

50376
1992
192-1

6 2 953

50376
1992
192-1

numéro d'ordre : 939

Université de Lille I

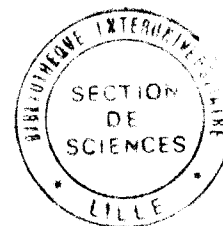
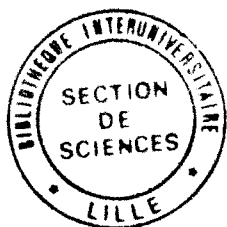
1992

THESE

présentée à l'Université des Sciences et techniques de Lille Flandres-
Artois
UFR Biologie
pour l'obtention du diplôme de doctorat

par

Tatiana VALLAEYS



**Isolement d'une communauté microbienne dégradant l'acide 2,4-
dichlorophénoxyacétique à partir d'un sol de Dijon. Caractérisations
cinétique et génétique des souches impliquées**

Soutenue le 8.7.1992
devant la commission d'examen :

R. Tailliez	Président
J.C. Germon	Rapporteur
A.J. Weightman	Rapporteur
A.J.B. Zehnder	Rapporteur
R. Blondeau	Examineur
H.C. Dubourguier	Examineur
A. Pavé	Examineur
G. Soulas	Examineur

Бабушке, в память

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur le professeur Tailliez qui a accepté de diriger ce travail, Messieurs Blondeau, Dubourguier, Germon, Pavé et Zehnder, pour avoir bien voulu participer au Jury. Je tiens tout particulièrement à remercier Messieurs Soulas et Weightman pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire.

Je remercie Nick Mac Clure et Alain Hartmann pour leurs nombreux conseils et leurs démonstrations, leurs coups de main de chaque instant. Je tiens à remercier ici Pascal Schlich, pour sa collaboration et sa disponibilité, Marie-Christine Dictor, pour sa bonne humeur "légendes-aire" au sens propre et au sens "figures-hé". Je remercie Nadine Rouard et Bernard Lagacherie pour leur aide au quotidien, Marie-Reine Allard et Denis Brulbaut, pour leur patience à l'égard de mes fautes d'orthographe, Hania El attari et Dominique Patureau pour le temps passé entre autres, à dicter, taper, et pointer les références bibliographiques, Philippe Louvrier, pour sa participation. Je remercie Catherine Hénault, Catherine Clair et Monique Jault-André pour la mise en forme des fiches techniques, Paul Nelson, Ahmed Gamouh et Rachida Nouaïm pour leur aide lors de l'édition.

Je tiens plus particulièrement à remercier Dominique Delgutte pour ses innombrables relectures et sa présence précieuse en cette fin de thèse. Enfin, je remercie Christophe Durand pour avoir accepté de gérer au cours de son stage de B.T.S, le conditionnement, la lecture, et l'évacuation d'une multitude de boîtes de Petri...

Je remercie toute l'équipe de Microbiologie Générale de l'Institut Pasteur pour ses talents de formateurs vis à vis des néophytes.

Je remercie également tous mes collègues pour avoir supporté pendant ces trois ans de thèse, qui un "TGV", qui un "Gaston Lagaffe".

Enfin, je tiens aussi à remercier Gunalan avec qui j'ai partagé un bureau, un laboratoire, pour sa patience vis à vis de mon désordre, et pour son organisation qui compensait souvent la mienne.

Je ne peux oublier ici d'avoir une pensée pour Madame Baumont dont le potage aux légumes avait chaque soir, le goût du réconfort. Un clin d'oeil, au passage à Juju, qui a dû supporter pendant tout ce temps la terrible réputation d'épave du Centre INRA de Dijon-Ville et qui avec constance et fidélité m'a accompagnée dans tous mes trajets même après l'heure de la retraite. Un autre clin d'oeil à Toto, Macintosh de son état, autre compagnon inséparable de mes nombreuses pérégrinations, qui de "fil en fil", s'est toujours parfaitement intégré à l'équipe locale d'IBM-PC perplexes et de SUN expansionnistes. Je le remercie pour avoir supporté la frappe (au sens propre) de cette thèse.

Je remercie aussi Sylvie, Sophie et Hania pour leur "squat" en ville les jours de "nocturne" au laboratoire.

Enfin je tiens à exprimer ma gratitude à mes parents et à Jean-Marc pour leur soutien, et tout particulièrement leur patience face aux nombreux déménagements occasionnés par cette thèse.

Un dernier clin d'oeil, enfin, à *Alcaligenes paradoxus* sans qui cette thèse ne serait rien, bactérie gourmet pour qui il a fallu composer tant de recettes exotiques, bactérie timide qui ne cessait de se cacher derrière ses trop nombreuses collègues et qu'il a fallu apprivoiser. Un jour, elle dût me demander "s'il te plaît, dessine-moi un fermenteur."

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
kd	kilodalton
RPM	rotations par minute
UV	ultra violet
2-CM	2-chloromuconate
2-CPA	2-chloropropionamide
2-MPA	acide 2-méthylphénoxyacétique
2MCBA	acide 2-monochlorobutanoïque
2,4,5-T	acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique
2,4-D	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
2,4-DCP	2,4-dichlorophénol
3-CB	acide 3-chlorobenzoïque
3CC	3-chlorocatéchol
3CHB	3-chlorodihydrodihydroxybenzoate
24DM	2,4-dichloromuconate
35DC	3,5-dichlorocatéchol
CAM	camphre
cis2CL	cis-2-chlorodiène-lactone
DL	diènelactone
DNOC	4,6-dinitroorthocrésol
EDTA	éthylène diamine tétracétate
MCPA	acide 2-méthyl,4-chlorophénoxyacétique
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAH	naphtalène
PAA	acide phénoxyacétique
SAL	salicylate
SDS	dodécyl sulfate de sodium
TOL	toluène
tran2CL	trans-2-chlorodiène-lactone
Amp	ampicilline
Hg	mercure
Km	kanamycine
Rif	rifampicine
Sm	streptomycine
Tc	tétracycline
Ilv	isoleucine, leucine, valine
Pro	proline
Trp	tryptophane
<i>mob</i>	gène de mobilisation
<i>tra</i>	gène de transfert

PLAN GÉNÉRAL

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PREMIERE PARTIE :	14
Sélection d'une communauté microbienne dégradant l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique. Caractéristiques biocinétiques de la dégradation.	
DEUXIEME PARTIE :	64
Caractérisation génétique d'une souche d' <i>Alcaligenes paradoxus</i> dégradant l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique. Localisation des gènes impliqués dans la dégradation du pesticide.	
TROISIEME PARTIE :	122
Existence d'homologies entre six souches bactériennes dégradant l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique de diverses provenances. Utilisation des sondes pour la mise en évidence des micro-organismes dégradant le 2,4-D.	
DISCUSSION GÉNÉRALE	144
ANNEXES	150
BIBLIOGRAPHIE	152
TABLE DES MATIERES	

INTRODUCTION GENERALE

"On expulse aussi les insectes parasites des arbres et des légumes, au moyen de fumigations faites avec de la poix et du soufre. Quant aux légumes, on en chasse les vers en les saupoudrant de cendres de bains dans lesquelles on brûle du fumier; on prend de la poudre la plus récente, on donne un arrosage avec de l'eau, et les vers périssent, la volonté divine aidant. Cette opération peut précéder le semis et être appliquée au sol... Quand, au mois de mai, les jeunes pousses ont atteint une hauteur moyenne, on donne un bon binage, avec une piochette douce, pour nettoyer le terrain de toutes les mauvaises herbes; on laisse en repos pendant huit jours, puis on use de la pulvérisation..."

IBN AL AWAM, "Le livre de l'agriculture", douzième siècle.
(Traduit de l'arabe par Clement-Mullet, 1977)

Si les traitements phytosanitaires sont apparus très tôt dans l'histoire de l'agriculture, la pratique du désherbage manuel n'en est pas moins demeurée pendant longtemps, la technique la plus utilisée pour le retrait des mauvaises herbes. Il a fallu attendre le vingtième siècle pour voir apparaître les premiers résultats de travaux de recherche dont la conséquence s'est traduite par la production et l'utilisation massive de désherbants.

Au début des années quarante, les principaux herbicides utilisés sont encore de nature minérale. Leur contact avec la plante provoque une brûlure chimique des parties touchées. Ils se caractérisent par une complète absence de spécificité d'action. Le DNOC (4,6-dinitroorthocrésol) introduit en 1935 par Pastac et Truffaut (*in* Brian, 1976) apparaît alors comme l'ancêtre des désherbants modernes. Ce produit fait partie des premiers désherbants organiques.

