Rhizobium meliloti* (ALI et coll., 1989).

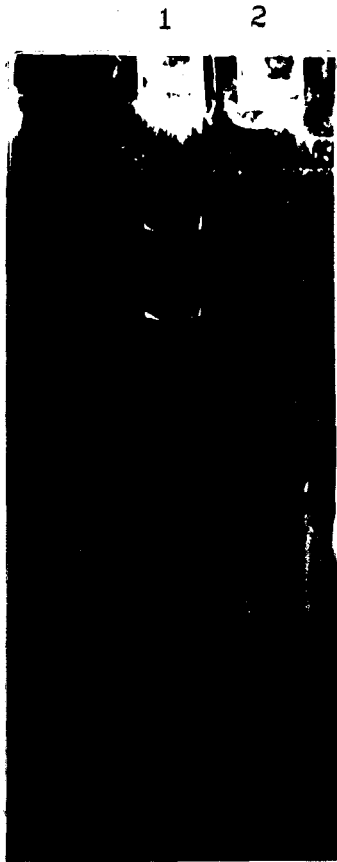


Photo.2: Contenu plasmidique du mutant 2.10.

1 = R.meliloti M5N1 (Temoin)

2 = Mutant 2.10.

Ces auteurs concluent que ces réorganisations génomiques peuvent être dues soit à la formation de nouveaux plasmides à partir des fragments chromosomiques ; soit que des morceaux du chromosome viennent s'intégrer dans les plasmides indigènes donnant ainsi naissance à de gros plasmides ; soit, plus simplement, que les mégaplasmides se réarrangent pour donner naissance à des petits plasmides.

1.4. Obtention et étude des révertants

1.4.1. Réversion

L'étalement de suspensions cellulaires du mutant 2.10 sur boîtes contenant le milieu RHBI additionné de glucose à 1 %, fait apparaître des "révertants" à une fréquence de l'ordre de $5,7 \cdot 10^{-7}$.

En plus du glucose, le fructose, le mannitol, l'arabinose, le xylose et le ribose permettent aussi la croissance de ces souches. La mise en culture des différents révertants en présence d'antibiotiques montre que ces bactéries ont gardé leur résistance à la streptomycine et à la kanamycine : ce qui correspondrait donc à une pseudo-réversion. En effet, un vrai révertant résulterait de l'excision du transposon Tn5 ; ceci s'accompagnant d'un retour ou non à l'état sauvage et de la perte de la résistance à la kanamycine et à la streptomycine.

Exemple : mutant (sucre⁻, Km^r) → révertant (sucre⁺, Km^s) ou sucre⁻ (cas d'une délétion).

Cependant, un pseudo-révertant conserve sa résistance à la kanamycine et à la streptomycine et le retour à l'état sauvage ne provient apparemment pas de la reconstitution du gène altéré par l'insertion du Tn5, sauf s'il y a retransposition de cet élément à un endroit du génome bactérien, suivie d'une excision de la première copie du Tn5 située sur le gène muté. Dans ce cas, on retrouve les caractéristiques métaboliques initiales associées aux caractères de résistance du transposon. Mais ces variantes obtenues sont certainement mutées sur d'autres activités.

Exemple : mutant (sucre⁻, Km^r) \longrightarrow révertant (sucre⁺, Km^r).

Nous avons donc obtenu des "pseudo-révertants" parmi lesquels deux ont été choisis pour étudier leur ADN total et leurs propriétés symbiotiques afin de vérifier leur identité.

1.4.2. Digestion de l'ADN total

L'ADN total des deux "pseudo-révertants" est soumis à une digestion par les endonucléases de restriction BamHI et XhoI. Le profil obtenu (Photo 1) ne montre pas de variations sensibles quand on le compare à celui de la souche sauvage M5N1 ou à celui du mutant 2.10.

1.4.3. Propriétés symbiotiques

Comme pour la M5N1 et la 2.10, les deux pseudo-révertants induisent la formation de nodules 15 à 20 jours après l'inoculation des plantules. Mais ces nodules sont blanchâtres comparés aux nodules rosâtres observés lors de l'inoculation des plantules par la souche sauvage M5N1 ou par le mutant 2.10.

Le dosage de l'activité nitrogénasique donne une valeur très faible égale à celle obtenue avec les plantules non inoculées utilisées comme témoin (de l'ordre de 3 nmoles de C₂H₂ réduites par plante et par heure).

L'inefficacité de ces pseudo-révertants est peut-être due à une retransposition du Tn5 sur l'un des gènes de fixation d'azote qui, chez *R. meliloti*, sont localisés sur les plasmides (BANFALVI et coll., 1981).

Cette hypothèse nous paraît vraisemblable puisque nous constatons, par ailleurs, une augmentation de la résistance des pseudo-révertants à la kanamycine jusqu'à des concentrations de 1200 µg/ml. Ceci est en faveur d'une retransposition du Tn5, suivie de son amplification.

1.5. Conclusion

Par mutagenèse biologique, en utilisant le transposon Tn5 porté par le plasmide suicide pGS9, nous avons isolé un mutant 2.10 de *R. meliloti* M5N1 qui présente un caractère carbohydrate négatif.

La fréquence de transposition obtenue est de $1,3 \cdot 10^{-6}$. Ce résultat est voisin de ceux trouvés par d'autres auteurs chez *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. trifolii* et *R. meliloti* (BERINGÈRE et coll., 1978 ; ALI et coll., 1983) en utilisant aussi des plasmides suicides comme vecteurs de ce transposon. Signalons que cette fréquence est mille fois plus élevée ($\approx 10^{-3}$) chez *E. coli* lors de la transposition du Tn5 véhiculé par le bactériophage λ (SHAW et BERG, 1979). Le mécanisme de transfert du vecteur du transposon Tn5 doit jouer un rôle important dans le phénomène. La vérification de l'appartenance des mutants au genre *Rhizobium* a été réalisée par la nodulation des plantules de la Luzerne. Un mutant baptisé 2.10 a été choisi pour les études ultérieures. Le contrôle de la pureté de celui-ci a été effectué en comparant son profil de digestion d'ADN total à celui de la souche sauvage M5N1.

La réversion, réalisée sur milieu RHBI additionné de glucose, donne des pseudo-révertants incapables de fixer l'azote atmosphérique. Cette inefficience est probablement due à une retransposition du Tn5 vers l'un des gènes de la fixation d'azote. Ce phénomène a été déjà signalé chez *R. meliloti* en utilisant le même transposon (ALI et coll., 1989).

Il est difficile de déterminer directement la nature de la mutation du fait de l'incapacité du mutant à se développer à partir de nombreux substrats. Néanmoins, et à partir de la fréquence de réversion relativement élevée ($5,7 \cdot 10^{-7}$), indiquant qu'une simple mutation est à l'origine du caractère pléiotrope du mutant 2.10, deux hypothèses sont envisageables :

- soit la mutation a eu lieu au niveau d'une voie métabolique commune aux substrats testés ;
- soit celle-ci a touché un gène de régulation contrôlant simultanément plusieurs activités.

La première hypothèse ne semble pas adéquate ; en effet, l'arabinose qui suit une voie métabolique tout à fait particulière chez les souches de *Rhizobium* à croissance rapide (cf. Introduction, 3.2.4) ne permet pas non plus la croissance du mutant 2.10. Ce pentose rejoint, en effet, directement le cycle de Krebs au niveau de l' α -cétoglutarate (DUNCAN et FRAENKEL, 1979).

Par contre, la deuxième hypothèse nous paraît plus vraisemblable dans le sens où notre mutant croît sur des substrats (lactate, glutamate) dont l'utilisation n'est pas réprimée par la succinate (cf. 1.3.2), de plus le mutant 2.10 présente des propriétés de croissance similaires à celles observées chez des mutants de régulation d'*E. coli* décrits par certains auteurs (PERLMAN et PASTAN, 1969 ; BRIEKMAN et coll., 1973 ; KUMAR, 1976 ; GUIDI-RONTANI et coll., 1981 ; IRWIN et PTASHNE, 1987).

L'analyse des résultats publiés sur la régulation chez *E. coli* montre l'existence d'une régulation type répression catabolique. Celle-ci fait intervenir au moins deux partenaires : l'AMPc et son récepteur, la protéine CAP. L'identification des mutants de régulation chez *E. coli* montre, à chaque fois, qu'ils sont altérés soit au niveau du gène cya : gène codant pour la synthèse de l'AMPc, soit au niveau du gène crp : gène responsable de la production de la protéine CAP, soit au niveau des deux gènes.

En effet, l'expression d'un grand nombre d'unités génétiques, responsables du catabolisme des sources de carbone, requiert la présence d'un complexe fonctionnel entre l'AMPc et son récepteur CAP. Ce complexe est capable de se fixer à l'ADN dans la région promoteur de certains opérons et d'activer leur transcription (DE GUNZBURG, 1985). Il s'ensuit donc que des mutants défectifs dans la production d'AMPc (Cya) ou dans celle de son récepteur (Crp) seront incapables d'exprimer ces unités génétiques.

Dans le chapitre suivant, nous aborderons le rôle de l'AMPc dans la répression catabolique chez *Rhizobium meliloti* souche sauvage. Ensuite, nous verrons l'effet de l'addition de ce nucléotide sur la croissance de notre mutant afin de rechercher une éventuelle mutation au niveau du gène cya : gène codant pour la synthèse d'adényl-cyclase, enzyme qui catalyse la synthèse de l'AMPc à partir de l'ATP.

II. - RECHERCHE DE L'EXISTENCE D'UNE MUTATION SUR LE GENE CODANT POUR LA SYNTHÈSE DE L'AMPcyclique

2.1. Les phénomènes de croissance diauxique

Lorsqu'un milieu de culture contient deux sources de carbone, on peut obtenir soit une seule phase exponentielle de croissance si les deux substrats sont utilisés simultanément, soit deux phases exponentielles séparées par une phase de latence intermédiaire plus ou moins importante si les deux substrats sont utilisés successivement : c'est le phénomène de diauxie (traditionnellement représenté par l'effet du glucose sur l'utilisation du lactose chez *E. coli*).

Ce phénomène est observé dans tous les cas où les enzymes impliqués dans l'utilisation du deuxième substrat sont inductibles ou constitutifs et soumis en présence du premier substrat en concentration limitante à la répression catabolique.

2.1.1. Rappel : effet du succinate sur l'utilisation du glucose

Des travaux antérieurs du Laboratoire ont montré que le succinate joue le rôle de répresseur sur le système de transport du glucose (HORNEZ, 1987). Ceci se traduit par une croissance diauxique de *R. meliloti* M5N1 sur le milieu minimum RHB1 contenant le succinate en concentration limitante additionné de glucose. Les essais effectués sont rapportés sur les figures 11a et 11b. On constate qu'à la concentration de 1 g/l, le succinate est un facteur limitant à la croissance de *R. meliloti* (Fig. 11a). L'addition de glucose (1 g/l) à un milieu contenant du succinate (1 g/l) permet d'observer lors de la culture une courbe de croissance se développant en deux phases exponentielles successives (Fig. 11b). Au cours de la première phase de croissance, la concentration en glucose dans le milieu reste inchangée et l'activité perméasique très faible. A partir du début de la phase stationnaire intermédiaire et durant la seconde phase de croissance, une diminution de la concentration en glucose du milieu est observée, en même temps qu'une augmentation considérable de l'activité perméasique (HORNEZ, 1987). Il faut noter que la phase d'attente apparaît à un niveau de densité cellulaire légèrement supérieur à celui observé avec le succinate seul à même

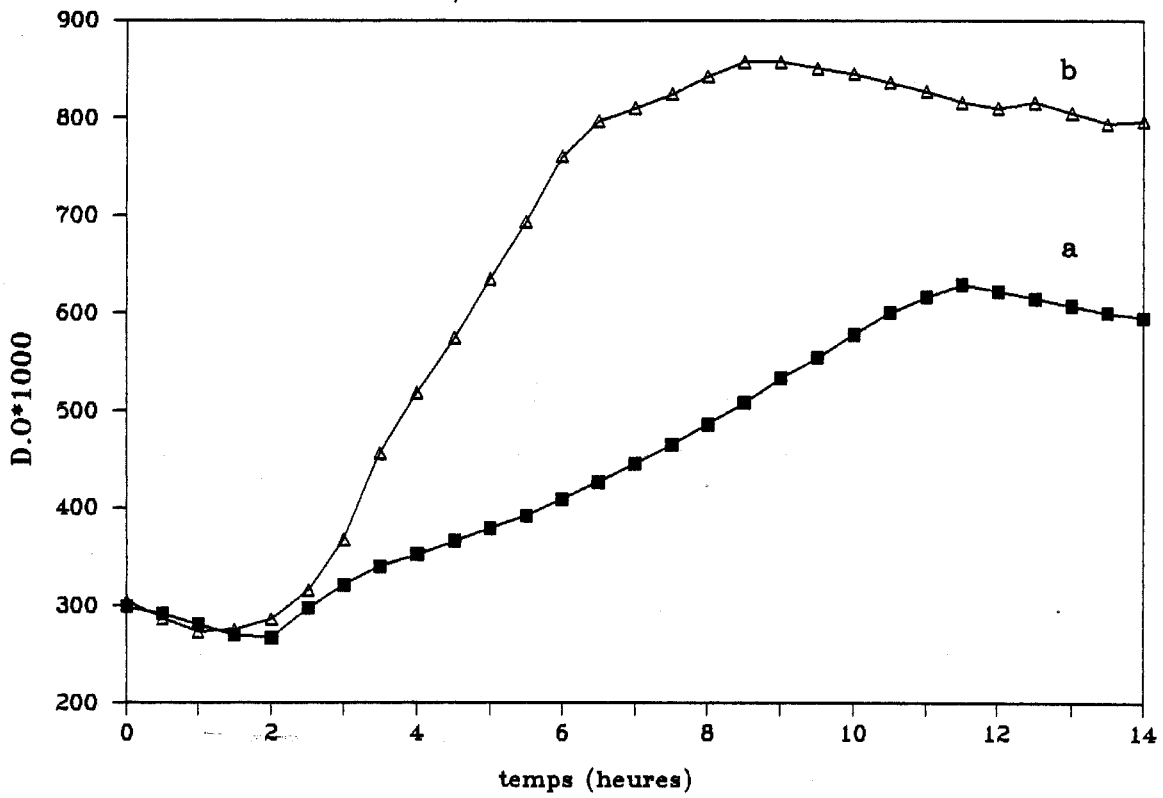


Fig. 11a : Croissance , mesurée au microbiomètre , de *R. meliloti* M5N1 sur RHB1 additionné de succinate à 0,1% (a) ou à 0,2% (b) .