Cependant le véritable pas en avant au niveau du traitement des mauvaises herbes, ce que Brian (1976) présente comme étant "la plus grande avancée dans l'histoire du désherbage", est la découverte des herbicides à activité hormonale. Avec l'apparition de ces substances naît la notion de sélectivité d'action qui constitue le fondement du désherbage moderne. S'appuyant sur les résultats de Mitchell et Hamner (1944), qui notent une différence de sensibilité aux dérivés auxiniques chez les plantes en fonction des espèces auxquelles elles appartiennent, Marth et Mitchell (1944) mettent en évidence la bonne résistance des graminées à certaines de ces substances ainsi que des variations de la sensibilité en fonction des variétés et des stades de croissance. En 1944 également, Hamner et Tukey se penchent plus

Nom commun	Nom chimique	Solubilité dans l'eau (mg l ⁻¹)	Formule développée
AIA	acide β-indole acétique	.	
AIB	acide β-indole butyrique	.	
ANA	acide α-naphtylacétique	.	
α-naphylacétamide	α-naphylacétamide	.	
4-CPA	acide (chloro-4 phénoxy)-2 acétique	.	
2,4-D	acide (dichloro-2,4 phénoxy)-2 acétique	600	
2,4-MCPA	acide (chloro-4, méthyl-2 phénoxy)-2 acétique	825	

2,4,5-T	acide (trichloro-2,4,5 phénoxy)-2 acétique	278	
dichlorprop	acide (dichloro-2,4 phénoxy)-2 propionique	350	
mecoprop	acide (chloro-4, méthyl-2 phénoxy)-2 propionique	620	
2,4-DB	acide (dichloro-2,4 phénoxy)-4 butyrique	46	
2,4-MCPB	acide (chloro-4 méthyl-2 phénoxy)-4 butyrique	44	
fluroxypyr	acide (amino-4 dichloro-3,5 fluoro-6 pyridyloxy)-2-2 acétique	91	
trichlopyr	acide (trichloro-3,5,6 pyridyloxy)-2-2 acétique	440	

Figure 1 : Principales formulations des acides phénoxyalcanoïques (d'après Soulas, 1990)

particulièrement sur deux acides phénoxyalcanoïques, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et l'acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique (2,4,5-T), dont ils étudient l'activité phytocide sur une dicotylédone, le liseron. Ainsi démontrent-ils la toxicité de ces substances sur la plante entière indépendamment des parties où ces composés sont appliqués : les racines des plantes se trouvent affectées par un traitement foliaire. La destruction de certaines adventices indésirables semble alors pouvoir être réalisée de façon complète et durable après traitement des cultures de céréales à l'aide de telles substances sans pour autant affecter la croissance de ces dernières.

Contrairement aux désherbants minéraux alors employés, les doses préconisées pour ces produits sont faibles, 1kg par hectare pour le MCPA (acide 2-méthyl, 4-chlorophénoxyacétique), 0,5 kg par hectare pour le 2,4-D soit des doses jusqu'à 100 fois inférieures à celles des désherbants minéraux. Cette réduction des doses a été en partie responsable de la rapide progression de l'emploi des désherbants à activité hormonale et leur utilisation n'a pas cessé de croître jusqu'à la fin des années 1970. Elle atteignait 27×10^6 kg pour le 2,4-D en 1974 (Pemberton et Fisher, 1977).

Depuis, les formulations des phytohormones de synthèse se sont multipliées, donnant naissance à une large gamme de produits plus ou moins spécifiques largement utilisés par l'agriculture contemporaine. Ainsi, plusieurs molécules appartenant à la famille chimique des acides aryl (oxy) alcanoïques substitués de formule générale $\phi - O - R - COO X$ (où ϕ est un cycle aromatique substitué ou non, R est une chaîne aliphatique, X est un anion ou une chaîne aliphatique), ont montré des activités phytohormonales et sont utilisées en tant que facteurs de croissance, de rhizogénèse ou de maturation des fruits ou, au contraire en tant qu'herbicides. Parmi ceux-ci, de nombreux composés organo-chlorés sont appliqués pour lutter contre les mauvaises herbes. C'est au sein de cette famille de composés que l'on retrouve quelques-uns des herbicides les plus employés au cours des quarante dernières années tels que le 2,4-D, le MCPA et le 2,4,5-T également connu sous le nom d'agent orange. Si certains de ces dérivés organochlorés sont le plus couramment appliqués par les agriculteurs contre les adventices latifoliées en tant qu'antidicotylédones de post-levée dans les cultures de céréales, de maïs, de canne à sucre et les pelouses de graminées (cas du 2,4-D), d'autres, tels que le 2,4,5-T, sont réservés au débroussaillage. La figure 1 présente la formule chimique de quelques-uns de ces composés. Leur large champ d'utilisation a contribué à leur succès.

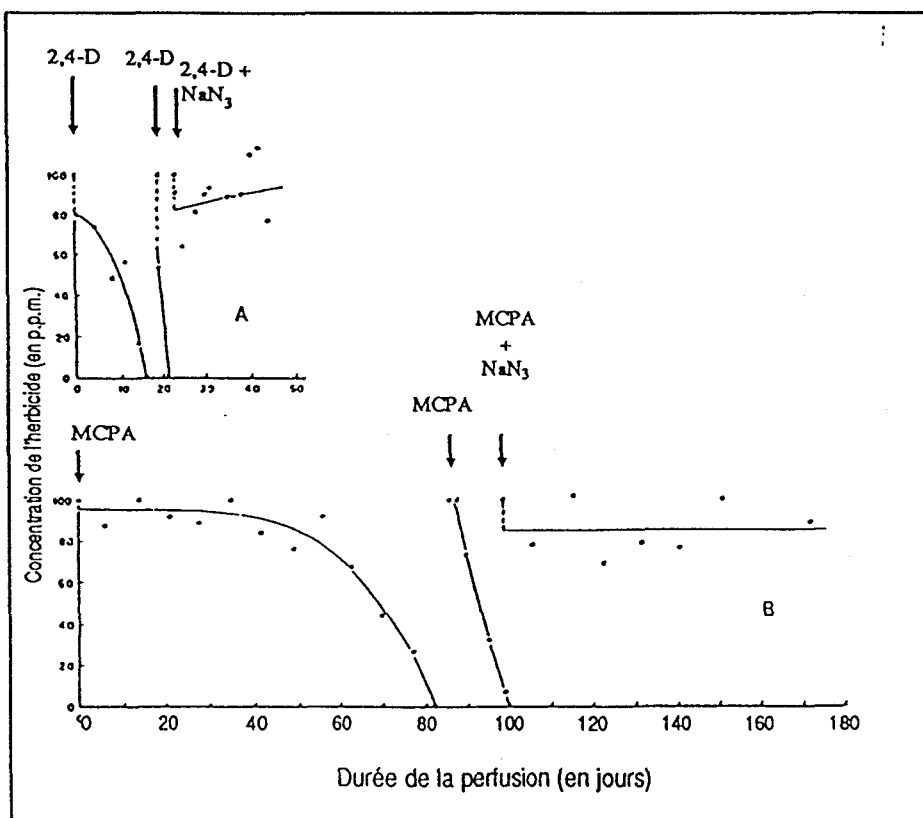


Figure 2 : Effet d'un agent antibactérien (azide de sodium) sur la dégradation du 2,4-D et du MCPA dans des sols prétraités par ces pesticides (d'après Audus, 1951)

Cependant, en plus de leurs effets sur les cibles prévues, ces pesticides sont susceptibles d'affecter d'autres organismes. On en retrouve en particulier des traces dans les sols où ils peuvent exercer une activité néfaste directement sur la croissance des cultures et indirectement en influençant l'activité de la microflore rhizosphérique. L'utilisation massive de ces produits a même conduit, dans certains cas, à observer des phénomènes d'accumulation ou de persistance de ces substances dans les sols. Le potentiel polluant de ces composés a attiré l'attention des chercheurs. Très tôt, le phénomène de persistance est ressenti comme un danger, de même que le phénomène d'adaptation que l'on commence à mettre en évidence vis à vis de certains produits. Les travaux développés ont alors pour but de connaître et surtout maîtriser la dégradation des pesticides dans les sols pour pouvoir, selon les cas, la limiter ou au contraire l'induire. Les premières études cherchent à décrire le phénomène et à mettre en évidence, dans le cas où une dégradation des pesticides est observable, les facteurs chimiques ou biologiques responsables de cette dégradation.

Audus, en 1951 démontre de façon formelle, l'intervention de la microflore des sols dans la dégradation de deux herbicides organo-chlorés, le 2,4-D et le MCPA. Il soumet tour à tour un sol à une perfusion par une solution contenant du 2,4-D ou du MCPA et observe une diminution de la concentration de l'herbicide quasi immédiate pour le 2,4-D et à partir du sixantième jour de traitement environ pour le MCPA. Une nouvelle perfusion à l'aide d'une solution contenant l'un des deux pesticides induit alors une dégradation beaucoup plus rapide de ceux-ci. Au contraire, en présence d'azide de sodium, un inhibiteur de la cytochrome oxydase qui a pour effet de perturber l'activité microbienne, les deux herbicides ne sont plus dégradés (figure 2). Ces résultats ne conduisent pas seulement à conclure à l'implication de la microflore du sol dans la dégradation de ces deux herbicides, ils révèlent que le sol peut, dans certains cas, s'adapter. D'après ces travaux, la dégradation d'un herbicide est beaucoup plus rapide après une seconde application ce qui souligne l'existence d'une mémorisation des traitements phytosanitaires antérieurs subis par un sol. Audus (1951) a démontré que cette mémorisation était due à un enrichissement de la microflore des sols en espèces dégradantes. Deux perspectives de recherche s'ouvrent alors. La première consiste à isoler du sol des micro-organismes responsables de l'activité dégradante et à approfondir les connaissances des voies métaboliques qui leur permettent de dégrader ces substrats nouveaux introduits depuis peu par l'homme dans l'environnement. La deuxième cherche à définir comment apparaissent et évoluent, au sein de la

Nom de la souche	isolée sur :	dégradant :	Remarque :	Ref. auteurs
<i>Bacterium globiforme</i>	2-4-D	MCPA	1	AUDUS (1960, 1951, 1952) AUDUS & SYMONDS (1955)
<i>Flavobacterium aquatile</i>	2-4-D	MCPA	2	JENSEN & PETERSEN (1952)
<i>Corynebacterium-like bacterium</i> (bacterium n°2)	2-4-D			
<i>Flavobacterium perfringens</i>	2-4-D	-	3	STAPP & SPICHER (1954)
<i>Mycoplasma</i>	2-4-D	MCPA	4	WALKER & NEWMAN (1956)
<i>Pseudomonas cepacia</i> AC 1100	2,4,5-T	2-4-D	5	KILBANE & al. (1982)
<i>Alcaligenes parvulus</i>	2-4-D	MCPA + PAA (MCP 130)	6	PEMBERTON & FISHER (1977) DON & PEMBERTON (1981)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	2-4-D	MCPA + PAA (MCP 144)	7	PEMBERTON & al (1979)
<i>Flavobacterium perfringens</i>	2-4-D	4-CPA	8	STEENSON & WALKER (1956, 1957)
<i>Achromobacter sp.</i>	2-4-D	MCPA	9	ROGOFF & REID (1956)
<i>Achromobacter sp.</i>	2-4-D	MCPA 4-CPA PAA	10	BELL (1957)
<i>Flavobacterium perfringens</i>	MCPA	-	-	BOLLAG & al. (1967)
<i>Flavobacterium sp.</i>	4-(2,4-DB)		11	BURGER & al. (1962)
<i>Aerobacter sp.</i>	2-4-D	MCPA 4-CPA	-	LOOS & al. (1967)
<i>Pseudomonas sp.</i>	4-CPA	-	-	EVANS & al. (1971)
<i>Alcaligenes xyloxydans</i> (communauté personnelle)	2-4-D	-	-	FOURNIER (1988)

Figure 3 : Tableau récapitulatif des souches microbiennes dégradant les composés phénoxyalcanoniques (d'après Soulas, 1990)

1. Souches utilisant le produit comme source de carbone et d'énergie	2. Souches n'utilisant pas le produit comme source de carbone et d'énergie
<i>Pseudomonas</i> NCID 9340	<i>Pseudomonas</i> sp.
GAUNT - EVANS (1971) GAUNT (1962)	EVANS & al. (1971)
Acides	<i>Neocardia opaca</i> (Rhodococcus sp. ?)
phénoxybutyriques	subtilines
13	WEBLEY & al. (1958)
acide	<i>Neocardia ocellata</i> (2,4,5 - tri-chloro caprique)
-	TAYLOR & WAIN (1962)
<i>Neocardia ocellata</i> sp.	<i>Neocardia</i> sp.
<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp.
<i>Actinobacter</i> sp.	2-4-D
BEADLE & SMITH (1982)	
<i>Flavobacterium</i> sp.	2-4-D
CHAUHRY & HUANG (1988) OGRAM & al. (1985)	
<i>Aspergillus niger</i>	2-4-D
SHALUBHAI & al. (1983)	
11. Souches n'utilisant pas le produit comme source de carbone et d'énergie	
<i>Aspergillus niger</i> van Tiegh	?
FAULKNER & WOODCOCK (1964)	
<i>Brevibacterium</i> sp.	2,4,5-T ou benzate
HORVATH (1971)	
<i>Pseudomonas</i> sp.	benzate
BAUER & al. (1979)	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,4,5-T + glucose + glycol + succinate
ROSENBERG & ALEXANDER (1980)	
111. Dégradation par des communautés microbiennes	
<i>Pseudomonas sp. (HL1)</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. (HL2)
<i>malophilia</i> (HL2)	<i>malophilia</i> (HL2)
<i>Alcaligenes</i> sp. (HL3)	<i>Alcaligenes</i> sp. (HL3)
<i>Actinobacter calcoaceticus</i> (HL4)	<i>Actinobacter calcoaceticus</i> (HL4)
<i>Flavobacterium</i> sp. (HL5)	<i>Flavobacterium</i> sp. (HL5)
<i>Pseudomonas</i> sp. + <i>Achromobacter</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. + <i>Achromobacter</i> sp.
18	LAPIN & al. (1985)
MCPA	
19	OU & SIKKA (1977)
M1 M3 M4	MCPA Dichlorprop + benzate
KILPI (1980)	2-4-D MCPA 2-4-D, dichlorprop
20	

Remarque n°

- 1 *B. globiforme* pousse sur milieu gélosé (0,1 %) mais pas sur milieu synthétique liquide. Il a, par la suite, été rebaptisé *Arthrobacter globiforme* puis décrit comme appartenant au genre *Corynebacterium*.
- 2 *F. aquatile* ne se développe que sur milieu solide et en absence d'extrait de sol. *F. aquatile* serait en réalité *Sporocytophaga congregata*. Bactérium n°2 ne pousse que faiblement sur milieux ordinaires en raison d'exigences nutritionnelles particulières.
- 3 *F. peregrinum* est inhibé par le glucose et le lactose. Le passage sur bouillon de culture réduit considérablement sa croissance ultérieure sur 2,4-D. Très souvent isolé en compagnie de *B. megaterium*.
- 4 Croissance sur milieu gélosé.
- 5 Souche "fabriquée" au laboratoire par hybridation à partir d'une culture mixte.
- 6 La dégradation du 2,4-D est codée sur le plasmide pJP1 pour JMP116, sur pJP2 pour JMP130 et pJP3 sur JMP133.
- 7 La dégradation du 2,4-D est codée sur les plasmides pJP4 (JMP134), pJP5 (JMP135), pJP7 (JMP142) et pJP9 (JMP144).
- 8 L'addition de 0,1 % d'extrait de levure favorise la dégradation bien que le 2,4-D soit utilisé comme seule source de carbone et d'énergie. Peptone (0,5 %) et glucose (0,5 %) n'empêchent pas l'adaptation sur 0,05 % de 2,4-D.
- 9 Faible croissance sur milieux communs de laboratoire avec ou sans 2,4-D. Inhibition pour 0,1 % d'extrait de levure et 0,4 % de 2,4-D.
- 10 Inhibition au delà de 3500 mg l⁻¹ de 2,4-D.
- 11 *Flavobacterium sp.* n'agit exclusivement que sur les dérivés phénoxybutyriques. Pas de dégradation du 2,4-D.
- 12 *Pseudomonas subcreta* et *Pseudomonas pictorum*.
- 13 La dégradation des dérivés butyriques se fait par β -oxydation de la chaîne latérale.
- 14 La dégradation avec *A. niger* se fait avec deshalogénéation complète de la molécule avant ouverture du cycle.
- 15 Un produit de transformation, le 3,5-dichlorocatéchol, s'accumule dans le milieu. *Brevibacterium* est maintenu sur milieu benzoate.
- 16 Le 2,4-D n'est dégradé qu'en présence de benzoate. Il y a élimination de la chaîne latérale et d'un atome de chlore. Le noyau n'est pas rompu.
- 17 La dégradation s'accompagne d'une accumulation de 2,4,5-trichlorophénol.
- 18 Organismes issus de la rhizosphère de blé. Les deux *Pseudomonas* sont dominants et dégradent le 2,4-D. La dégradation du mécoprop nécessite du succinate ou de l'acétate (croissance diauxique).
- 19 Il y a rupture du cycle de la molécule de silvex en présence de 0,2 % d'extrait de levure. Aucune souche n'est active isolément ainsi que la communauté reconstituée (?)
- 20 Chaque association contient 10 à 12 organismes différents dont aucun ne dégrade le MCPA comme source de carbone et d'énergie. M1 et M3 conservent leur capacité dégradante après 32 transferts successifs. M4 dégrade le mécoprop et le dichlorprop en présence de benzoate mais perd cette capacité après 10 transferts.

microflore des sols, ces voies métaboliques nouvelles. Le but ultime est de connaître les mécanismes de base pour pouvoir à long terme générer dans un sol, la réponse appropriée.

A l'horizon de ces premiers travaux se profilent déjà des solutions nouvelles. L'introduction dans l'environnement de micro-organismes isolés par sélection spécifique d'espèces capables de dégrader certains polluants ou d'espèces manipulées génétiquement à qui l'on aura inculqué les "bonnes" capacités dégradantes apparaît dès lors comme un espoir lointain de solution à certains problèmes d'accumulation (Karns *et al.*, 1984).

Les premières équipes se penchant sur la biodégradation des composés xénobiotiques et des organo-chlorés en particulier, cherchent alors à isoler du sol par enrichissements successifs, les souches capables de métaboliser ces composés. A ce titre, le 2,4-D, sujet de très nombreuses études est actuellement l'un des pesticides dont la dégradation est la mieux connue. De nombreuses souches capables de dégrader cet herbicide ont été isolées du sol. Pour un certain nombre d'entre elles, les voies métaboliques ont été déterminées. Certaines ont également été l'objet d'études génétiques approfondies ayant abouti à la localisation précise, au sein de leur génôme, des gènes impliqués dans la dégradation de ce pesticide. Aussi, bien qu'il ne soit plus aujourd'hui utilisé qu'en association avec d'autres composés phytosanitaires, le 2,4-D constitue un modèle de choix pour l'étude du phénomène d'adaptation des sols et de ses causes, reliées sans doute, à l'évolution des capacités enzymatiques de la microflore du sol, en liaison avec une sélection et un enrichissement en espèces les plus spécialisées. La présence, dans les sols, de ces composés nouveaux introduits par l'homme, exerce une pression de sélection en faveur de l'adaptation des voies métaboliques "naturelles" préexistant chez les micro-organismes des sols à l'utilisation de ces substrats. Le "modèle 2,4-D" peut être aussi le moyen de suivre l'adaptation de ces microflore dégradantes suivant la fréquence et l'intensité des traitements phytosanitaires. Nous soulignerons cependant qu'au sens de Audus (1951), l'adaptation des sols ne recouvre que l'enrichissement en microorganismes dégradants et non les mécanismes génétiques préalables par lesquels ces microorganismes apparaissent dans le sol.