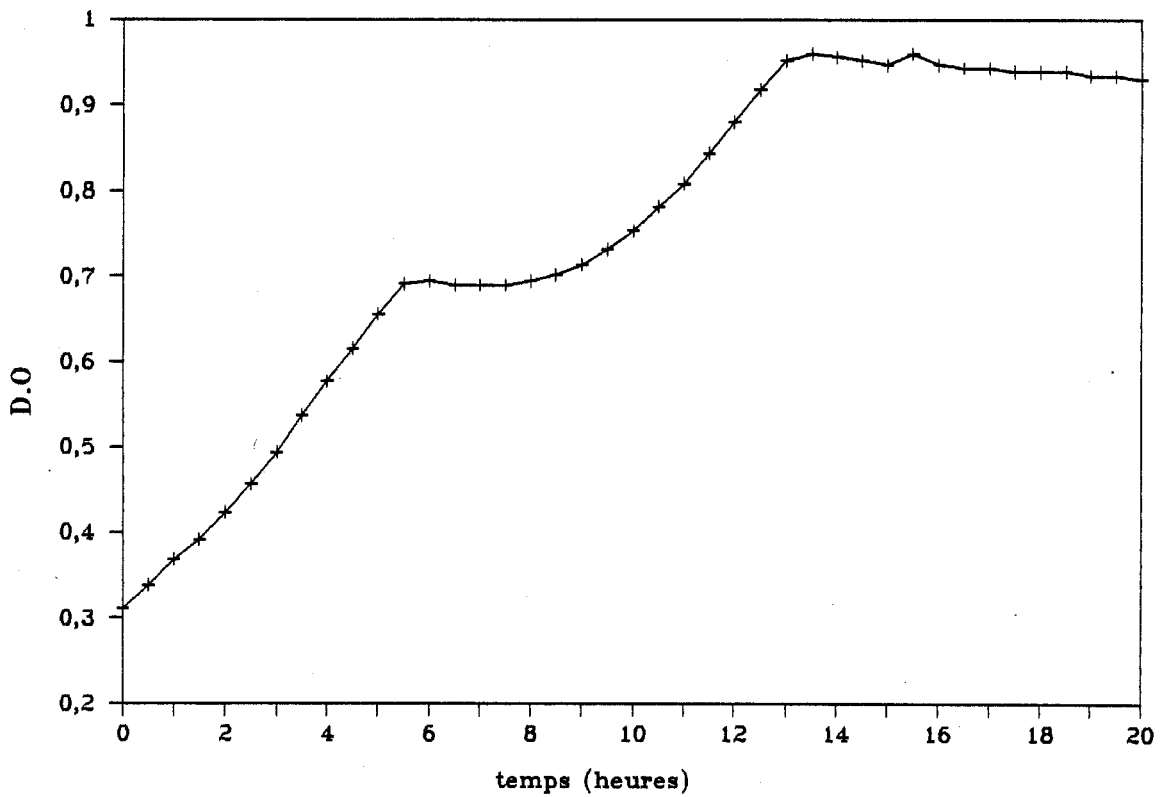


Fig. 11b : Croissance , mesurée au microbiomètre , de *R.meliloti* M5N1 sur RHB1 additionné de succinate et du glucose à 0,1% chacun .

concentration. Ceci montre qu'une petite quantité de glucose doit être utilisée simultanément avec le succinate. Ce phénomène de répression catabolique, très étudié chez *E. coli*, montre qu'il est AMPc-dépendant pour cette espèce (PERLMAN et coll., 1969 ; RICKENBERG, 1974 ; BOTSFORD, 1981 ; LILLMANN, 1985). Par contre, chez *Rhizobium*, le rôle de l'AMPc dans la levée de la répression est souvent mis en question (MERBERG et coll., 1983 ; McGETRICK et coll., 1985).

2.1.2. Effet du succinate sur l'utilisation des substrats carbonés

Afin de voir si le succinate a le même effet sur les sources de carbone ne permettant pas le développement du mutant 2.10, nous avons procédé à une étude systématique du comportement de la M5N1 vis-à-vis de ces différents substrats.

La souche a été cultivée sur milieu RHB1 en présence de succinate à la concentration limitante (1 g/l) et de chacun des substrats à tester à la même concentration.

Les résultats obtenus (Fig. 12, a, b, c) montrent que *R. meliloti* M5N1 développe des croissances diauxiques sur chacun des mélanges étudiés. Ceci suggère donc que l'utilisation des hexoses, des pentoses ou des polyols (au moins ceux testés) est soumise chez *R. meliloti* à une répression par le succinate. Remarquons que les durées des phases d'attentes intermédiaires sont plus ou moins longues selon le substrat utilisé. Ceci montre que la répression due au succinate n'est pas un phénomène du "tout ou rien". Certaines unités génétiques sont plus réprimées que d'autres.

2.1.3. Effet d'autres acides dicarboxyliques sur l'utilisation du glucose

Le fumarate et le malate, intermédiaires de cycles de Krebs et de structure proche du succinate, pourraient réprimer l'utilisation du glucose chez *R. meliloti*, comme le fait par exemple le malate chez *R. leguminosarum* RBL1 (DE VRIES et coll., 1982).

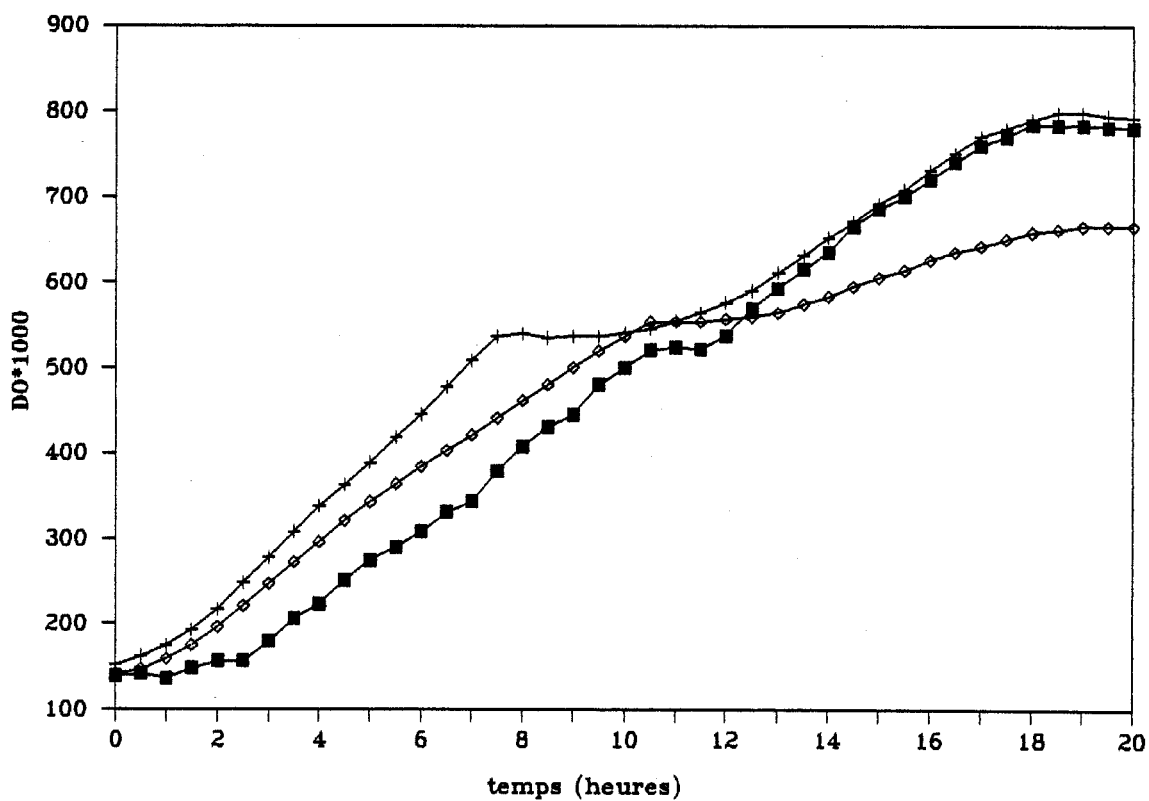


Fig. 12a : Croissance , mesurée au microbiomètre , de *R.meliloti* M5N1 sur RHB1 contenant du succinate de sodium à 1 g/l additionné de fructose à 1 g/l (■); de glucose à 1 g/l (+) ou de galactose à 1 g/l (◇).

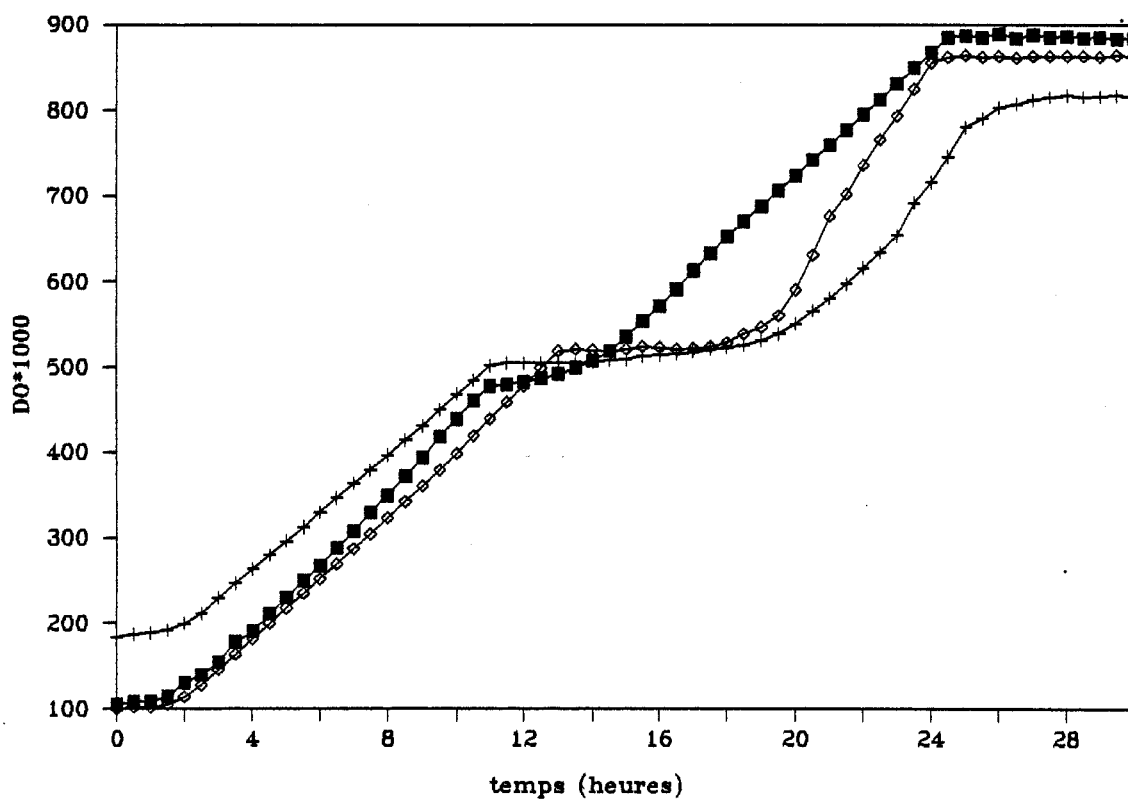


Fig. 12b : Croissance , mesurée au microbiomètre , de *R.meliloti* M5N1 sur RHB1 contenant du succinate de sodium à 1 g/l additionné de ribose à 1 g/l (■); de xylose à 1 g/l (+) ou d'arabinose à 1 g/l (◇).

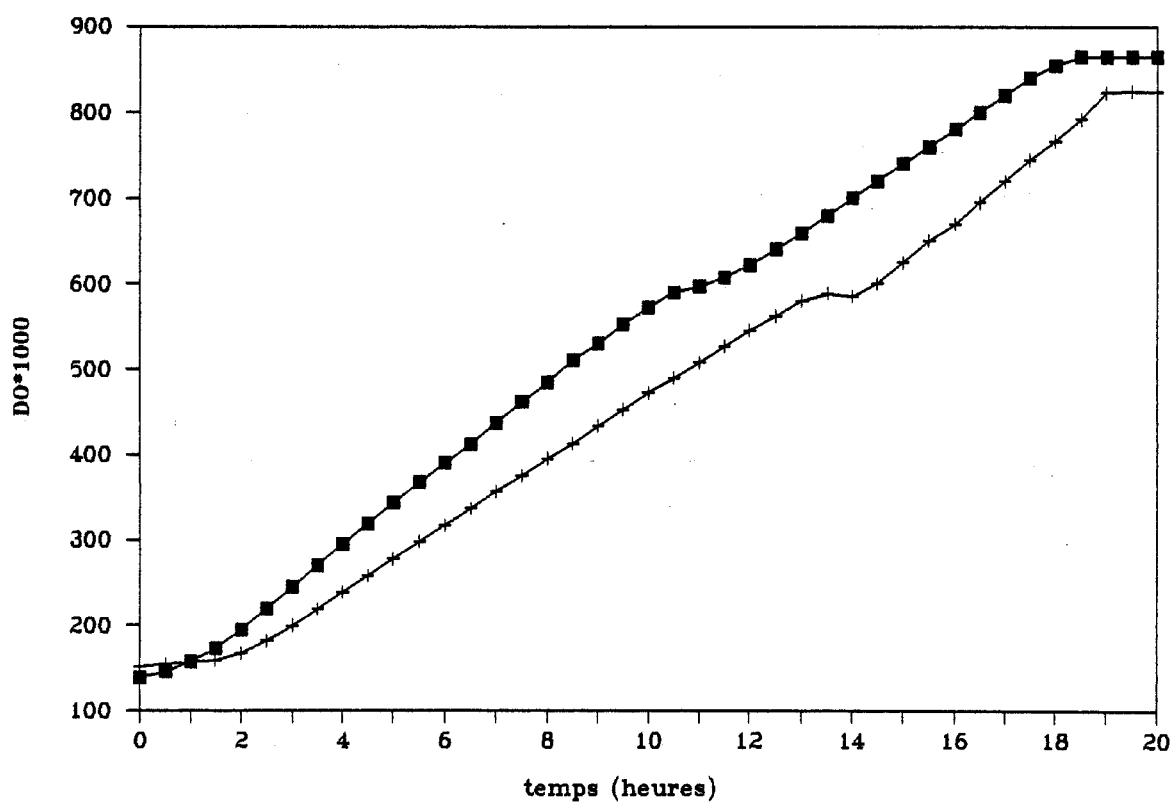


Fig. 12c : Croissance , mesurée au microbiomètre , de *R.meliloti* M5N1 sur RHB1 contenant du succinate de sodium à 1 g/l additionné de mannitol à 1 g/l (■) ou de sorbitol à 1 g/l (+) .

Nous constatons, en effet, que *R. meliloti* M5N1, cultivé sur un mélange de glucose (1 g/l), fumarate (1 g/l) ou glucose (1 g/l) malate (1 g/l), développe des croissances diauxiques (Fig. 13). Ceci indique que ces deux acides ont le même effet que le succinate. Cependant, il faut noter que les diauxies obtenues sont plus ou moins prononcées comparativement à celles obtenues avec le mélange succinate-glucose. Ceci indique que la répression exercée par ces deux acides est moins sévère et qu'une partie du glucose est utilisée simultanément avec l'acide dicarboxylique au cours de la première phase de croissance.