Comme le montre le tableau récapitulatif présenté par Soulas (1990) que nous avons repris dans la figure 3, des souches appartenant à des genres différents se sont montrées capables de développer des capacités dégradantes vis à vis de composés xénobiotiques organochlorés appartenant à la famille des acides phénoxyacétiques dont fait partie le 2,4-D. Les premières tentatives

d'isolement de souches dégradant cet herbicide sont dues à Audus (1951). Ayant soumis une colonne de sol à la perfusion par une solution contenant du 2,4-D, cet auteur a montré que la vitesse de dégradation du 2,4-D dans la colonne était accrue si celle-ci était préalablement inoculée à l'aide d'une suspension microbienne provenant d'une colonne de sol déjà soumise au même traitement. Par la suite, cet auteur a réussi à isoler un micro-organisme impliqué dans la dégradation du pesticide. Celui-ci, initialement identifié comme étant un *Bacterium globiformis* (Audus, 1951) a été rebaptisé *Arthrobacter globiformis* puis reconnu comme faisant partie du genre *Corynebacterium* (Bell, 1957). D'autres corynébactéries dégradant le 2,4-D ont été ultérieurement isolées (Week, 1955; Rogoff et Reid, 1956). Cependant, l'appartenance des bactéries dégradant les composés phénoxyacétiques (dont le 2,4-D seul) à un groupe bactérien bien déterminé a très tôt été remise en question puisqu'assez rapidement des *Achromobactériacées* se sont également révélées capables de développer des capacités métaboliques à l'égard de cette famille d'herbicides. Ainsi Stapp et Spicher (1954) puis Steenson et Walker (1956), Ogram *et al.* (1985) et Chaudhry et Huang (1988) isolent des *Flavobacterium* capables de dégrader le 2,4-D. Steenson et Walker (1956) puis Bell (1957) isolent un *Achromobacter* sp. possédant des capacités métaboliques semblables. D'autres groupes bactériens sont également impliqués. Le *Flavobacterium aquatile* dégradant le 2,4-D isolé par Jensen et Petersen (1952) est reconnu ultérieurement comme étant un *Sporocytophaga congregata* (Weeks, 1955). Un *Mycoplana* sp. dégradant le 2,4-D est isolé par Walker et Newman en 1956. Quelques *Pseudomonas* présentant des capacités dégradantes à l'égard de cette molécule ont également été isolés (Evans et Smith, 1954; Bauer *et al.*, 1979; Kilpi *et al.*, 1980). Cependant Bell (1957) s'étonne que ce genre connu pour l'éventail de ses capacités métaboliques à l'égard des composés aromatiques naturels ne soit pas plus représenté parmi les micro-organismes dégradant le 2,4-D. Le genre *Alcaligenes* semble le plus fréquemment cité dans la bibliographie (Fisher *et al.*, 1978; Pemberton *et al.*, 1979; Amy *et al.*, 1985; Fournier, 1989). Il est cependant nécessaire de s'interroger sur la représentativité de cet échantillonnage et de se demander si ces conclusions ne sont pas la conséquence d'une utilisation de méthodes d'isolement trop spécifiques favorisant les espèces citées plus haut. Peu d'espèces de champignons impliqués dans la dégradation des composés phénoxyacétiques sont isolées. Seuls Faulkner et Woodcock (1964), Shailubhai *et al.*, (1983), puis Fournier (1989), mettent en évidence une activité dégradante chez un *Aspergillus niger*.

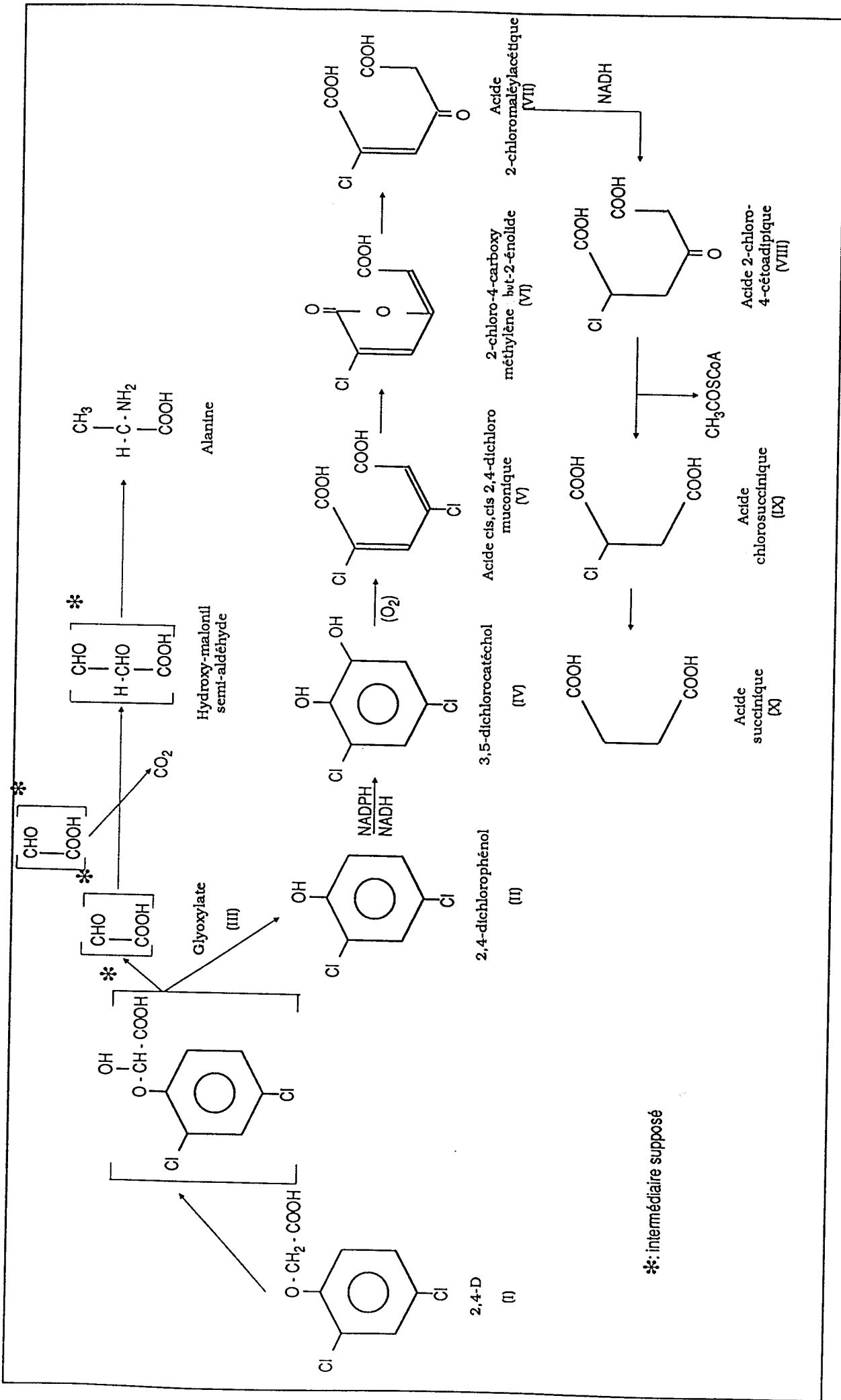


Figure 4 : Voies de dégradation du 2,4-D chez *Artthrobacter* sp (d'après Soulas, 1990).

Les voies métaboliques de la dégradation du 2,4-D chez quelques-unes de ces souches ont été étudiées. Soulas (1990) a retracé l'historique de la découverte des voies de dégradation de cette molécule par quelques bactéries isolées du sol parallèlement à l'évolution des techniques mises en oeuvre. Paradoxalement, malgré la diversité spécifique des souches isolées, de nombreuses similarités sont relevées au sein des voies de dégradation de ce pesticide développées par ces différentes souches

En 1952, Audus montre qu'un sol préalablement soumis à perfusion par un milieu comprenant du 2,4-D est capable de dégrader très rapidement le 2,4-dichlorophénol. En l'absence d'une perfusion préalable par une solution contenant du 2,4-D, une phase de latence de 60 jours est observée avant que ne débute la dégradation du 2,4-dichlorophénol. La suppression de la phase de latence après traitement du sol au 2,4-D suppose une adaptation simultanée du sol à la dégradation du 2,4-dichlorophénol et du 2,4-D. Ces résultats poussent alors Audus (1952) à conclure à l'appartenance du 2,4-dichlorophénol à la voie de dégradation de ce pesticide. La preuve en est donnée par Bell (1957), chez un *Achromobacter* sp., par Loos *et al.* (1967) chez *Arthrobacter* sp., par Evans *et al.* (1971) chez *Pseudomonas* sp. et par Beadle et Smith (1982) chez *Acinetobacter* sp. Une activité monooxygénasique est également mise en évidence chez *Alcaligenes eutrophus* (Don *et al.*, 1985; Amy *et al.*, 1985; Streber *et al.*, 1987). Chez les souches bactériennes étudiées, la dégradation du 2,4-D semble donc débiter par une hydrolyse de la liaison éther, préalablement à toute déshalogénéation.

Ce phénomène n'est pas observé chez les champignons puisque le métabolisme du 2,4-D chez *Aspergillus niger* emprunte une voie différente. Faulkner et Woodcock (1964; 1965), mettent en évidence la production chez cette souche de deux dérivés hydroxylés du 2,4-D, les acides 2,4-dichloro-5-hydroxyphénoxyacétique et 2,5-dichloro-4-hydroxyphénoxyacétique. Cependant dans ce cas, il n'y a pas lieu de parler de dégradation du pesticide mais plutôt d'une étape de détoxification préliminaire à une β -oxydation de la chaîne latérale du 2,4-D, qui porte les seuls carbones "consommables" par cette souche puisque celle-ci n'opère pas la rupture du cycle aromatique. Cependant, des travaux plus récents (Shailubhai *et al.*, 1983) s'intéressant à la dégradation du 2,4-D par une autre souche d'*A. niger* capable de pousser sur 2,4-D comme seule source de carbone et d'énergie ont confirmé la formation de 2,4-dichlorophénol à partir du 2,4-D au cours d'une première étape métabolique.

La mono-oxygénase responsable de l'hydrolyse de la liaison éther a ultérieurement été purifiée par Streber *et al.* (1987) chez *Alcaligenes eutrophus* JMP134. Il s'agit d'une protéine d'un poids moléculaire compris entre 31000 et

33000 présentant une faible spécificité de substrat. Chez *Arthrobacter* sp., cette protéine accepte également le MCPA, le 2- et le 4-chlorophénol en tant que substrats. Elle les transforme en leurs phénols respectifs, le 4-chloro-2-méthylphénol, le 2-chlorophénol et le 4-chlorophénol (Loos *et al.*, 1967). Chez *A. eutrophus*, en plus des composés que nous venons de citer, la mono-oxygénase accepte également pour substrat l'acide phénoxyacétique non substitué (Streber *et al.*, 1987).

Cette première étape de la dégradation du 2,4-D est par conséquent remarquablement conservée chez des espèces phylogéniquement éloignées. Cependant, cette similitude de fonction ne traduit pas systématiquement une origine évolutive commune. Elle peut être la conséquence d'une convergence vers une même activité mono-oxygénasique de l'évolution de fonctions enzymatiques initialement très éloignées. Elle peut également traduire l'intervention de diverses mono-oxygénases à large spectre de substrats, les liaisons éther, notamment, étant très fréquentes dans les composés naturellement présents dans le sol. Seule une étude phylogénique cherchant à vérifier de façon systématique l'existence d'une homologie entre les gènes codant pour cette mono-oxygénase chez les différentes souches présentant cette fonction métabolique peut permettre de conclure en faveur de l'une ou l'autre de ces hypothèses.

Loos *et al.* (1967) montrent par ailleurs que des cellules d'*Arthrobacter* sp. cultivées sur 2,4-D dégradent par la suite plus rapidement certains composés dont le 3,5-dichlorocatéchol. Mais la théorie de l'adaptation simultanée ne leur permet pas de conclure de manière irréfutable à l'appartenance de ce composé à la voie de dégradation du 2,4-D. Aussi, ces auteurs cherchent-ils à extraire des fractions enzymatiques purifiées à partir de cellules d'*Arthrobacter* sp. préalablement cultivées sur 2,4-D dont ils mesurent l'activité dégradante à l'égard de différents substrats. Une fraction se montre active à l'égard du 2,4-D générant un composé identifié au 2,4-dichlorophénol, mais aucune activité à l'égard du 2,4-dichlorophénol n'est mise en évidence. Poursuivant cette étude, Bollag *et al.* (1967) montrent que ce résultat est dû à l'absence dans l'extrait enzymatique d'un cofacteur nécessaire à la seconde étape de la dégradation du 2,4-D. L'ajout de NADPH à une telle fraction provoque en effet une accumulation de 3,5-dichlorocatéchol. Ainsi, l'appartenance de ce composé à la voie de dégradation du 2,4-D est-elle démontrée chez *Arthrobacter* sp. En 1971, Evans *et al.* mettent en évidence la transformation du 2,4-dichlorophénol en 3,5-dichlorocatéchol chez *Pseudomonas* sp. NCIB 9340. Quelques années plus tard Beadle et Smith (1982) isolent la 2,4-dichlorophénol hydroxylase responsable de

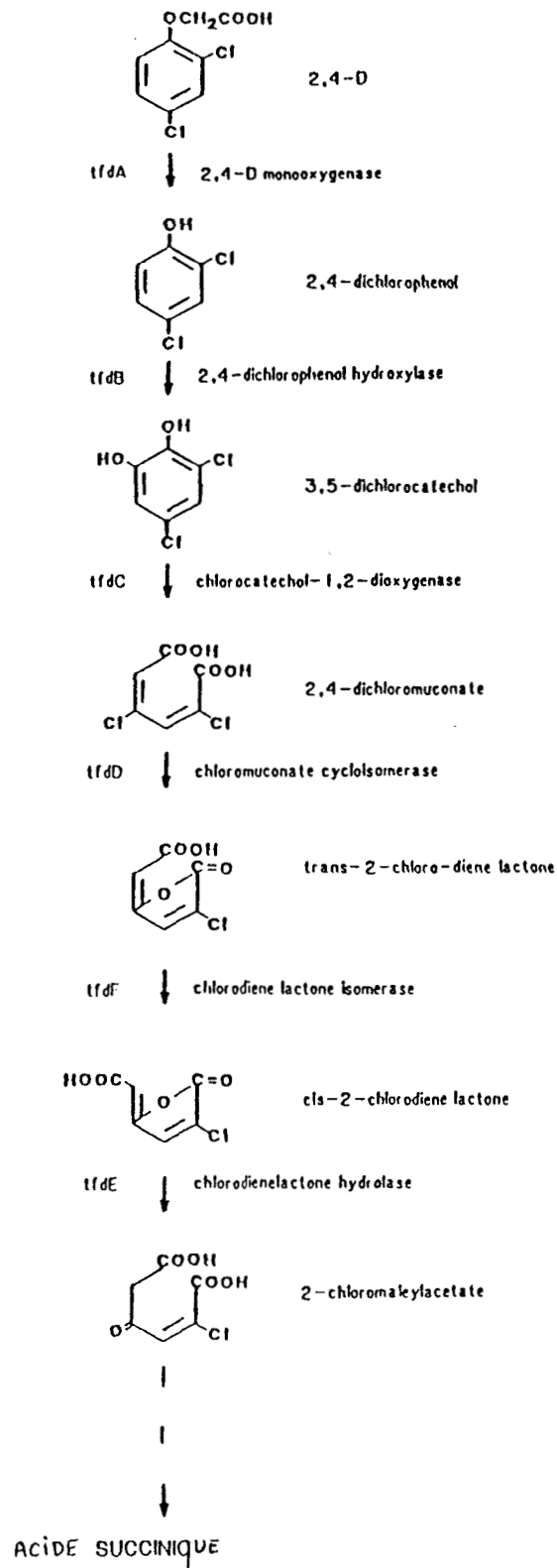


Figure 6 : Voie de dégradation du 2,4-D chez *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (d'après Chaudhry et Huang, 1988)

cette transformation chez *Acinetobacter* sp. Cette protéine formée de quatre sous-unités identiques a une masse moléculaire de 240000, possède un groupement prosthétique à FAD et nécessite la présence d'un co-facteur, le NADPH pour réaliser l'hydroxylation de composés phénoliques. Elle présente aussi une faible spécificité de substrat acceptant en plus du 2,4-dichlorophénol, les 4-chloro- et 4-chloro, 2-méthylphénol. Une telle enzyme est également présente chez une souche d'*A. eutrophus* 335 lorsque celle-ci porte le plasmide pJP4 (Liu et Chapman, 1984). Son poids moléculaire de 224000 est proche de celui de la 2,4-dichlorophénolhydroxylase isolée chez *Arthrobacter* sp.. A la différence de cette dernière la 2,4-dichlorophénolhydroxylase d'*A. eutrophus* est formée de quatre sous-unités de deux tailles différentes.

Des activités hydroxylasiques ont également été signalées chez d'autres souches à l'égard de composés aromatiques donnant lieu à la formation de catéchols après introduction d'un second groupement hydroxyle sur le cycle benzénique. La comparaison de telles enzymes (salicylate hydroxylases, 4-hydroxybenzoate hydroxylases, phénol hydroxylases, orcinol hydroxylases...) dont un inventaire est donné par Beadle et Smith (1982), présentant des activités à l'égard de composés aromatiques avec les phénolhydroxylases impliquées dans la dégradation des composés xénobiotiques, ainsi que l'étude de la spécificité qu'elles présentent à l'égard de ces substrats, naturels ou xénobiotiques, pourrait s'avérer porteuse dans la compréhension des mécanismes d'évolution adaptative de ces enzymes.

Cependant, quelques divergences sont mises en évidence dans les voies de dégradation du 2,4-D dès l'étape de l'hydroxylation du 2,4-dichlorophénol. Shailubhai *et al.* (1983) ont montré qu'à la différence des souches bactériennes, une souche d'*A. niger* dégradant le 2,4-D réalisait la déchlorination du 2,4-dichlorophénol préalablement à l'attaque du cycle en *ortho*. De plus, Evans *et al.* (1971) rapportent un schéma de dégradation du 2,4-D différent chez une souche de *Pseudomonas* sp. I. On notera que tous les intermédiaires de la dégradation de l'herbicide chez cette souche n'ont pas été isolés. La formation de 2-chlorophénol laisse cependant supposer une élimination précoce d'un premier chlorure qui se ferait à partir du 2,4-dichlorophénol voire même du 2,4-D. Ainsi, des divergences sont rapidement mises en évidence dans les schémas de dégradation du 2,4-D chez certaines souches de micro-organismes.