2.2. Mise en évidence du rôle de l'AMPc sur la levée de diauxie

2.2.1. Rappel

La répression des systèmes physiologiques de *Rhizobium* par des intermédiaires du cycle de Krebs a été déjà signalée par plusieurs auteurs. Mais la relation entre le niveau intracellulaire d'AMPc et la répression n'est pas encore bien élucidée. En effet, dans certains cas tel que le système de transport d'hydrogène de *B. japonicum*, la répression exercée par le succinate ou le malate est levée par l'AMPc exogène (McGETRICK et coll., 1985). Par contre, l'AMPc est sans effet ni sur le système d'accumulation de CO₂ de *Bradyrhizobium japonicum* inhibé par le succinate (McGETRICK, 1985), ni sur l'activité β -galactosidase réprimée par le même acide dicarboxylique chez *R. meliloti* (UCKER et SIGNER, 1978).

Dans notre travail, nous avons essayé de rechercher l'effet de l'AMPc exogène sur la diauxie développée par *R. meliloti* M5N1 cultivé sur un mélange de succinate et de glucose présent chacun à 0,1 % (P/V). Puis nous avons déterminé les conditions convenables d'utilisation de ce nucléotide par la souche de *R. meliloti* M5N1.

2.2.2. Conditions générales d'abolition de la diauxie

La croissance bactérienne a été suivie en microbiomètre (température 30°C, agitation 750 rpm), sur le milieu minimum RHBI additionné de succinate (1 g/l), de glucose (1 g/l) et d'AMPc à la concentration finale de 10 mM.

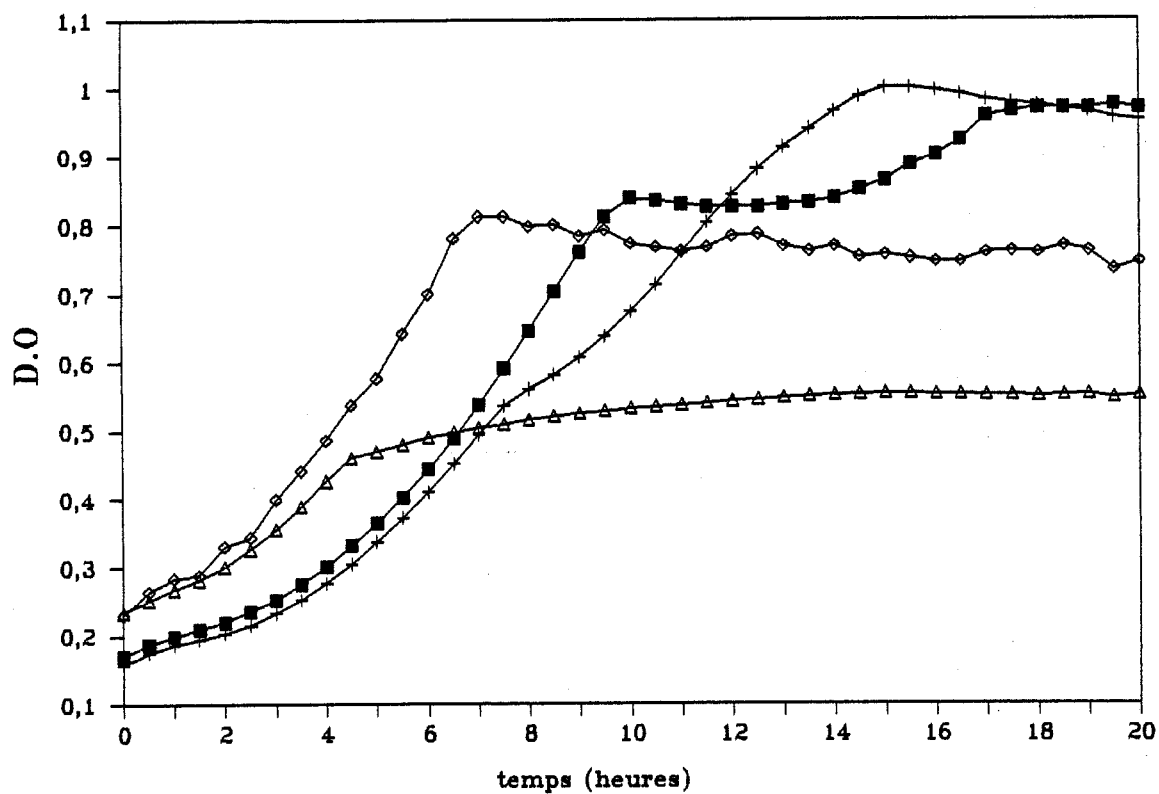


Fig.13 : Croissance , mesurée au microbiomètre , de *R.meliloti* M5N1 sur RHB1 contenant: fumarate(0,1%)+glucose(0,1%) [■] ; malate(0,1%)+glucose(0,1%) [+]; fumarate(0,1%) [◇]; malate(0,1%) [△].

Dans ces conditions, on n'observe pas de levée de diauxie (par l'AMPc à 10 mM). Nous avons ensuite pensé à faire varier la concentration finale de l'AMPc de 10 à 100 mM. Les résultats obtenus (Fig. 14) indiquent que cette molécule est sans effet dans les conditions expérimentales utilisées (température 30°C, agitation 750 rpm). Par contre, quand on varie l'agitation d'une culture bactérienne se développant sur le couple succinate-glucose à 0,1 % (P/V), chacun additionné d'AMPc à une concentration finale de 10 mM, on constate une disparition progressive de la diauxie (Fig. 15).

La mesure du coefficient du transfert en oxygène (KLa), dans les conditions d'agitation utilisées pour la levée de diauxie, est rapportée dans le tableau 14.

Notons que dans ces mêmes conditions d'agitation et en absence d'AMPc, la diauxie persiste.

Ces résultats montrent que le phénomène de la répression catabolique chez *R. meliloti* M5N1 est bien AMPc-dépendant ; mais l'utilisation de celui-ci nécessite une agitation convenable du milieu d'incubation.

2.3. Effet de l'addition de l'AMPc sur la croissance du mutant

Après avoir déterminé les conditions d'agitation convenables pour l'utilisation de l'AMPc par la souche sauvage M5N1, nous étudierons son effet sur le développement du mutant 2.10 et nous en déduirons la possibilité d'une mutation au niveau du gène responsable de la synthèse d'AMPc (gène *cya*).

La croissance du mutant 2.10 a été à nouveau suivie en microbiomètre sur milieu RHBI additionné de glucose à 10 g/l et de l'AMPc à la concentration finale de 10 mM dans les conditions d'abolition de la diauxie (température 30°C, agitation 1000 rpm). Après 24 h d'incubation, on constate que cet AMPc est sans effet sur la croissance du mutant 2.10.

2.4. Conclusion

Les études entreprises sur la régulation de l'utilisation des sources de carbone, chez les cellules libres de *Rhizobium*, ont permis de démontrer l'existence d'un phénomène semblable à la répression catabolique décrite chez

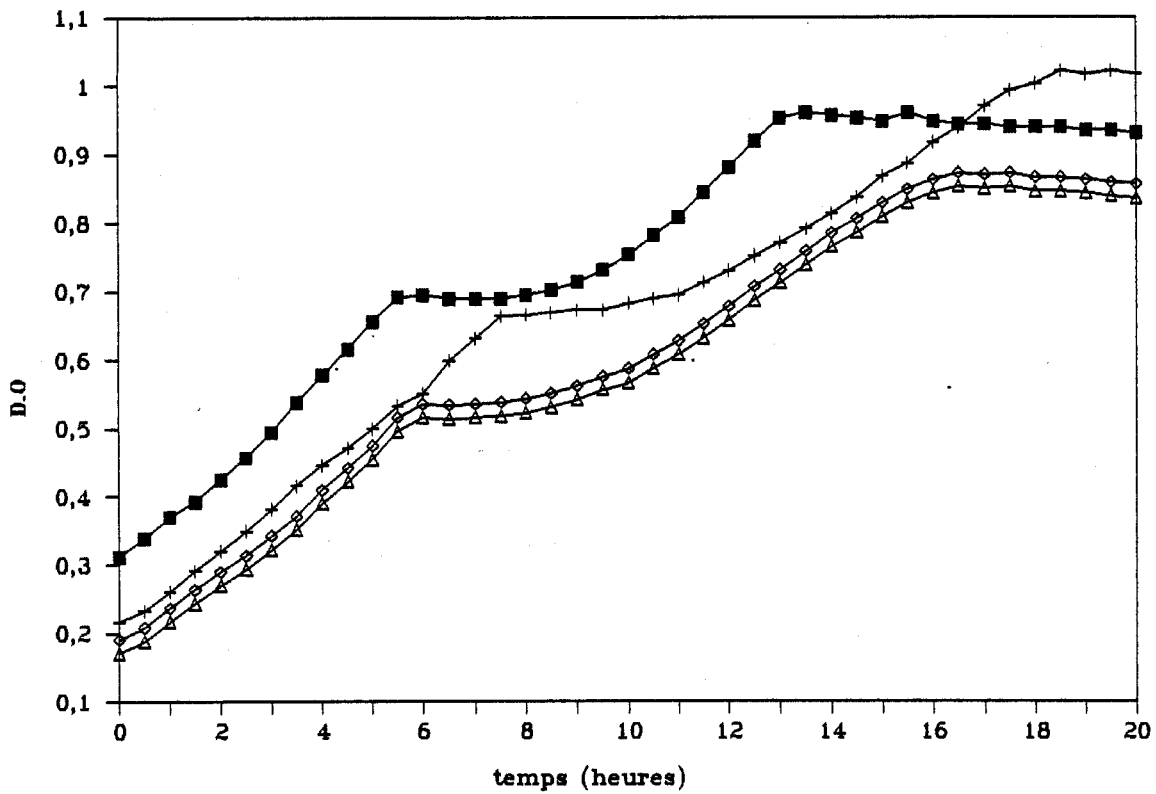


Fig.14 : Croissance de *R.meliloti* M5N1 sur RHB1 contenant du succinate de sodium (0,1%); du glucose (0,1%) et l'AMPc à différentes concentrations

■ SANS + 10mM ◇ 50mM △ 100mM

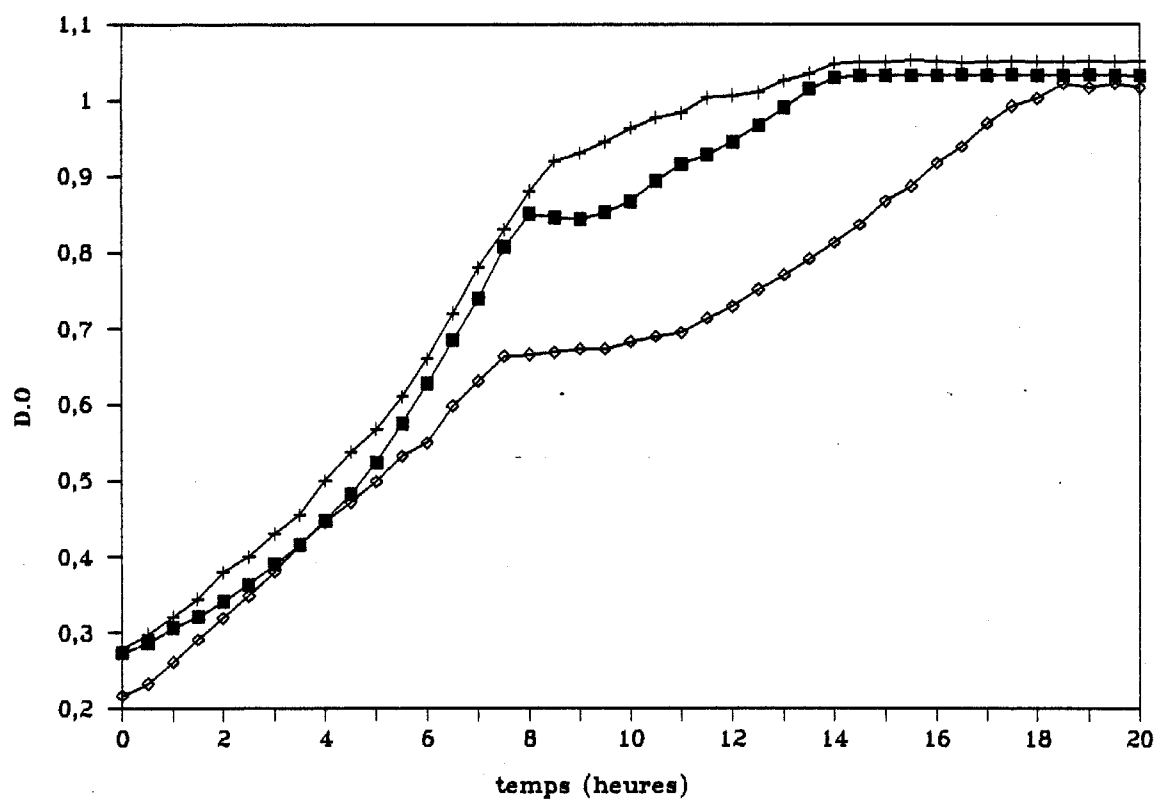


Fig.15 : Effet de l'agitation du milieu sur la croissance diauxique de *R.meliloti* M5N1 , cultivé sur RHB1 contenant du succinate de sodium (0,1%) et du glucose (0,1%) additionné d'AMPC à 10 mM

◇ 750rpm

■ 850rpm

+ 1000rpm

Vitesse d'agitation (rpm)	KLa (1/h)
750	66
850	216
1000	220

Tableau 14. Détermination du coefficient de transfert en oxygène (KLa)

E. coli. Cependant, les controverses concernant la levée du phénomène par l'addition de l'AMPc ainsi que la méconnaissance du mécanisme de régulation, ont fait que jusqu'alors les auteurs ont évité de parler du phénomène de la répression catabolique chez **Rhizobium**.

En partant de certains résultats déjà établis au Laboratoire, notamment le rôle du succinate comme répresseur de la synthèse de la glucose-perméase, nous avons, au cours de nos études sur les phénomènes de la croissance diauxique, montré que :

- le succinate réprime l'utilisation d'un certain nombre de substrats carbonés : hexoses, pentoses, polyols (au moins ceux testés) ;
- l'utilisation du glucose est inhibée par d'autres acides dicarboxyliques comme le fumarate et le malate.

Quant au rôle de l'AMPc dans l'abolition de la diauxie, nous avons recherché les conditions convenables d'utilisation de ce nucléotide et nous avons montré que la levée de la diauxie ne se fait en présence d'AMPc qu'en utilisant de bonnes conditions de transfert en oxygène. En effet, les diauxies développées par **R. meliloti** M5N1, cultivé sur un mélange de succinate (0,1 %, P/V) et de glucose (0,1 %, P/V) en présence d'AMPc à la concentration finale de 10 mM, disparaissent d'autant mieux que l'agitation du milieu de culture est importante. Ce résultat indique l'importance de l'agitation dans la levée de la répression en présence d'AMPc.

Nous avons, par la suite, appliqué les conditions favorables à l'utilisation d'AMPc à une culture du mutant 2.10 se développant sur un milieu minimum plus glucose à 1 % (P/V) additionné d'AMPc à 10 mM. L'absence de croissance, après 24 h d'incubation, nous laisse donc éliminer l'hypothèse d'une mutation au niveau du gène codant pour la synthèse de l'AMPc.

Comme nous l'avons signalé précédemment, le phénomène de la répression catabolique chez **E. coli** met en jeu deux partenaires, l'AMPc et la protéine CAP. Nous venons de voir que l'AMPc est sans effet sur la croissance du

mutant 2.10. Pour compléter cette étude, nous essayons, dans le chapitre suivant, de mettre en évidence l'existence chez *R. meliloti* d'un gène de régulation qui serait équivalent au gène crp d'*E. coli*. Pour cela, nous envisageons de compléter la souche d'*E. coli* CH208, altérée au niveau du gène crp, en utilisant l'ADN de la souche de *R. meliloti* M5N1.

III. - RECHERCHE DE L'EXISTENCE CHEZ R. MELILOTI D'UN GENE EQUIVALENT AU GENE crp D'E. COLI

3.1. Vecteur de clonage

Le pBR322 est l'un des vecteurs plasmidiques de clonage le plus utilisé chez *E. coli*. De petite taille (4,3 kb), amplifiable au chloramphénicol, il confère les résistances à l'ampicilline et à la tétracycline, et porte de nombreux sites uniques de clonage (BOLIVAR et coll., 1977). Sa séquence nucléotidique a été déterminée (BALBAS et coll., 1986).

La carte génétique de ce plasmide, comprenant en particulier les sites reconnaissables par les enzymes de restriction les plus courants, est représentée sur la figure 16.

Notons que la présence de sites de restriction uniques dans la région codant pour la résistance à un antibiotique (cas de BamHI pour la résistance à la tétracycline ou PstI pour la résistance à l'ampicilline) est une caractéristique très importante des vecteurs de clonage, car elle permet de suivre l'intégration d'un insert étranger. En effet, la présence d'un insert au milieu d'un gène de résistance à un antibiotique inactive celui-ci. Par exemple, dans le cas du pBR322 linéarisé par l'enzyme de restriction BamHI, les cellules ayant reçu un plasmide à "insert" sont résistantes à l'ampicilline et sensibles à la tétracycline ; les cellules ayant reçu un plasmide sans "insert" sont résistantes aux deux antibiotiques, et les cellules sans plasmides (non transformées) demeurent sensibles aux deux antibiotiques.

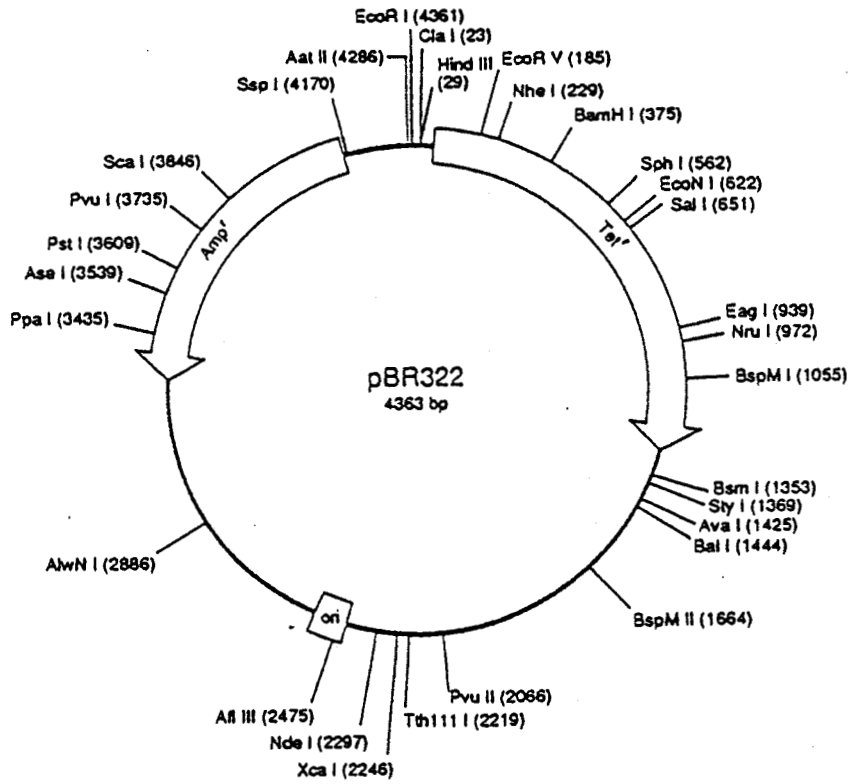


Fig.16 : Carte de restriction du pBR322.

3.2. Etapes de clonage (Fig. 17)

L'ADN chromosomique de *R. meliloti* M5N1 a été extrait et purifié selon la méthode de DHAESE et coll. (1979). Un échantillon de 30 µg a été partiellement digéré par Sau3AI (0,1 U/µg) afin d'avoir une bonne représentation statistique du génome. L'ADN chromosomique issu de cette digestion a ensuite été électro-élué sur un gel d'agarose à 0,6 %, suivant le protocole de la page 59, afin de ne conserver que les fragments d'ADN d'une taille comprise entre 3000 et 10.000 paires de bases. Ces tailles ont été choisies afin d'être sûr de sélectionner d'une part des fragments qui ne sont pas trop petits et qui sont donc susceptibles de contenir le gène recherché (s'il en existe un) ; d'autre part, afin d'éliminer les fragments de taille trop importante, et donc plus difficiles à faire entrer par transformation dans la bactérie réceptrice.

Parallèlement, le plasmide pBR322 a été extrait de la souche d'*E. coli* HB101, purifié par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium puis digéré par l'endonucléase BamHI, dont le site de coupure se situe sur le gène de résistance à la tétracycline. Les fragments du vecteur, linéarisé par BamHI, ont été déphosphorylés puis mis en présence avec l'ADN chromosomique partiellement digéré par Sau3AI. La quantité d'ADN chromosomique était cinq fois supérieure à celle du vecteur.

Après ligature pendant une nuit à 15°C, en utilisant deux unités de ligase du phage T4, le produit de ligature obtenu est utilisé pour transformer la souche d'*E. coli* CH208 déficiente au niveau du gène crp.

3.3. Transformation de la souche d'E. coli CH208 : Δ crp

Au cours de la transformation proprement dite, nous n'avons pas réussi à obtenir des transformants avec le plasmide hybride. Ceci est probablement dû aux systèmes de restriction de la souche réceptrice. C'est pour cela que nous avons d'abord procédé à la transformation de la souche d'*E. coli* CH208 par le plasmide seul (c'est-à-dire sans insert) et sur le peu de colonies obtenues (une dizaine), nous avons à nouveau extrait le plasmide (pBR322), purifié, digéré par BamHI, puis ligaturé avec les fragments d'ADN chromosomique de *R. meliloti* M5N1 partiellement digéré par Sau3AI.

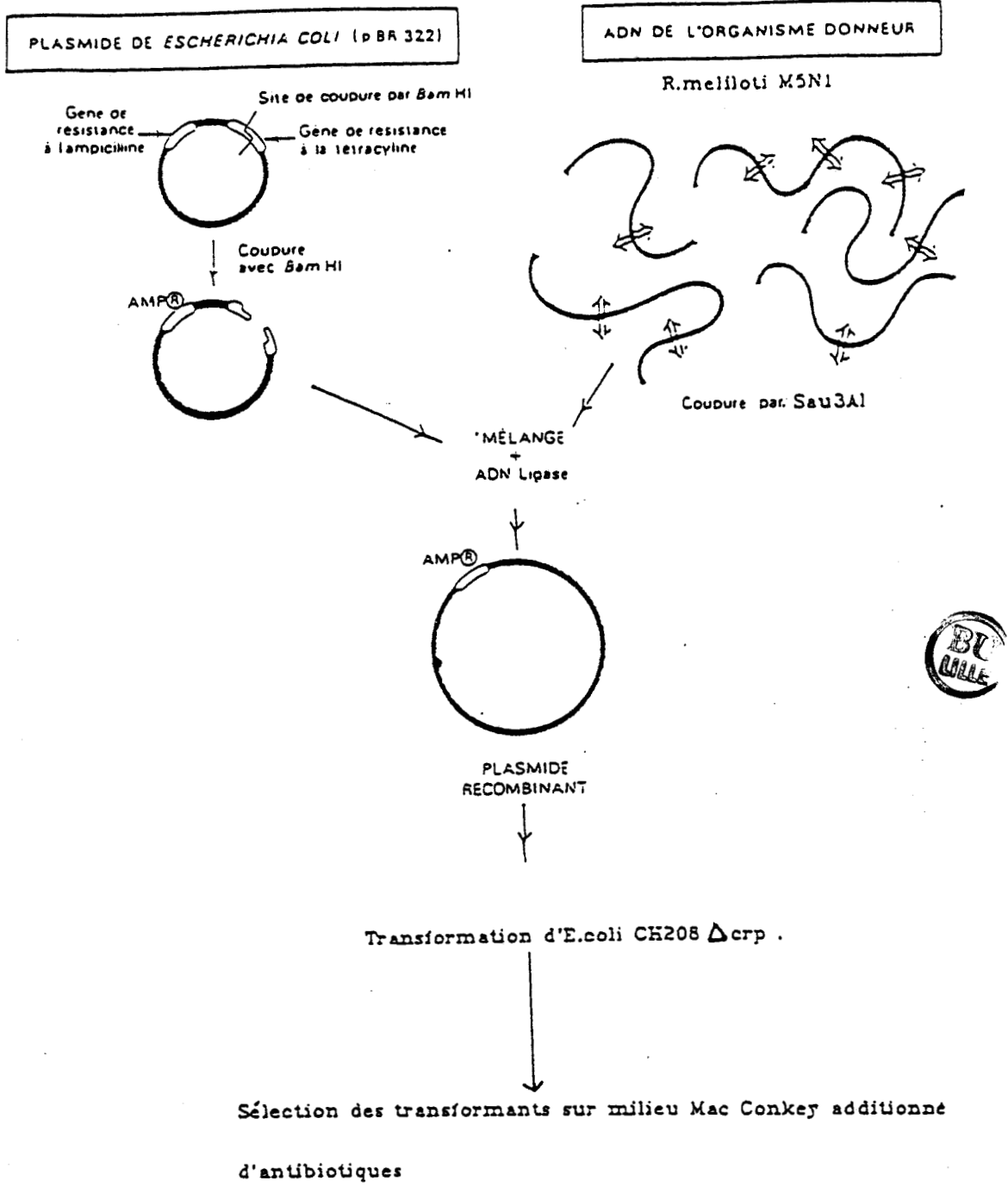


Fig.17 : Propagation d'un fragment d'ADN dans *E. coli* à l'aide du plasmide pBR322

Ensuite, l'ADN a été introduit par transformation vers la souche d'*E. coli* CH208, rendue compétente par traitement au CaCl_2 , après avoir apporté quelques modifications à la technique habituelle de transformation, notamment : une augmentation du nombre de chocs thermiques successifs et du temps d'incubation des bactéries réceptrices (en vue d'expression des plasmides hybrides reçus).

3.4. Criblage des transformants

3.4.1. Sélection des clones positifs

La sélection directe des Crp^+ est effectuée par étalement des bactéries issues de la transformation sur le milieu MacCONKEY additionné de maltose à 1 % et renfermant 100 $\mu\text{g/ml}$ de Sm (ou Km) et 75 $\mu\text{g/ml}$ d'Ap. Les bactéries sucres⁺ seront rouges et les bactéries sucres⁻ resteront blanches. En effet, l'acidification provoquée par l'utilisation du sucre (maltose) entraîne à l'endroit où la colonie a poussé un changement de couleur (Photo 3, a, b, c).

Parallèlement, nous avons fait des étalements des cultures bactériennes transformées sur du milieu Luria + Sm (100 $\mu\text{g/ml}$) + Ap (75 $\mu\text{g/ml}$) et les colonies isolées ont été repiquées sur du Luria + Tc (10 $\mu\text{g/ml}$) et seules les bactéries cultivant sur Ap, Sm et pas sur Tc ont été testées pour leur capacité à fermenter le maltose sur le milieu MacCONKEY.

Après une nuit d'incubation, quatre colonies rouges, Ap^r , Sm^r et Tc^s sont apparues.

Ce résultat indique que la souche CH208 Crp^- aurait acquis un gène de *R. meliloti* M5N1 qui serait équivalent au gène crp.

3.4.2. Vérification des souches

Pour les quatre clones positifs, nous avons voulu vérifier qu'il s'agissait bien de la souche d'*E. coli* CH208 que l'on avait transformée. Pour cela, des extractions de l'ADN total des clones et de deux souches témoins (HB101 porteuse du plasmide pBR322 et CH208 transformée avec le pBR322 seul)

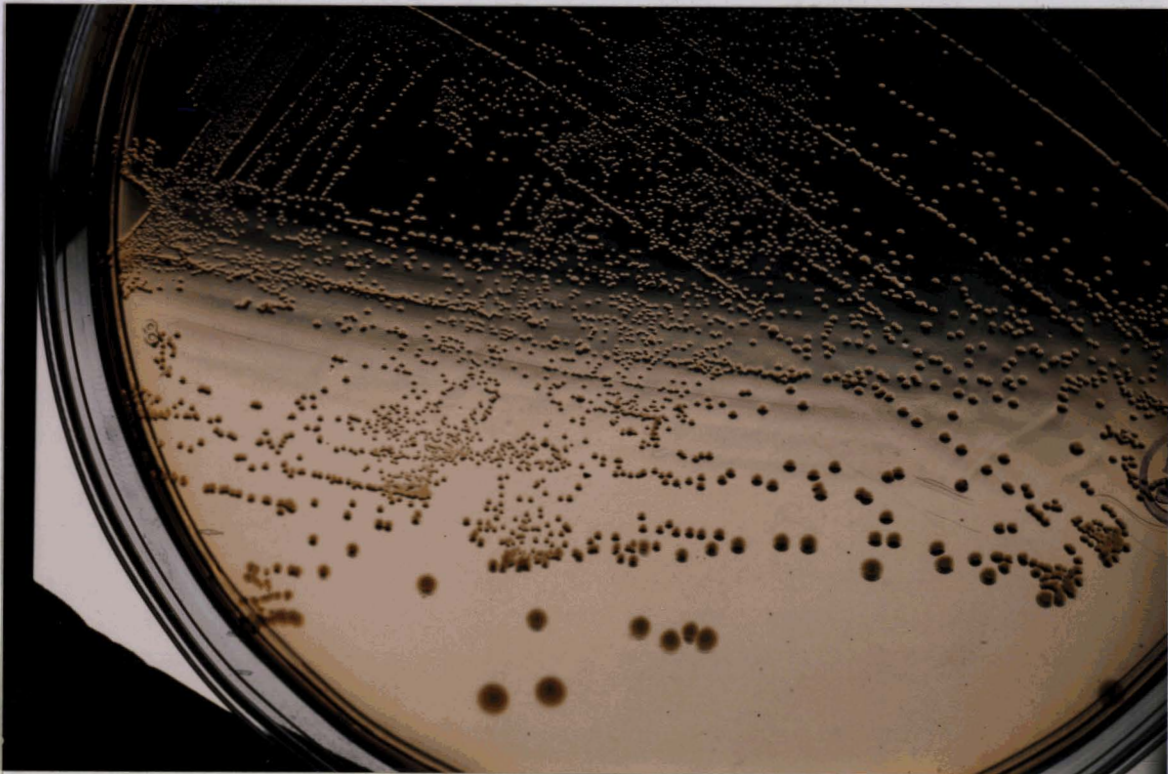


Photo.3a : Isolement d'E.coli CH208 sur milieu MacConkey additionné de maltose.