Chez les quelques souches dégradant le 2,4-D sur lesquelles ont été conduites ces études de métabolisme, la plupart des étapes sont conservées. Quelques différences sont cependant présentes aussi avons nous représenté sur les figures 4, 5, 6, et 7, les voies de dégradation du 2,4-D chez *Arthrobacter* sp

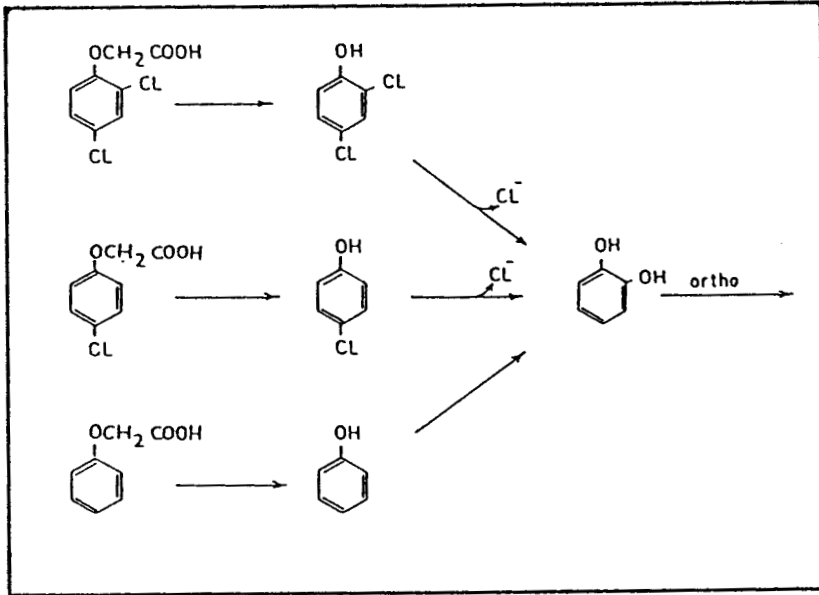


Figure 7 : Voies de dégradation du 2,4-D (a), du 4-CPA (b) et du PA (c) chez *Aspergillus niger* proposées par Shailubhai *et al.* (1983)

(Loos *et al.*, 1967; Bollag *et al.*, 1967, 1968; Tiedje *et al.*, 1969) chez *Pseudomonas* sp I et *Pseudomonas* sp. NCIB 9340 (Evans *et al.*, 1971), chez *A. eutrophus* JMP134 (Don *et al.*, 1985; Streber *et al.*, 1987; Kukor *et al.*, 1989) et enfin chez *A. niger* (Shailubhai *et al.*, 1983).

La minéralisation du 3,5-dichlorocatéchol se fait alors par une coupure du cycle en ortho catalysée par une dichlorocatéchol 1,2 dioxygénase générant un 2,4-dichloromuconate et la déshalogénéation qui suit apparaît comme un évènement fortuit catalysée par une cycloisomérase II, enzyme de lactonisation qui accepte en tant que substrat aussi bien les cis-muconates non substitués que les chloro-cis et les dichloromuconates. C'est au niveau de ces étapes en effet que l'on observe une convergence des voies métaboliques du 2,4-D et du MCPA d'une part et du 3-CB (3-chlorobenzoate) d'autre part. Chez certaines souches telles *A. eutrophus* JMP134, une même chlorocatéchol dioxygénase serait impliquée dans les voies de dégradation de ces différents substrats (Weightman *et al.*, 1984; Don *et al.*, 1985). D'autres auteurs (Ghosal et You, 1988) remettent en question ces résultats après la mise en évidence de deux groupes de gènes distincts, *tfd* et *clc* impliqués respectivement dans la dégradation du 2,4-D et du 3-CB chez *Pseudomonas putida* porteur du plasmide pAC27. Chez cette souche, les enzymes d'oxydation des catéchols se caractériseraient par une très forte spécificité vis à vis du substrat. Ainsi, les enzymes impliquées dans la dégradation du chlorocatéchol chez cet organisme n'accepteraient pour substrat que les monochlorocatéchols.

La rupture du cycle en *ortho* du 2,4-D et du 3-CB suivie de la lactonisation génère des chlorolactones (respectivement des 2,4-dichloro- et 5-chloro-4-carboxyméthylbut-2-ène-4olide), composés instables qui éliminent de façon spontanée un chlorure générant une diènelactone facilement reconnaissable dans le milieu par ses propriétés chromophores (*trans* -2-chloro- ou *cis* - 4-carboxyméthylène but-2-ène-4olide). Les chlorodiènes lactones et diènes lactones seraient dans certains cas toutes deux reconnues par l'hydrolase II qui les accepterait en tant que substrat catalysant ainsi leur conversion en maléylacétate. Chez *A. eutrophus* JMP134, l'intervention d'une *trans* -2-chlorodiène lactone isomérase serait nécessaire, car seule la *cis* -2-chlorodiènelactone serait reconnue par l'hydrolase, l'absence de l'isomérase entraînant la perte du pouvoir dégradant vis à vis du 2,4-D sans affecter pour autant le métabolisme du 3-chlorobenzoate (Loos *et al.*, 1967; Bollag *et al.*, 1967, 1968; Tiedje *et al.*, 1969; Evans *et al.*, 1971; Weightman *et al.*, 1984; Don *et al.*, 1985). Deux alternatives de raccordement des voies de dégradation du 2,4-D aux voies du métabolisme central ont été proposées respectivement par

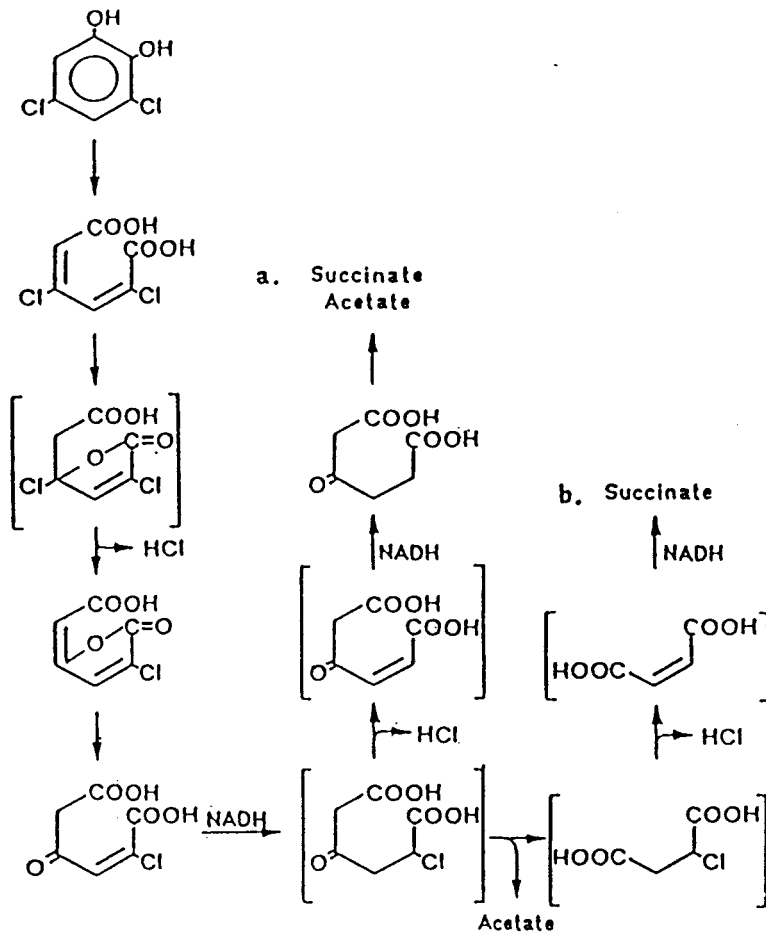


Figure 8 : Jonction entre la voie du 2,4-D et les voies du métabolisme central par rupture du cycle benzenique en *ortho* (d'après (a) Chapman, 1979 et (b) Duxbury *et al.*, 1970)

Chapman (1979, d'après Weightman *et al.*, 1984) et Duxbury *et al.* (1970). Nous les avons représentées sur la figure 8.

De nombreux travaux se sont intéressés à la dégradation du 3-chlorobenzoate (Chatterjee *et al.*, 1981; Chatterjee et Chakrabarty, 1982; Grishchenkov *et al.*, 1983; Pertsova *et al.*, 1984.). La voie de dégradation de ce produit chez *Pseudomonas* sp. B13 est représentée sur la figure 9, les enzymes intervenant dans la biodégradation de ce produit ayant été identifiées chez ce micro-organisme (Reinecke, 1986). On notera, dans ce cas également, une convergence des voies de biodégradation du 3-CB chez diverses espèces microbiennes susceptibles de le dégrader. En effet, Chatterjee et Chakrabarty (1982), ainsi que Zaitsev et Baskunov (1985), rapportent des schémas de dégradation similaires respectivement chez *Pseudomonas putida* et *Acinetobacter calcoaceticus*. Chez *A. eutrophus* JMP134, Weightman *et al.* (1984) remarquent que des enzymes sont impliquées simultanément dans la dégradation du 3-CB et du 2,4-D tandis que Perkins *et al.* (1990) signalent une homologie entre les gènes *tfd* impliqués dans la dégradation du 2,4-D chez *A. eutrophus* et les gènes *clc* impliqués dans la dégradation du 3-CB chez *P. putida* ce qui élargit encore le champ des homologies de fonction pouvant exister entre des enzymes originaires de micro-organismes phylogéniquement éloignés. Cette approche utilisant les techniques de la génétique moléculaire sera ultérieurement développée au cours du deuxième chapitre. Cependant, aucune étude systématique visant à mesurer les homologies entre les gènes codant pour les différentes enzymes de dégradation de cette famille de composés organochlorés voire même la distance phylogénique n'a, à notre connaissance, été réalisée. Quelques études cherchant à comparer des espèces dégradantes deux à deux ont été effectuées mais il reste à approfondir une telle approche. Nous développerons ce point plus en détails au cours du troisième chapitre de cette thèse.

On notera enfin que la plupart des connaissances acquises sur les voies de dégradation de telles molécules concernent des micro-organismes aérobies dégradant les composés xénobiotiques par voie oxydative. Il s'agit, le plus fréquemment, de bactéries dont l'isolement est sans aucun doute favorisé par les techniques de culture employées. Quelques études ont été réalisées sur des micro-organismes anaérobies capables de dégrader certains composés aromatiques chlorés, mais la plupart des bactéries impliquées ont juste été isolées sans qu'aucune étude métabolique ultérieure n'ait été réalisée (Chaudhry et Chapalamadugu, 1991). Il semblerait cependant qu'à l'opposé des voies de dégradation des dérivés aromatiques chlorés mis à jour en condition

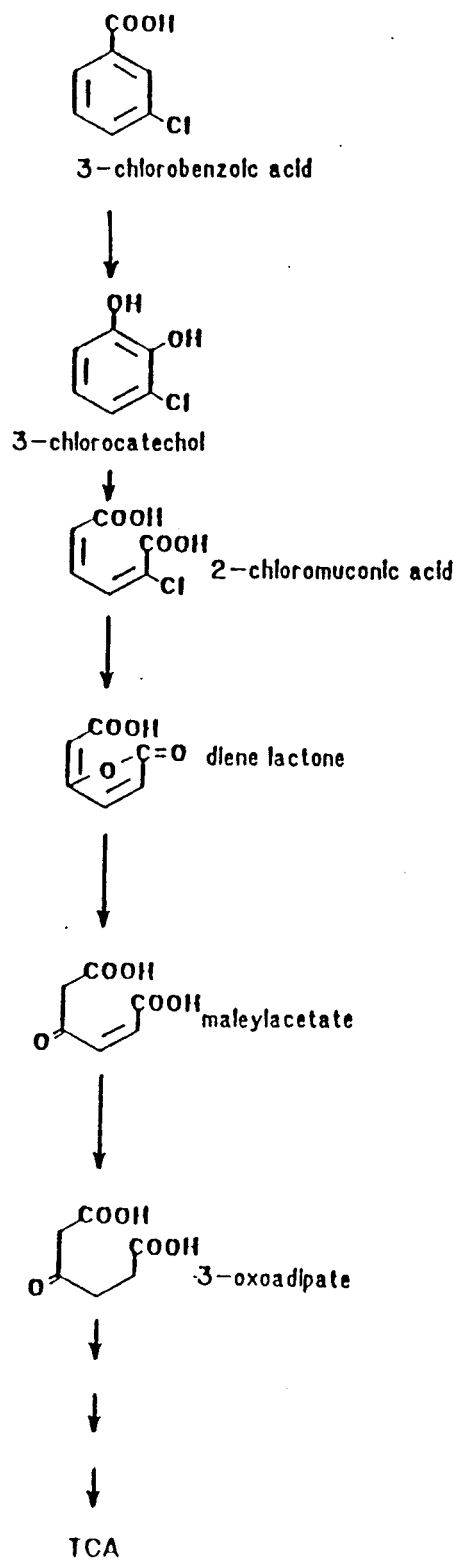


Figure 9 : Voie de dégradation du 3-CB par *Pseudomonas* sp. B13 (d'après Reineke et Knackmuss, 1980)

aérobie, la dégradation en anaérobiose de tels composés commencerait par la déshalogénéation conduisant immédiatement à la formation de composés moins toxiques (Horowitz *et al.*, 1983; Sharak-Genthner *et al.*, 1989a,b).

Quels sont alors les mécanismes de sélection mis en jeu dans les milieux naturels qui conduisent à cette adaptation d'un sol à un produit phytosanitaire? Est-elle réellement le fait de micro-organismes isolés possédant par hasard dans leur génôme, toute la machinerie enzymatique leur permettant de métaboliser n'importe quelle molécule de synthèse même si des analogues de cette molécule sont déjà présents dans l'environnement ? Une telle affirmation conduirait à négliger la spécificité enzymatique ou à supposer infinis les gènes ou leurs capacités d'évolution chez un micro-organisme donné.

Il est couramment admis qu'une molécule xénobiotique n'est dégradée que parce que des micro-organismes développent fortuitement à son égard une activité métabolique liée, d'une part, à une certaine similitude entre la molécule de xénobiotique et les substrats normalement métabolisés par le micro-organisme et, d'autre part, à la faible spécificité d'une enzyme vis à vis de son substrat habituel.

Pour ce qui concerne le 2,4-D, il faut raisonner en termes statistiques

- le 2,4-dichlorophénol est un produit qui existe naturellement dans le sol. Par conséquent, il est probable qu'un nombre important de microorganismes soit capable de le dégrader. Soit p_1 la probabilité qu'un microorganisme soit capable de croître sur 2,4-dichlorophénol

- Les liaisons éther sont également très répandues au sein des composés organiques du sol. Soit p_2 la probabilité qu'un microorganisme possède une enzyme à large spectre de substrat capable de couper une telle liaison.

La probabilité qu'un micro-organisme soit capable de dégrader le 2, 4-D (p) est alors celle qu'il réunisse ces deux propriétés. Si l'on considère ces deux évènements indépendants, alors cette probabilité peut s'écrire sous la forme :

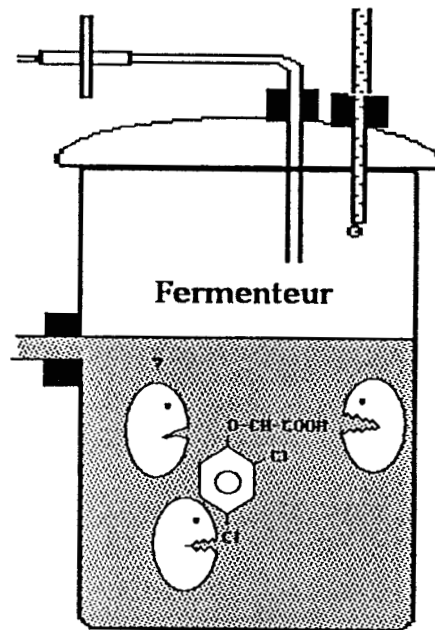
$$p = p_1 \times p_2$$

De plus, le substrat accidentel que constitue un pesticide doit pouvoir provoquer l'induction simultanée ou séquentielle de toutes les enzymes nécessaires à sa biodégradation ou, tout au moins, à la détoxification des métabolites produits par sa transformation dont certains, en s'accumulant dans la cellule, pourraient entraîner sa mort. Ceci nécessite que les enzymes intervenant dans une séquence métabolique "naturelle" présentent toutes un

même degré de non-spécificité vis-à-vis de leurs substrats respectifs, ce qui est peu probable. Aussi, dans le cas général, une telle séquence de biodégradations a plus de chance d'être prise en charge par une association de micro-organismes mettant en commun des capacités métaboliques complémentaires. Autrement dit la biodégradation d'un pesticide devrait être un phénomène initialement accidentel et qui, dans le cas général, conduirait à la constitution de communautés dégradantes partageant une certaine complémentarité enzymatique, sous l'effet de la pression de sélection que constitue l'application plus ou moins répétée du composé xénobiotique dans le sol. Cependant, les mécanismes génétiques qui aboutissent dans certains cas à la sélection d'une souche microbienne susceptible de dégrader seule une molécule xénobiotique sont mal connus. Il est certain que l'émergence de souches microbiennes qui par le fait, se trouvent en concurrence avec des communautés dégradantes, introduit des modifications tant au niveau de la cinétique des processus de dégradation qu'au niveau des réactions vis à vis de variations du milieu environnant. Il est pour l'instant difficile de préciser toutes les conséquences d'un tel système évolutif. Nous tenterons d'aborder ce point sur un exemple de communauté microbienne dégradant le 2,4-D au cours du premier chapitre de cette thèse.

PREMIERE PARTIE

Sélection d'une communauté microbienne dégradant l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique.



I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1-INTRODUCTION

L'histoire de la microbiologie a été façonnée par cette nécessité, établie par Koch en 1881, de travailler en culture pure. Ses techniques se sont développées autour d'une idée fondamentale : éviter les contaminations des cultures microbiennes étudiées. Aussi a-t-on négligé pendant des années l'importance d'associations microbiennes tant au niveau de leurs capacités métaboliques souvent plus larges que celles de souches isolées que des interactions dont elles pouvaient faire l'objet sur un plan génétique. Par conséquent leurs capacités adaptatives et évolutives ont été quelque peu sous-estimées voire ignorées. Si l'on se replace dans le cadre de la dégradation microbienne de certains composés, des pesticides en particulier, il est nécessaire de souligner qu'il est parfois difficile, voire impossible, d'isoler des souches pures capables de dégrader complètement ces produits alors même que leur biodégradabilité est loin d'être mise en doute. Ce phénomène peut s'expliquer par l'intervention dans les sols, de communautés de micro-organismes mettant en commun des capacités métaboliques complémentaires dans le but de dégrader des composés ne pouvant pas être pris en charge isolément par aucun de ces micro-organismes. L'avantage sur un plan sélectif de telles associations est évident puisque chaque membre y trouve un intérêt. Celui-ci se situe sur un plan énergétique tout d'abord puisque les différents membres d'une telle communauté peuvent ainsi accéder à de nouvelles ressources pour lesquelles ils n'entrent pas en compétition avec la microflore du sol. Un autre avantage réside dans la détoxification de telles substances dont la présence à des concentrations trop élevées peut entraîner la mort des cellules. De telles associations microbiennes capables de détoxifier les composés xénobiotiques forment ainsi une nouvelle niche écologique où la survie est rendue possible même en présence de concentrations importantes de telles substances (Senior *et al.*, 1976; Slater et Bull, 1982). Les types d'interactions sont donc relativement nombreux au sein de telles communautés et dépassent largement le cadre de la simple compétition. Slater et Bull, (1982), présentent ainsi une revue des communautés de micro-organismes dégradant des composés xénobiotiques relevés dans la bibliographie des trente dernières années. Nous avons repris sur la figure 1.1 quelques exemples d'associations tirés du travail de ces