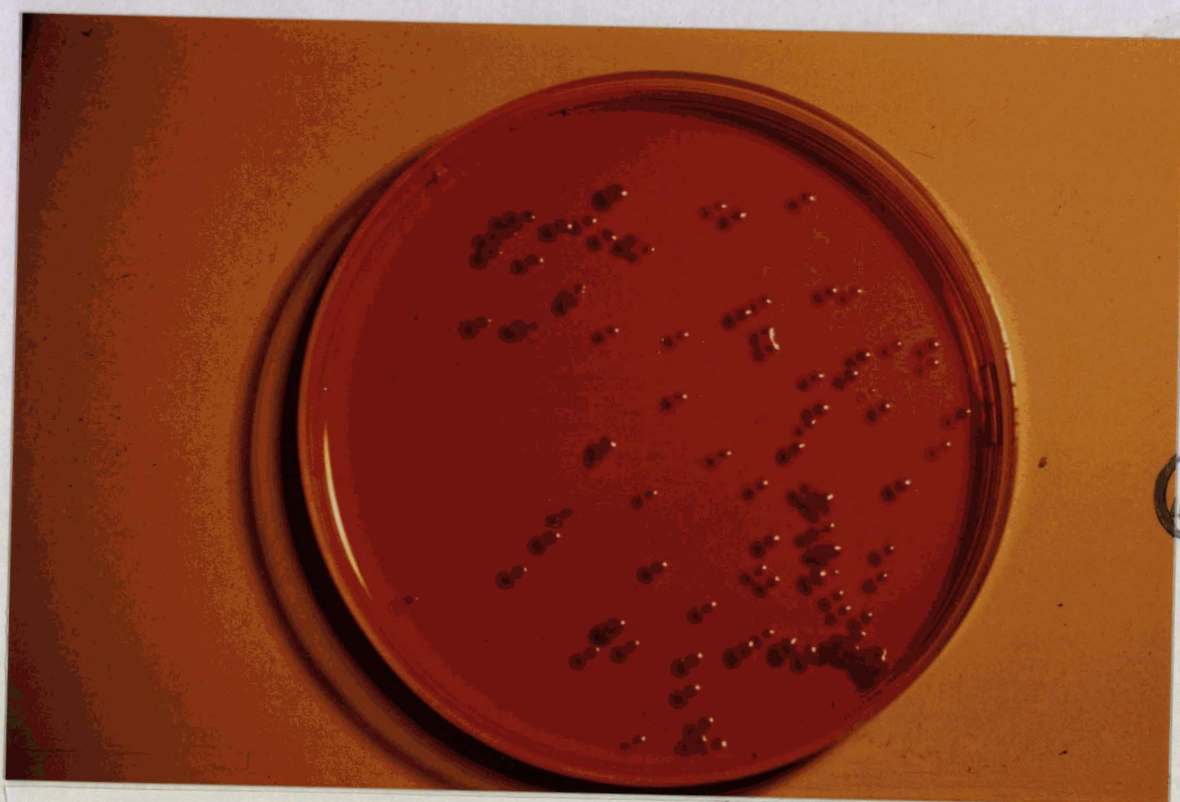


Photo.3b : Isolement du transformant sur milieu MacConkey
additionné de maltose.

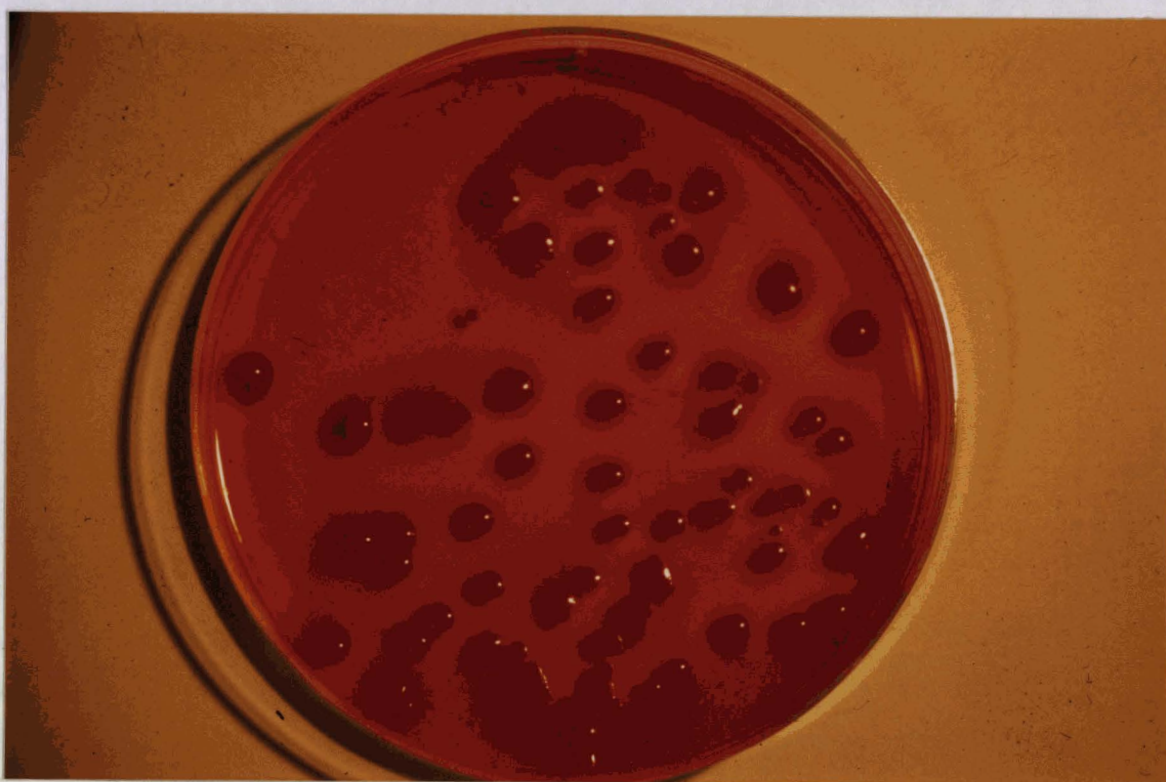


Photo.3c : Isolement d'E.coli HB101 sur milieu MacConkey additionné de maltose.

ont été effectuées. Ensuite, des digestions totales par l'endonucléase de restriction HindIII ont permis de comparer par électrophorèse en gel d'agarose les profils de restriction des clones et des souches témoin.

Sur la photo 4, nous pouvons constater que les différents profils sont identiques à part la bande plasmidique qui se situe, dans le cas des clones positifs, légèrement au-dessous de la bande de 4361 paires de bases du témoin lambda et qui correspond à la position du pBR322 sous forme linéaire. Ceci suggère que le plasmide a subi une délétion au cours des manipulations de la transformation.

3.5. Analyse des plasmides recombinants

La présence d'une délétion sur les plasmides hybrides complique la détermination de la taille de l'insert ainsi que l'établissement de sa carte de restriction.

Nous avons malgré cela effectué un certain nombre de digestions enzymatiques avec les endonucléases de restriction, qui sont à notre disposition, afin de voir si l'insert contient des sites de restriction et par la suite d'établir une carte au moins partielle de l'insert.

Les enzymes choisis pour les digestions de l'ADN plasmidique coupent le pBR322 en un seul point. Il s'agit de Aval, BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI, PvuII et Sall. Les plasmides ont été extraits par la technique de GROSVELD et coll. (1982) puis des digestions simples et doubles, partielles et totales ont été effectuées afin de connaître les tailles des différents fragments et leurs positions respectives. Les tailles sont déterminées par analyse de régression linéaire par rapport aux témoins de poids moléculaire que sont l'ADN du phage lambda digéré par HindIII ou HindIII + EcoRI.

Quand on introduit des fragments digérés par l'enzyme Sau3AI dans un site BamHI, nous avons une chance sur quatre de retrouver ce site BamHI.

Les digestions par cet enzyme ont été effectuées afin de savoir si un ou deux sites BamHI ont été reconstitués et si l'on pouvait ressortir en entier le



Photo.4: Profils de digestion des transformants par HindIII

1 et 8 = λ HindIII

2 = HB101/Hind111 (Témoin)

3,4,5 et 6 = Transformants/Hind111

7 = CH208/Hind111 (Témoin)

fragment inséré. Comme on peut le voir sur la photo 5, le plasmide du transformant n'est pas coupé par BamHI. D'autres profils de digestion sont représentés dans les photos 6, 7, 8 et 9.

Ces profils de digestion nous ont permis d'établir la carte de restriction présentée en figure 18.

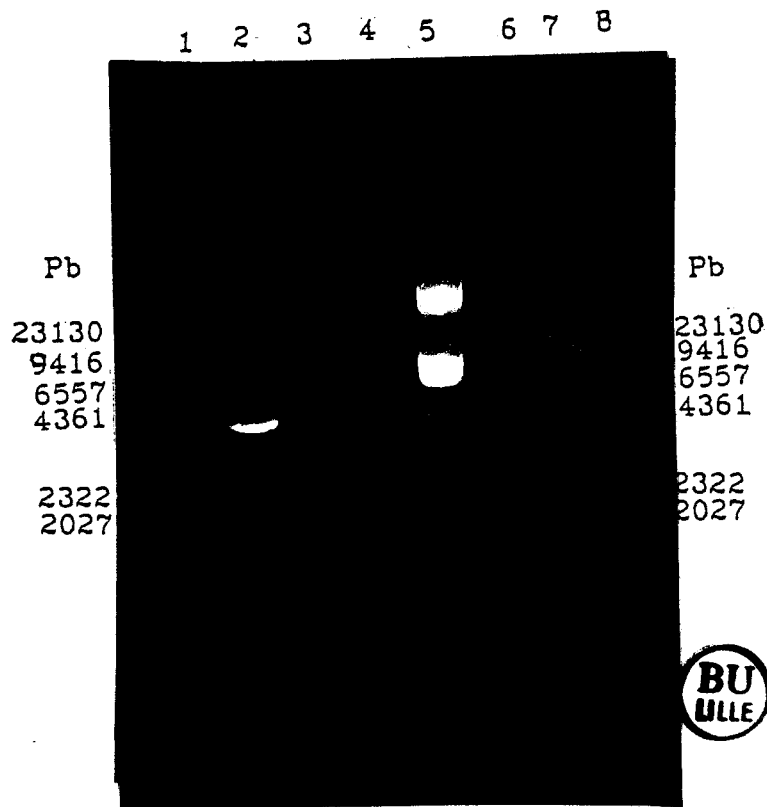


Photo. 5 : Profils de digestion du plasmide hybride par différents enzymes de restriction

1 et 8 = λ /HindIII

2,3,4 = pBR322 digéré respectivement par AvaI, BamHI, SalI

5,6,7 = Plasmide hybride digéré respectivement par AvaI, BamHI

et SalI

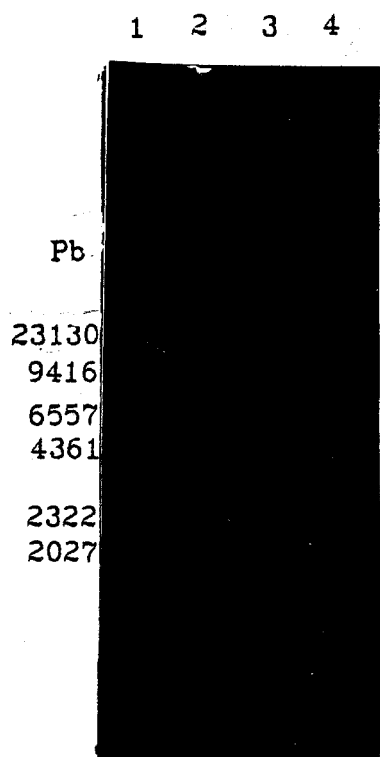


Photo. 6 : Profils de digestion du plasmide hybride par différents enzymes de restriction

1 = λ /HindIII

2 = Plasmide hybride /EcoR1

3 = Plasmide hybride /HindIII

4 = Plasmide hybride /PvuII

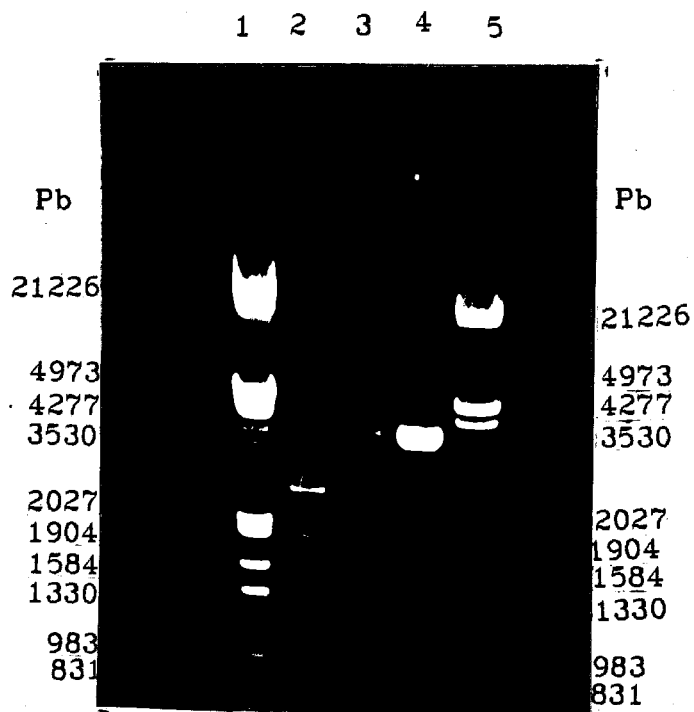


Photo. 7 : Profils de doubles digestion du plasmide hybride.

1 et 5 = λ /EcoR1+HindIII

2 = HindIII+pvuII

3 = HindIII

4 = PvuII

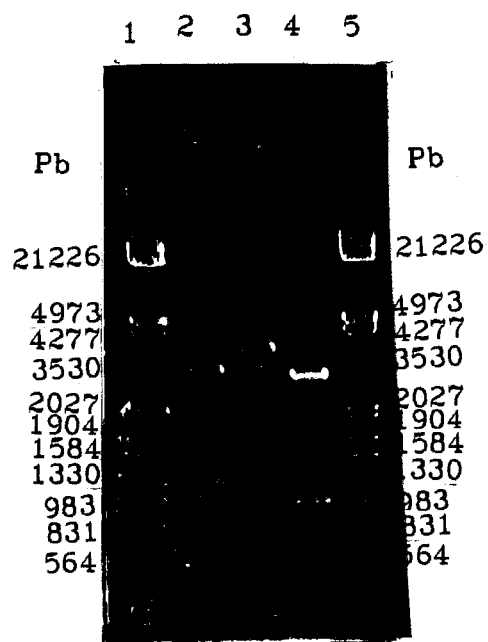


Photo. 8 : Profils de doubles digestion du plasmide hybride

1 et 5 = λ /EcoR1+HindIII

2 = Pst1

3 = EcoRV

4 = Pst1+EcoRV

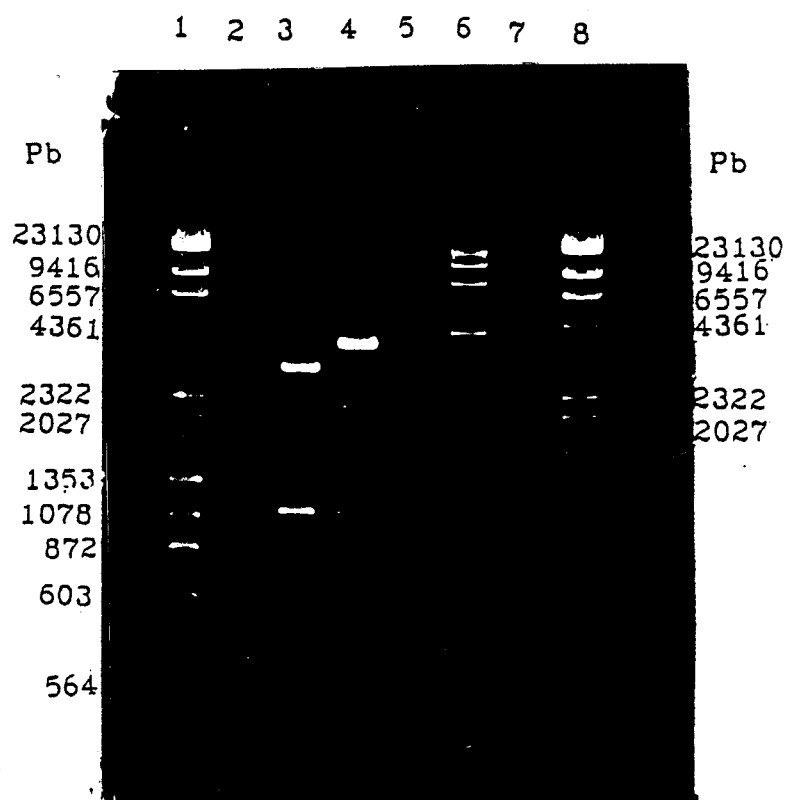


Photo. 9 : Profils de simples et doubles digestion du pBR322 et du plasmide hybride

1 = λ /HindIII + ϕ x174/HaeIII

2 = pBR322/PstI

3 = Plasmide hybride/PstI

4 = pBR322/BamHI+EcoRI

5 = Plasmide hybride/BamHI+EcoRI

6 = Plasmide hybride/BamHI

7 = pBR322/BamHI

8 = λ /HindIII

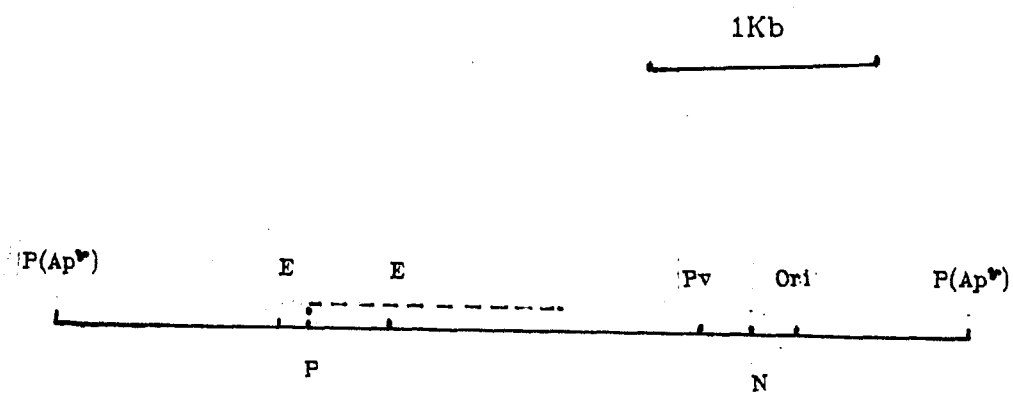


Fig. 18. Carte de restriction du plasmide hybride

E= EcorV

N= NdeI

Ori= Origine de répllication

P= PstI

Pv= PvuII

La localisation présumée de l'insert est représentée
en pointillés

IV. - CONCLUSION

Par des expériences de complémentation de la souche d'*E. coli* CH208, nous avons montré que *R. meliloti* possède un gène qui serait équivalent au gène crp d'*E. coli*.

Le plasmide hybride a subi une délétion. Il est donc difficile de déterminer la taille exacte de l'insert ainsi que d'établir sa carte génétique. Néanmoins, et par l'étude des digestions enzymatiques simples et doubles, nous pouvons conclure que :

- l'insert contient au moins deux sites de restriction (un site PstI et un site EcoRV) ;
- la délétion s'étend du site BamHI (site du clonage) jusqu'au site PvuII.

CONCLUSION GENERALE

ET

PERSPECTIVES

Le travail que nous avons réalisé a consisté à isoler et à étudier des mutants métaboliques obtenus par l'insertion du transposon Tn5 dans le génome de *R. meliloti* M5N1.

La transposition a été effectuée entre la souche d'*E. coli* WA803, porteuse du plasmide suicide pGS9, lequel contient le transposon Tn5, et la souche de *R. meliloti* M5N1.

La fréquence de transposition obtenue est de $1,3 \cdot 10^{-6}$.

L'étude de ces mutants montre :

- qu'ils sont incapables de croître sur un grand nombre de substrats carbonés : glucose, fructose, galactose, mannitol, sorbitol, xylose, arabinose.... ;
- qu'ils cultivent sur succinate, fumarate, malate, lactate, glutamate ;
- qu'ils induisent des nodules sur les plantules de Luzerne.

La suite des études, réalisée sur un mutant nommé 2.10, montre que :

- le profil de digestion d'ADN total de celui-ci ne présente pas de variations sensibles par rapport à celui de la souche sauvage M5N1 ;
- les essais de fixation d'azote ont révélé une symbiose efficace lors de l'inoculation des plantules de Luzerne par le mutant 2.10. Ceci indique que la capacité de *R. meliloti* à utiliser des sources de carbone, tels que les hexoses (glucose, fructose, galactose), les hexitols (mannitol, sorbitol) ou les pentoses (xylose, ribose), n'est essentielle ni pour la nodulation ni pour la fixation d'azote atmosphérique ;
- la réversion, réalisée sur le milieu RHB1 glucosé, a permis d'isoler des souches qui retrouvent la capacité de croître sur les autres hexoses, pentoses ou polyols testés. Par contre, elles ont gardé le caractère de résistance à la streptomycine et à la kanamycine : on parle de pseudo-

révertants. La mesure de l'efficacité de ces souches indique qu'elles sont incapables de fixer l'azote. Ceci est probablement dû à une retransposition du Tn5 vers l'un des gènes intervenant dans la fixation d'azote.

La nature de la mutation n'a pas été déterminée de façon précise. Nous avons envisagé, d'après les propriétés de croissance et la fréquence de réversion élevée obtenue, que la mutation ait touché un gène de régulation contrôlant de façon simultanée plusieurs activités.

Les résultats, déjà publiés sur la régulation chez *E. coli*, montrent que cette bactérie possède un système de contrôle type répression catabolique : système faisant intervenir l'AMPc et la protéine CAP.

Chez *Rhizobium*, les études réalisées dans ce domaine indiquent l'existence d'un phénomène semblable à la répression catabolique. Cependant, le rôle de l'AMPc dans la levée de répression est discutable selon les auteurs (UCKER et SIGNER, 1978 ; McGETRICK et coll., 1985). Ceci nous a amené à étudier ce phénomène de répression afin d'examiner une éventuelle mutation au niveau du gène codant pour la synthèse de l'AMPc (gène cya).

En se basant sur un résultat, déjà établi au Laboratoire, démontrant que le succinate réprime la synthèse de la glucose-perméase, nous avons montré que :

- d'autres acides dicarboxyliques, tels que le fumarate et le malate, inhibent l'utilisation du glucose chez *R. meliloti* M5N1 ;
- le succinate réprime l'utilisation d'autres substrats carbonés (fructose, mannitol, arabinose, xylose, ribose, galactose).

Quant à l'intervention ou non de l'AMPc dans la levée de la répression, nous avons montré que la disparition de la diauxie est bien AMPc-dépendante, mais l'utilisation de ce nucléotide nécessite un bon transfert en oxygène.

L'addition de l'AMPc à une culture du mutant 2.10 (dans les conditions d'utilisation d'AMPc pour la souche sauvage M5N1) montre que cette molécule

est sans effet sur la croissance de notre mutant. Ceci nous a amené à examiner l'hypothèse d'une altération au niveau du gène crp : gène codant pour la synthèse de la protéine CAP. Or cette protéine, à notre connaissance, n'a jamais été étudiée chez *Rhizobium*, c'est pour cela que nous avons d'abord procédé à la recherche d'un gène de *R. meliloti* M5N1 qui serait équivalent au gène crp d'*E. coli*.

En utilisant la souche d'*E. coli* CH208, ayant subi une délétion au niveau du gène crp (donc ne produisant pas de protéine CAP fonctionnelle), nous avons montré, pour la première fois, l'existence chez *R. meliloti* M5N1 d'un gène qui jouerait le rôle du gène crp d'*E. coli*.

Malheureusement, la délétion subie par le plasmide portant ce gène rend délicate la détermination de la taille exacte de l'insert. Néanmoins, l'ensemble des digestions enzymatiques réalisées nous a permis de mettre en évidence au moins deux sites de restriction sur l'insert (1 site PstI et 1 site EcoRV).

Ces études doivent permettre de faire un sous-clonage de l'insert dans un plasmide s'exprimant chez *Rhizobium*, par exemple le pRK290, puis transfert du plasmide hybride chez le mutant 2.10 afin de compléter la mutation au niveau du gène de la régulation.

Par ailleurs, certains auteurs ont montré que la présence de succinate dans le milieu de croissance provoque la déformation de *Rhizobium* (URBAN et coll., 1982, URBAN et coll. 1984 ; REDIN et LEPO, 1989). GARDIOL et coll. (1987) observent qu'en présence de succinate, la consommation de l'oxygène est très élevée et la microaérobiose résultante engendre un pléiomorphisme des cellules. Cette caractéristique a été observée *in vitro* par HORNEZ (comm. pers.) mais s'observe aussi *in vivo* (HORNEZ et coll., 1974).

Dans cette perspective, on pourrait envisager l'étude du rôle de la pression partielle en oxygène, lié ou non à la présence de succinate dans le phénomène de la symbiose.

BIBLIOGRAPHIE

- ALI H., M. BECHET, C. NIEL and J.B. GUILLAUME
Rhizobium meliloti Tn5 induced-auxotrophic mutants responding to different biosynthetic intermediates.
Can. J. Microbiol., 1984, 30 : 507-511.

- ALI H., M. BECHET and J.B. GUILLAUME
The occurrence of genetic rearrangements in **Rhizobium meliloti** 444 after introduction of suicide plasmid pSP601.
Microbios, 1989, 57 : 137-150.

- ARIAS A. and G. MARTINEZ-DRETS
Glycerol metabolism in **Rhizobium**.
Can. J. Microbiol., 1976, 22 : 150-153.

- ARIAS A., C. CERVENANSKY, A. GARDIOL and G. MARTINEZ-DRETS
Phosphoglucose isomerase mutant of **Rhizobium meliloti**.
J. Bacteriol., 1979, 137 : 409-414.

- ARIAS A., A. GARDIOL and G. MARTINEZ-DRETS
Transport and catabolism of D-mannose in **Rhizobium meliloti**.
J. Bacteriol., 1982, 151 : 1069-1072.

- ARIAS A. and C. CERVENANSKY
Galactose metabolism in **Rhizobium meliloti** L5-30.
J. Bacteriol., 1986, 167 : 1092-1094.

- AVISSAR Y.J. and K.D. NADLER
Stimulation of tetrapyrrole formation in **Rhizobium japonicum** by restricted aeration.
J. Bacteriol., 1978, 135 : 782-789.

- BALBAS P., X. SOBERON, E. MERINO, M. ZURITA, H. LOMELI, F. VALLE, N. FLORES and F. BOLIVAR
Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives- a review.
Gene, 1986, 50 : 3-40.

- BANFALVI Z., V. SAKANYAN, C. KONEZ, A. KISS, I. DUSHA and A. KONDOROSI
Location of nodulation and nitrogene fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*.
Mol. Gen. Genet., 1981, 184 : 318-325.

- BERG D.E., R. JORGENSEN and J. DAVIES
Transposable kanamycin-neomycin resistance determinants.
In : "Microbiology". Schlessinger D. (ed.), Amer. Soc. Micro., Wash D.C., 1978, pp. 13-15.

- BERG D.E., A. WEISS and L. CROSSLAND
Polarity of Tn5 insertion mutations in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 1980, 142 : 439-446.

- BERG D.E., L. JOHNSRUD, L. McDIVITT, R. RAMABHADRAN and B.J. HIRSCHL
Invertead repeats of Tn5 are transposable elements.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79 : 2632-2635.

- BERG D.E., M.A. SCHMANDT and J.B. LOWE
Specificity of transposon Tn5 insertion.
Genetics, 1983, 105 : 813-828.

- BERG D.E., J. LODGE, C. SASAKAWA, D.K. NAG, S.H. PHADNIS, K. WESTON-HAFER and G.F. CARLE
Transposon Tn5 : specific sequence recognition and conservative transposition.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1984, pp. 215-225.

- BERINGER J.E., J.L. BEYNON, A.V. BUCHANAN-WALLASTON and A.W.B. JOHNSTON
Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*.
Nature, 1978, 276 : 633-634.

- BERRY J.O. and A.G. ATHERLY
Induced plasmid-genome rearrangements in *Rhizobium japonicum*.
J. Bacteriol., 1984, 157 : 218-224.

- BIRKENHEAD K., S.S. MANIAN and F. O'GARA
Dicarboxylic acid transport in *Bradyrhizobium japonicum* : use of *Rhizobium meliloti* det gene(s) to enhance nitrogen fixation.
J. Bacteriol., 1988, 170 : 184-189.

- BOLIVAR F., R.L. RODRIGUEZ, P.J. GREENE, M.C. BETLACH, H.L. HEYNEKER, H.W. BOYER, J.H. CROSA and S. FALKOW
Construction and characterization of new cloning vehicles. II - A multi-purpose cloning system.
Gene, 1977, 2 : 95-113.

- BOLTON E., B. HIGGISSON, A. HARRINGTON and F. O'GARA
Dicarboxylic acid transport in *Rhizobium meliloti* : isolation of mutants and cloning of dicarboxylic acid transport genes.
Arch. Microbiol., 1986, 144 : 142-146.

- BOTSFORD J.L.
Cyclic nucleotides in procaryotes.
Microbiol. Rev., 1981, 45 : 620-642.

- BRICKMAN E., L. SOIL and J. BECKWITH
Genetic characterization of mutations which affect catabolite-sensitive operons in *Escherichia coli*, including deletions of the gene for adenyl cyclase.
J. Bacteriol., 1973, 116 : 582-587.

- CASADESUS J., E. LANEZ and J. OLIVARES
Transposition of Tn1 to the *Rhizobium meliloti* genome.
Mol. Gen. Genet., 1980, 180 : 405-410.

- CERVENANSKY C. and A. ARIAS
Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in pleiotropic carbohydrate negative mutant strains of **Rhizobium meliloti**.
J. Bacteriol., 1984, 160 : 1027-1030.

- CHAKRABARTI S.K., A.K. MISHRA and P.K. CHAKRABARTTY
Metabolism of glucose and gluconate in fast- and slow-growing Rhizobia.
Phytochem., 1987, 26 : 85-87.

- CHRISTENSEN A.H. and K.R. SCHUBERT
Identification of a **Rhizobium trifolii** plasmid coding for nitrogen fixation and nodulation genes and its interaction with pJB5J1, a **Rhizobium leguminosarum** plasmid.
J. Bacteriol., 1983, 156 : 592-599.

- CHUNG C.T. and R.H. MILLER
A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells.
Nucl. Acids Res., 1988, 16 : 3580.

- COOPER C.M., G.A. FERNSTROM and S.A. MILLER
Performance of agitated gas-liquid contractors.
Indust. Eng. Chem., 1944, 36 : 509-513.

- CORNELIS G., D. GHOSAL and H. SAEDLER
Tn951 : a new transposon carrying a lactose operon.
Mol. Gen. Genet., 1978, 160 : 215-224.

- CORNELIS G., H. SOMMER and H. SAEDLER
Transposon Tn951 (Tn lac) is defective and related to Tn3.
Mol. Gen. Genet., 1981, 184 : 241-248.

- COURTOIS B., J.P. HORNEZ et J.C. DERIEUX
Mise en évidence d'une propriété métabolique de **Rhizobium meliloti** utilisable pour sa classification.
Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 1983, 134A : 141-147.

- DE GUNZBURG J.
Le mode d'action de l'AMPcyclique chez les procaryotes et les eucaryotes, CAP et protéine kinases AMPc dépendantes.
Biochimie, 1985, 67 : 563-582.

- DE LEY J. and M. DOUDOROFF
The metabolism of D-galactose in *Pseudomonas saccharophila*.
J. Biol. Chem., 1957, 227 : 745-757.

- DE LEY J. and A. RASSEL
DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*.
J. Gen. Microbiol., 1965, 41 : 85-91.

- DENARIE J.
Une mutation provoquant l'auxotrophie pour l'adénine et la perte du pouvoir fixateur d'azote chez *Rhizobium meliloti*.
C. R. Acad. Sci. Paris, 1969, 269 : 2464-2466.

- DENARIE J., G. TRUCHET and B. BERGERON
Effects of some mutations on symbiotic properties of *Rhizobium*.
In : "Symbiotic nitrogen fixation in plants". Nutman D.S. (ed.), Cambridge University Press, 1976, pp. 3-24.

- DE VOS G.F., T.M. FINAN, E.R. SIGNER and G.C. WALKER
Host-dependent transposon Tn5- mediated streptomycin resistance.
J. Bacteriol., 1984, 159 : 395-399.

- DE VRIES G.E., A.A.N. VAN BRUSSEL and A. QUISPTEL
Mechanism and regulation of glucose transport in *Rhizobium leguminosarum*.
J. Bacteriol., 1982, 29 : 398-406.

- DHAESE P., H. DE GREVE, H. DECRAEMER, J. SCHELL and M. VAN MONTAGU
Rapid mapping of transposon insertion and deletion mutations in the large Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*.
Nucl. Acids Res., 1979, 7 : 1837-1849.

- DILWORTH M.J., R. ARWAS, I.A. McKAY, S. SAROSO and A.R. GLENN
Pentose metabolism in *Rhizobium leguminosarum* MNF300 and in Cowpea
Rhizobium NGR234.
J. Gen. Microbiol., 1986, 132 : 2733-2742.

- DJORDJEVIC M.A., W. ZURKOWSKI, J. SHINE and B.G. ROLFE
Sym plasmid transfer to various symbiotic mutants of *Rhizobium trifolii*,
R. leguminosarum and *R. meliloti*.
J. Bacteriol., 1983, 156 : 1035-1045.

- DJORDJEVIC S.P., H. CHEN, M. BATLEY, J.W. REDMOND and B.G.
ROLFE
Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of
Rhizobium sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the
addition of homologous exopolysaccharides.
J. Bacteriol., 1987, 169 : 53-60.

- DUNCAN M.J. and D.G. FRAENKEL
 α -keto-glutarate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*.
J. Bacteriol., 1979, 137 : 415-419.

- DUNCAN M.J.
Properties of Tn5-induced carbohydrate mutants in *Rhizobium meliloti*.
J. Gen. Microbiol., 1981, 122 : 61-67.

- ECKHARDT T.
A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid
in bacteria.
Plasmid, 1978, 1 : 584-588.

- EGNER D.E., C. EGNER, B.J. HIRSCHL, J. HOWARD, L. JOHNSRUD,
R.A. JORGENSEN and T.D. TLSTY
Insertion, excision and inversion of Tn5.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1980, 45 : 115-124.

- EL GUEZZAR M.
Contribution à l'étude de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse : obtention et étude de deux mutants métaboliques de *Rhizobium meliloti*.
Thèse de Doctorat n°186, 1987, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.

- EL GUEZZAR M., J.P. HORNEZ and J.C. DERIEUX
Study of a fructose-negative mutant of *Rhizobium meliloti*.
FEMS Microbiol. Lett., 1988, 49 : 429-434.

- ELKAN G.H. and I. KWIK
Nitrogen, energy and vitamin nutrition of *Rhizobium japonicum*.
J. Appl. Bact., 1968, 31 : 399-404.

- ENGELK Th., M.N. JAGADISH and A. PUHLER
Biochemical and genetical analysis of *Rhizobium meliloti* mutants defective in C₄-dicarboxylate transport.
J. Gen. Microbiol., 1987, 133 : 3019-3029.

- EPPS H.M.R. and E.F. GALE
The influence of the presence of glucose during growth on the enzymatic activities of *Escherichia coli* : comparison of the effects with that produced by fermentation acids.
Biochem. J., 1942, 36 : 619-623.

- FINAN T.M., J.M. WOOD and D.C. JORDAN
Succinate transport in *Rhizobium leguminosarum*.
J. Bacteriol., 1981, 148 : 193-202.

- FINAN T.M., J.M. WOOD and D.C. JORDAN
Symbiotic properties of C₄ dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*.
J. Bacteriol., 1983, 154 : 1403-1413.

- FORRAI T., E. VINCZE, Z. BANFALVI, G.B. KISS, G.S. RANDHAWA and A. KONDOROSI
Localization of symbiotic mutations in *Rhizobium meliloti*.
J. Bacteriol., 1983, 153 : 635-643.

- GARDIOL A., A. ARIAS, C. CERVENANSKY, C. GAGGERO and G. MARTINEZ-DRETS
Biochemical characterization of a fructokinase mutant of *Rhizobium meliloti*.
J. Bacteriol., 1980, 144 : 12-16.

- GARDIOL A., A. ARIAS, C. CERVENANSKY and G. MARTINEZ-DRETS
Succinate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*.
J. Bacteriol., 1982, 151 : 1621-1623.

- GARDIOL A.E., G.L. TRUCHET and F.B. DAZZO
Requirement of succinate dehydrogenase activity for symbiotic bacteroid differentiation of *Rhizobium meliloti* in alfalfa nodules.
Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53 : 1947-1950.

- GLENN A.R., P.S. POOLE and J.F. HUDMAN
Succinate uptake by free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum*.
J. Gen. Microbiol., 1980, 119 : 267-271.

- GLENN A.R. and M.J. DILWORTH
The uptake and hydrolysis of disaccharides by fast and slow-growing species of *Rhizobium*.
Arch. Microbiol., 1981, 129 : 233-239.

- GLENN A.R., R. ARWAS, I.A. MCKAY and M.J. DILWORTH
Fructose metabolism in wild-type, fructokinase negative and revertant strains of *Rhizobium leguminosarum*.
J. Gen. Microbiol., 1984a, 130 : 231-237.

- GLENN A.R., R. ARWAS, I.A. McKAY and M.J. DILWORTH
Sugar metabolism and the symbiotic properties of carbohydrate mutants of *Rhizobium leguminosarum*.
J. Gen. Microbiol., 1984b, 130 : 239-245.

- GROSVELD F.G., T. LUND, E.J. MURRAY, A.L. MELLOR, H.H.M. DAHL and R.A. FLAWELL
The construction of cosmid libraries which can be used to transform eucaryotic cells.
Nucl. Acids Res., 1982, 10 : 6715-6728.

- GUIDI-RONTANI C., A. DANCHIN and A. ULLMANN
Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant affected in the regulation of adenylate cyclase.
J. Bacteriol., 1981, 148 : 753-761.

- GUIDO F.D., T.M. FINAN, E.R. SIGNER and G.C. WALKER
Host-dependent transposon Tn5-mediated streptomycin resistance.
J. Bacteriol., 1984, 159 : 395-399.

- HEDGES R.W. and A.E. JACOB
Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons.
Mol. Gen. Genet., 1974, 132 : 31-40.

- HEFFERNAN L., R. BASS and E. ENGBERG
Mutations affecting catabolite repression of the L-arabinose regulon in *Escherichia coli* B/2.
J. Bacteriol., 1976, 126 : 1119-1131.

- HIRSCH A.M., M. BANG and F.M. AUSUBEL
Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules by *nif::Tn5* mutants of *Rhizobium meliloti*.
J. Bacteriol., 1983, 155 : 367-380.

- HOM S.S., S.L. URATSU and F. HOANG
Tranposon Tn5-induced mutagenesis of *Rhizobium japonicum* yielding a wide variety of mutants.
J. Bacteriol., 1984, 159 : 335-340.

- HORNEZ J.P., B. COURTOIS, C. DEFIVES et J.C. DERIEUX
Etude des membranes internes dans les bactéroïdes de *Rhizobium meliloti* au sein des nodules de Luzerne (*Medicago sativa*).
C. R. Acad. Sci. Paris, 1974, ser.D, 278 : 157-160.

- HORNEZ J.P., B. COURTOIS et J.C. DERIEUX
Mise en évidence de voies de métabolisme différentes à partir du glucose ou du fructose chez *R. meliloti*.
C. R. Acad. Sci. Paris, 1976, ser.D, 283 : 1559-1562.

- HORNEZ J.P., A.P. THEODOROPOULOS, B. COURTOIS and J.C. DERIEUX
Diauxic growth and catabolic repression in *Rhizobium meliloti*.
In : "Advances in nitrogen fixation research". Veege C. and W.E. Newton (eds), Pudoc, Wageningen, 1984, p. 262.

- HORNEZ J.P.
L'utilisation du glucose et du fructose chez *Rhizobium meliloti* : dégradation, transport et régulations.
Thèse de Doctorat d'Etat n°728, 1987, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.

- HORNEZ J.P., M. EL GUEZZAR and J.C. DERIEUX
Succinate transport in *Rhizobium meliloti* : characteristics and impact on symbiosis.
Curr. Microbiol., 1989, 19 : 207-212.

- HUDMAN J.H. and A.R. GLENN
Glucose uptake by free living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum*.
Arch. Microbiol., 1980, 128 : 72-77.

- IRWIN N. and M. PTASHNE
Mutants of the catabolite activator protein of *Escherichia coli* that are specifically deficient in the gene-activation function.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84 : 8315-8319.

- ISH-HOROWICZ D. and J.F. BURKE
Rapid and efficient cosmid vector cloning.
Nucl. Acids Res., 1981, 9 : 2989-2998.

- JOHNSON R.C. and W.S. REZNIKOFF
Role of the IS 50R proteins in the promotion and control of Tn5 transposition.
J. Mol. Biol., 1984, 177 : 645-661.

- JOSEPH E., A. DANCHIN and A. ULLMANN
Regulation of galactose operon expression : glucose effects and role of cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate.
J. Bacteriol., 1981, 146 : 149-154.

- KARR D.B., J.K. WATERS, F. SUZUKI and D.W. EMERICH
Enzymes of the poly β -hydroxybutyrate and citric acid cycles of *Rhizobium japonicum* bacteroids.
Plant Physiol., 1984, 75 : 1158-1162.

- KATZNELSON H. and A.C. ZAGALLO
Metabolism of *Rhizobia* in relation to effectiveness.
Can. J. Microbiol., 1957, 3 : 879-884.

- KEELE B.B., P.B. HAMILTON and G.H. ELKAN
Glucose catabolism in *Rhizobium japonicum*.
J. Bacteriol., 1969, 97 : 1184-1191.

- KEELE B.B., P.B. HAMILTON and G.H. ELKAN
Gluconate catabolism in *Rhizobium japonicum*.
J. Bacteriol., 1970, 101 : 698-704.

- KING P.V. and R.W. BLAKESLEY
Optimizing DNA ligations for transformation.
Focus, 1986, 8 : 1-3.

- KLEBE R., J.J.V. HARRIS, Z.D. SHARP and M.G. DOUGLAS
A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast.
Gene, 1983, 25 : 333-341.

- KUMAR S.
Properties of adenyl cyclase and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate receptor protein-deficient mutants of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 1976, 125 : 545-555.

- LODGE J.K., K.W. HAFER, J.B. LOWE, K.W. DODSON and D.E. BERG
Determinants of Tn5 insertion specificity.
Genome Rearrangement, 1985, pp. 37-42.

- LOWRY O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 1951, 193 : 265-275.

- MAKMAN R.S. and E.W. SUTHERLAND
Adenosine 3'-5'-phosphate in *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem., 1965, 240 : 1309-1314.

- MARTINEZ-DRETS G. and A. ARIAS
Metabolism of some polyols of *Rhizobium meliloti*.
J. Bacteriol., 1970, 103 : 97-109.

- MARTINEZ-DRETS G. and A. ARIAS
Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast and slow-growing groups.
J. Bacteriol., 1972, 109 : 467-470.

- MARTINEZ-DRETS G., A. ARIAS and M. RORIVA DE CULTINELLA
Fast and slow-growing rhizobia differences in sucrose utilization and invertase activity.
Can. J. Microbiol., 1974, 20 : 605-609.

- MAXWELL E.S., K. KURAHASHI and H.M. KALCKAR
Enzymes of the Leloir pathway.
Methods Enzymol., 1962, 5 : 174-189.

- MAZODIER Ph., P. COSSART, E. GIRAUD and F. GASSER
Completion of the nucleotide sequence of the central region of Tn5 confirms the presence of three resistance genes.
Nucl. Acids Res., 1985, 13 : 195-205.

- McALLISTER C.F. and J.E. LEPO
Succinate transport by free-living forms of *Rhizobium japonicum*.
J. Bacteriol., 1983, 153 : 1155-1162.

- McGETRICK A.M., C.F. GOULDING, S. MANIAN and F. O'GARA
Catabolite repression and role of cyclic AMP in CO₂ fixation and H₂ metabolism in *Rhizobium* spp.
J. Bacteriol., 1985, 163 : 1282-1284.

- MEADE H.M., S.R. LONG, G.B. BUVKUN, S.E. BOWN and F.M. AUSUBEL
Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis.
J. Bacteriol., 1982, 149 : 114-122.

- MERBERG D., B.O. EILLEN and J.M. ROBERT
Regulation of hydrogenase in *Rhizobium japonicum* : analysis of mutants altered in regulation by carbon substrates and oxygen.
J. Bacteriol., 1983, 156 : 1236-1242.

- MERCENIER A. and B.M. CHASSY
Strategies for the development of bacterial transformation systems.
Biochimie, 1988, 70 : 503-517.

- MONOD J.
Communication (suite et fin) sur la nature du phénomène de diauxie.
Ann. Inst. Pasteur, 1943, 71 : 37-40.

- MULONGOY K. and G.H. ELKAN
Glucose catabolism in two derivatives of a *Rhizobium japonicum* strain differing in nitrogen-fixing efficiency.
J. Bacteriol., 1977, 131 : 179-187.

- NAG D.K., U. DASGUPTA, G. ADELTA and D.E. BERG
IS50-mediated inverse transposition : specificity and precision.
Gene, 1985, 34 : 17-26.

- NASH H.A., K. MIZUUCHI, R.A. WEISBERG, Y. KIRUCHI and M. GELLERT
Integrative recombination of bacteriophage lambda. The biochemical approach to DNA insertions.
In : "DNA insertion elements, plasmids and episomes". Bukhari A.I., J.A. Shapiro and S.L. Adhya (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New-York, 1967, pp. 249-261.

- NICOL H. and H.G. THORNTON
Competition between related strains of nodule Bacteria and its influence on infection of the legume host.
Proc. Roy. Soc., Ser.B., 1941, 130 : 32-59.

- NOEL K.D., A. SANCHEZ, L. FERNANDEZ, J. LEEMANS and M.A. CEVALLOS
Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions.
J. Bacteriol., 1984, 158 : 148-155.

- PEDROSA F.O. and G.T. ZANCAN
L-arabinose metabolism in *Rhizobium japonicum*.
J. Bacteriol., 1974, 119 : 336-338.

- PERLMAN R., B. De CROMBRUGGHE and I. PASTAN
Cyclic AMP regulates catabolite and transient repression in *Escherichia coli*.
Nature, 1969, 223 : 810-812.

- PERLMAN R.L. and I. PASTAN
Pleiotropic deficiency of carbohydrate utilization in an adenyl cyclase deficient mutant of *Escherichia coli*.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, 37 : 151-157.

- PHILLIPS A.T. and L.M. MULFINGER
Cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate levels in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*, during induction and carbon catabolite repression of histidase synthesis.
J. Bacteriol., 1981, 145 : 1286-1292.

- PTASHNE K. and S.N. COHEN
Occurrence of insertion sequence (IS) region on plasmid deoxyribonucleic acid as direct and inverted nucleotide sequence duplications.
J. Bacteriol., 1975, 122 : 776-781.

- PUHLER A., W. ARNOLD, D. HORN, B. JACKEL, U. PRIEFER, R. SIMON and G. WEBER
Genetic analysis of *Rhizobium meliloti* plasmids and *Rhizobium meliloti* *nif* genes.
In : "Proceeding of the 8th North America *Rhizobium* Conference".
University of Manitoba Press, Winnipeg, 1982, pp. 90-114.

- REDING H.K. and J.E. LEPO
Physiological characterization of dicarboxylate-induced pleiomorphic forms of *Bradyrhizobium japonicum*.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55 : 666-671.

- REIBACH P.H. and J.G. STREETER
Metabolism of ¹⁴C-labelled photosynthate and distribution of enzymes of glucose metabolism in soybean nodules.
Plant Physiol., 1983, 72 : 634-640.

- RICKENBERG H.V.
Cyclic AMP in procaryotes.
Annu. Rev. Microbiol., 1974, 28 : 357-378.

- RONSON C.W. and S.B. PRIMROSE
Carbohydrate metabolism in *Rhizobium trifolii* : identification and symbiotic properties of mutants.
J. Gen. Microbiol., 1979, 112 : 77-88.

- RONSON C.W., P. LYTTLETON and J.G. ROBERTSON
 C_4 -dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* from ineffective nodules of *Trifolium repens*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78 : 4284-4288.

- RONSON C.W., P.W. ASTWOOD and J.A. DOWNIE
Molecular cloning and genetic organization of C_4 -dicarboxylate transport genes from *Rhizobium leguminosarum*.
J. Bacteriol., 1984, 160 : 903-909.

- ROSSETTI O.L., R. ALTMAN and R. YOUNG
Kinetics of Tn5 transposition.
Gene, 1984, 32 : 91-98.

- ROTHSTEIN S.J., R.A. JORGENSEN, K. POSTLE and W.S. REZNIKOFF
The inverted repeats of Tn5 are functionally different.
Cell., 1980, 19 : 795-805.

- SALMINEN S.O. and J.G. STREETER
Enzyme of α , α -trehalose metabolism in soybean nodules.
Plant Physiol., 1986, 81 : 538-541.

- SALMINEN S.O. and J.G. STREETER
Uptake and metabolism of carbohydrates by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids.
Plant Physiol., 1987, 83 : 535-540.

- SAROSO S., A.R. GLENN and M.J. DILWORTH
Carbon utilization by free living and bacteroid forms of Cowpea *Rhizobium* strain NGR234.
J. Gen. Microbiol., 1984, 130 : 1809-1814.

- SCHERRER A. and J. DENARIE
Symbiotic properties of some auxotrophic mutants of **Rhizobium meliloti** and of their prototrophic revertants.
Plant and Soil, 1971, Special Volume, 39-45.

- SCHWARTZ D. and J. BECKWITH
Mutants missing a factor necessary for the expression of catabolite-sensitive operons in **Escherichia coli**.
In : "The lactose operon". Beckwith J.R. and D. Zisper (eds), 1970, pp. 417-422.

- SCHWINGHAMER E.A.
Loss of effectiveness and infectivity in mutants of **Rhizobium** resistant to metabolic inhibitors.
Can. J. Microbiol., 1968, 14 : 355-367.

- SELVARAJ G. and V.N. IYER
Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in **Rhizobium meliloti** and related Bacteria.
J. Bacteriol., 1983, 156 : 1292-1300.

- SELVARAJ G., I. HOOPER, S. SHANTHARAM, V.N. IYER, L. BARRAN, R. WHEATEROFT and R.J. WATSON
Derivation and molecular characterization of symbiotically deficient mutants of **Rhizobium meliloti**.
Can. J. Microbiol., 1987, 33 : 739-747.

- SHAPIRO J.A.
Mutations caused by the insertion of genetic material into the galactose operon of **Escherichia coli**.
J. Mol. Biol., 1969, 40 : 93-105.

- SHAW K.J. and C.M. BERG
Escherichia coli K-12 auxotrophs induced by insertion of the transposable element Tn5.
Genetics, 1979, 92 : 741-747.

- SHERMAN S.M.H., S.L. URATSU and F. HOANG
Transposon Tn5-induced mutagenesis of *Rhizobium japonicum* yielding a wide variety of mutants.
J. Bacteriol., 1984, 159 : 335-340.

- SIEGEL L.S., P.B. HYLEMON and Jr. P.V. PHIBBS
Cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate and activities of adenylate cyclase and cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate phosphodiesterase in *Pseudomonas aeruginosa* and bacteroides.
J. Bacteriol., 1977, 129 : 87-96.

- SMITH C.J.
Polyethylene-glycol facilitated transformation of *Bacteroides fragilis* with plasmid DNA.
J. Bacteriol., 1985, 164 : 466-469.

- SOBERON M., J.M. HERNANDEZ, G.R. AGUILAR and F. SANCHEZ
Isolation of *Rhizobium phaseoli* Tn5 induced mutants with altered expression of cytochrome terminal oxidases o and aa₃.
J. Bacteriol., 1990, 172 : 1676-1680.

- STANISICH V.A., P.M. BENNETT and M.H. RICHMOND
Characterization of a translocatable unit encoding resistance to mercuric ion that occurs on a non conjugative plasmid in *Pseudomonas aeruginosa*.
J. Bacteriol., 1977, 129 : 1227-1233.

- STOWERS M.D. and G.H. ELKAN
The transport and metabolism of glucose in Cowpea Rhizobia.
Can. J. Microbiol., 1983, 29 : 398-406.

- STOWERS M.D. and A.R.J. EAGLESHAM
Physiological and symbiotic characteristics of fast-growing *Rhizobium japonicum*.
Plant Soil, 1984, 77 : 3-14.

- STOWERS M.D. and G.H. ELKAN
Gluconate catabolism in Cowpea Rhizobia : evidence for a ketogluconate pathway.
Arch. Microbiol., 1984, 137 : 3-9.

- TAYLOR A.L.
Detection of specific sequence among DNA fragments.
J. Mol. Biol., 1963, 98 : 503.

- TAYLOR H.V. and M.D. YUDKIN
Synthesis of tryptophanase in *Escherichia coli* : isolation and characterization of a structural gene mutant and two regulatory mutants.
Mol. Gen. Genet., 1978, 165 : 95-102.

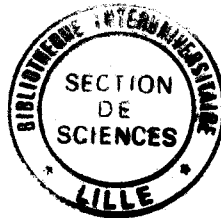
- THEODOROPOULOS P.A.
Le transport du glucose et sa régulation chez *Rhizobium meliloti*.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, n°31, 1986, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.

- TUZIMURA K. and H. MEGURO
Respiration substrate of *Rhizobium* in the nodules.
J. Biochem., 1960, 47 : 391-397.

- UCKER D.S. and E.R. SIGNER
Catabolite repression-like phenomenon in *Rhizobium meliloti*.
J. Bacteriol., 1978, 136 : 1197-1200.

- ULLMANN A. and J. MONOD
Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in *Escherichia coli*.
FEBS Lett., 1968, 2 : 57-60.

- ULLMANN A., F. TILLIER and J. MONOD
Catabolite modulator factor : a possible mediator of catabolite repression in bacteria.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73 : 3476-3479.



- ULLMANN A. and A. DANCHIN
Role of cyclic AMP in bacteria.
Adv. Cyclic Nucl. Res., 1983, 15 : 1-53.

- ULLMANN A.
Catabolite repression.
Biochimie, 1985, 67 : 29-34.

- UMEZAWA H., H. YAMAMOTO, M. YAGISAWA, S. KONDO and T. TAKEUCHI
Kanamycin phosphotransferase I : mechanism of cross resistance between kanamycin and lividomycin.
J. Antibiotics, 1973, 7 : 407-410.

- URBAN J.E. and F.B. DAZZO
Succinate-induced morphology of **Rhizobium trifolii** 0403 resembles that of Bacteroids in clover nodules.
J. Bacteriol., 1982, 44 : 219-226.

- URBAN J.E. and D.B. BECHTEL
Fine structure of succinate-swollen **Rhizobium trifolii** 0403.
Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47 : 1178-1181.

- VINCENT J.M. and B. HUMPHREY
Somatic antigens of two strains of **Rhizobium trifolii**.
J. Gen. Microbiol., 1970, 63 : 379-382.

- ZIMMERMAN J.L., W.W. SZETO and F.M. AUSUBEL
Molecular characterization of Tn5-induced symbiotic (Fix⁻) mutants of **Rhizobium meliloti**.
J. Bacteriol., 1983, 156 : 1025-1034.

R E S U M E

Par transposition nous avons isolé des mutants de *Rhizobium meliloti* M5N1, ayant un caractère carbohydrate-négatif. L'ensemble des études effectuées sur un mutant suggère que la mutation a touché un gène de régulation.

Les résultats, déjà publiés sur la régulation chez *E. coli*, montrent que cette bactérie possède un système de contrôle type répression catabolique : système faisant intervenir l'AMPc et la protéine CAP. Chez *Rhizobium*, un système de contrôle semblable à la répression catabolique a été mis en évidence, mais le rôle de l'AMPc dans la levée de la répression est variable selon les auteurs.

Nous avons pu montrer que la levée de la répression par l'addition de l'AMPc est fonction des conditions expérimentales d'incubation. Toutefois, l'utilisation de ce nucléotide reste sans effet sur la croissance de notre mutant. Ceci nous a amené à rechercher l'existence d'autres gènes de régulation. Par des expériences de complémentation, nous avons montré, pour la première fois, que *R. meliloti* possède un gène qui jouerait le rôle du gène crp d'*E. coli*.

S U M M A R Y

Using the translocatable drug-resistance element Tn5, carbohydrate-negative mutants were isolated from *Rhizobium meliloti* M5N1.

The whole of studies realized on one mutant suggests that it was probably altered in a regulatory gene. In *E. coli*, gene expression is known to be influenced by cAMP. Which, in combination with a catabolite activator protein (CAP), exerts control over the transcription of a number of genes.

In *Rhizobium* spp., although the catabolite repression has been documented, the role of cAMP is not yet elucidated. We demonstrate here that the effect of exogenous cAMP in catabolite repression is function of oxygen transfer. Moreover, using complementation experiments, we have shown that *R. meliloti* M5N1 would harbour a gene equivalent to crp gene of *E. coli*.