composé	référence	composé	référence
trichloroacetic acid	Jensen (1957)	isopropylphenylcarbamate	McClure (1970)
2,2-dichloropropionic acid (Dalapon)	Senior <i>et al.</i> (1976)	cyclohexane	Stirling <i>et al.</i> (1976)
3,6-dichloropicolinic acid (Lontrel)	Lovatt <i>et al.</i> (1978)	cycloalkanes	Beam & Perry (1973, 1974)
3,4-dichloropropionanilide	Slater & Lovatt (1982)	dodecylcyclohexane	Feinberg <i>et al.</i> (1980)
2-(2-methyl 4-chloro) phenoxypropionic acid chlorobenzoate	Bordeleau & Bartha (1968)	n-hexadecane	Schwarz <i>et al.</i> (1975)
	Kilpi (1980)	n-alkanes and other hydrocarbons	Miller & Johnson (1966)
	Hartmann <i>et al.</i> (1979)	crude oil	Horowitz <i>et al.</i> (1975)
	Reineke & Knackmuss (1979)	3-methyl heptane benzoate	Wodzinski & Johnson (1968)
	Knackmuss (1981)		Ferry & Wolfe (1976)
4-chlorobiphenyl	Ncu & Ballschmiter (1977)		Cossar <i>et al.</i> (1981)
4,4'-dichlorobiphenyl	Tulp <i>et al.</i> (1978)	phenol	Pawlowsky & Howell (1973a, b, c)
polychlorinated biphenyls	Clark <i>et al.</i> (1979)	3,5-dihydroxyphenol	Osman <i>et al.</i> (1976)
O,O-diethyl O-2-isopropyl 4-methyl 6-pyrimidinyl thiophosphate (Diazinon)	Carey & Harvey (1978)	styrene	Sielicki <i>et al.</i> (1978)
O,O-diethyl O-p-nitrophenol (Parathion)	Gunner & Zuckerman (1968)	ligno-aromatic compounds	Balba & Evans (1977)
1,5-di-(2,4-dimethylphenyl) 3-methyl 1,3,5-triazapenta 1,4-diene (Amitraz)	Daughton & Hsich (1977)	linear alkylbenzene sulphonates	Healy & Young (1978, 1979)
	Baker & Woods (1977)	alkylphenol ethoxylates	Johanides & Hrsak (1976)
		2-ethyldecyl 1-deca-thoxylate	Phillips & Hollis, cited in Slater & Lovatt (1982)
		nitrosamines	Baggi <i>et al.</i> (1978)
			Watson & Jones (1979)
			Pickaver (1976)

Figure 1.1 : Exemples de composés xénobiotiques dégradés par des associations microbiennes (d'après Slater et Bull, 1982)

auteurs. Il faudrait y ajouter quelques exemples plus récents (Schmidt *et al.*, 1983; Lappin *et al.*, 1985) et en particulier le travail de Haugland *et al.* (1990) concernant l'étude d'une communauté artificiellement reconstituée à partir de deux souches et capable de dégrader simultanément le 2,4-D et le 2,4,5-T. Il en ressort que l'obtention de souches ou de communautés dégradant des composés xénobiotiques dépend largement des techniques de culture utilisées. Slater et Bull, 1982, remarquent en effet que l'utilisation de milieux solides favorise l'isolement de souches pures alors que les techniques d'enrichissement en culture continue aboutissent plus fréquemment à l'obtention de communautés microbiennes. A ce titre la culture continue est sans doute, par rapport à la culture en batch, un meilleur modèle pour l'étude des relations pouvant exister entre les différentes espèces composant la microflore des sols. A un degré de complexité moindre, cette technique doit permettre d'appréhender les grandes lignes du fonctionnement des communautés microbiennes. Elle s'avère en particulier être un bon modèle pour l'étude des modes de sélection et de l'évolution des capacités dégradantes des micro-organismes du sol. Aussi avons-nous choisi cette technique pour aborder l'étude d'une communauté microbienne dégradant l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique.

Dans un premier temps nous allons rappeler les quelques principes théoriques de la culture continue et essayer de formaliser les différents types de mécanismes et d'interactions régissant le comportement d'associations de souches maintenues en chémostat.

2-LE MODELE EXPERIMENTAL. JUSTIFICATION DU CHOIX DE LA CULTURE CONTINUE

L'étude des communautés microbiennes a longtemps été confrontée à différents problèmes d'ordre méthodologique :

- la mauvaise précision des techniques de mesure disponibles
- la complexité des analyses mathématiques qu'il était nécessaire de mettre en œuvre pour mettre en évidence quelques relations significatives.

L'étude des cultures mixtes dans leur environnement, à cause de leur complexité, présente des problèmes particuliers. La compétitivité d'une communauté microbienne complexe dépend de la nature des interactions existant entre ses membres c'est à dire des espèces microbiennes la constituant et il est difficile de tenir compte de l'ensemble des interactions

existant d'une part entre les espèces et leur milieu et d'autre part entre les différentes souches d'une communauté. Quelques simplifications réalisées lors d'études au laboratoire peuvent cependant faciliter le travail de l'expérimentateur :

- en fixant ou contrôlant des paramètres tels que le pH, la température ou le degré d'oxygénation,
- en définissant les composants des milieux de culture employés,
- en réduisant le nombre d'espèces, soit en exerçant une pression de sélection, soit en inoculant un milieu stérile avec des espèces connues.

Subsiste alors le choix entre un système de culture en batch et une culture des micro-organismes en continu : ces deux systèmes de culture sont représentés dans les milieux naturels. On peut cependant remarquer que la plupart des systèmes naturels sont des systèmes ouverts et que, par conséquent, le chémostat peut être considéré comme un système expérimental simplifié pouvant modéliser le renouvellement continu des éléments nutritifs dans la nature. De plus, parce qu'elle permet soit d'instaurer un état d'équilibre, soit de maintenir les variations des variables mesurées dans une échelle restreinte de valeurs, la culture en continu reste la méthode la plus sûre pour obtenir des conclusions valides lors d'expériences réalisées au laboratoire. En effet la culture en batch est à l'origine d'importantes variations de la concentration en substrat, de l'accumulation dans le milieu de culture de déchets du métabolisme et probablement de variations du pH, de la concentration en oxygène dissous ainsi que d'autres paramètres du milieu. L'inconvénient de l'extrême diversité de l'état physiologique des cellules n'est pas non plus présent dans un système de culture en continu, celui-ci autorisant l'évacuation d'une fraction des cellules en permanence. Ainsi, la mortalité cellulaire peut être négligée.

Aussi, avons-nous choisi comme cadre expérimental pour notre étude d'une communauté microbienne dégradant l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, le chémostat.

L'étude du comportement d'une souche ou d'une communauté microbienne en chémostat peut nous renseigner sur les valeurs de certains paramètres biologiques importants tels que le taux de croissance ou la vitesse d'assimilation d'un substrat. Ainsi la compétitivité, la capacité d'adaptation d'une souche ou d'une communauté microbienne à un environnement donné peuvent être évaluées. Mais cette démarche nécessite des allers et retours fréquents entre l'expérimentation et l'interprétation des phénomènes observés. Elle demande en particulier une étape de

formalisation. Celle-ci consiste à traduire, en terme de modèle, des hypothèses sur le fonctionnement des communautés microbiennes, sur les mécanismes d'assimilation des substrats consommés et enfin des interrelations pouvant exister entre ses membres. Dans un deuxième temps, le comportement de ce modèle mathématique du chémostat, doit être confronté à la réalité expérimentale. C'est l'étape de validation.

3-FORMALISATION DU PROBLEME

Depuis l'introduction, par Jacques Monod, en 1942, de la théorie de la culture continue, de nombreux modèles cherchant à formaliser des situations de plus en plus complexes ont été développés. S'intéressant tout d'abord au devenir d'une espèce microbienne cultivée en présence d'un unique substrat limitant ils se sont complexifiés, étape par étape, afin d'essayer de rendre compte de tous les cas expérimentaux rencontrés. Ainsi ils se sont intéressés au devenir des communautés constituées de plusieurs souches poussant sur des milieux complexes, où plusieurs substrats pouvaient être limitants, où une substance nutritive lorsqu'elle était présente dans le milieu de culture à basse concentration pouvait devenir inhibitrice à fortes doses. Les variations des conditions de culture ont été elles-aussi prises en compte. Dans cette première partie, nous allons tenter de rappeler les principales étapes du développement de la théorie du chémostat.

4- CAS D'UNE ESPECE MICROBIENNE CULTIVÉE DANS UN MILIEU OU UN SEUL SUBSTRAT EST LIMITANT. LE MODELE DE MONOD ET SES CONSÉQUENCES

Le chémostat tel qu'il a été défini par Monod, en 1950 (figure 1.2), est une unité de fermentation composée d'un vase contenant un volume fixe de culture v , alimenté en milieu neuf stérile au débit d à partir d'une "nourrice", et muni d'un système de trop-plein permettant d'évacuer constamment une partie du milieu et des cellules au même débit d que le débit d'entrée. Si l'on appelle D , le taux de renouvellement du chémostat défini par :

$$D = \frac{d}{v}$$

et S_e la concentration en substrat (considéré comme limitant pour la croissance de la souche microbienne étudiée) dans la nourrice (donc à

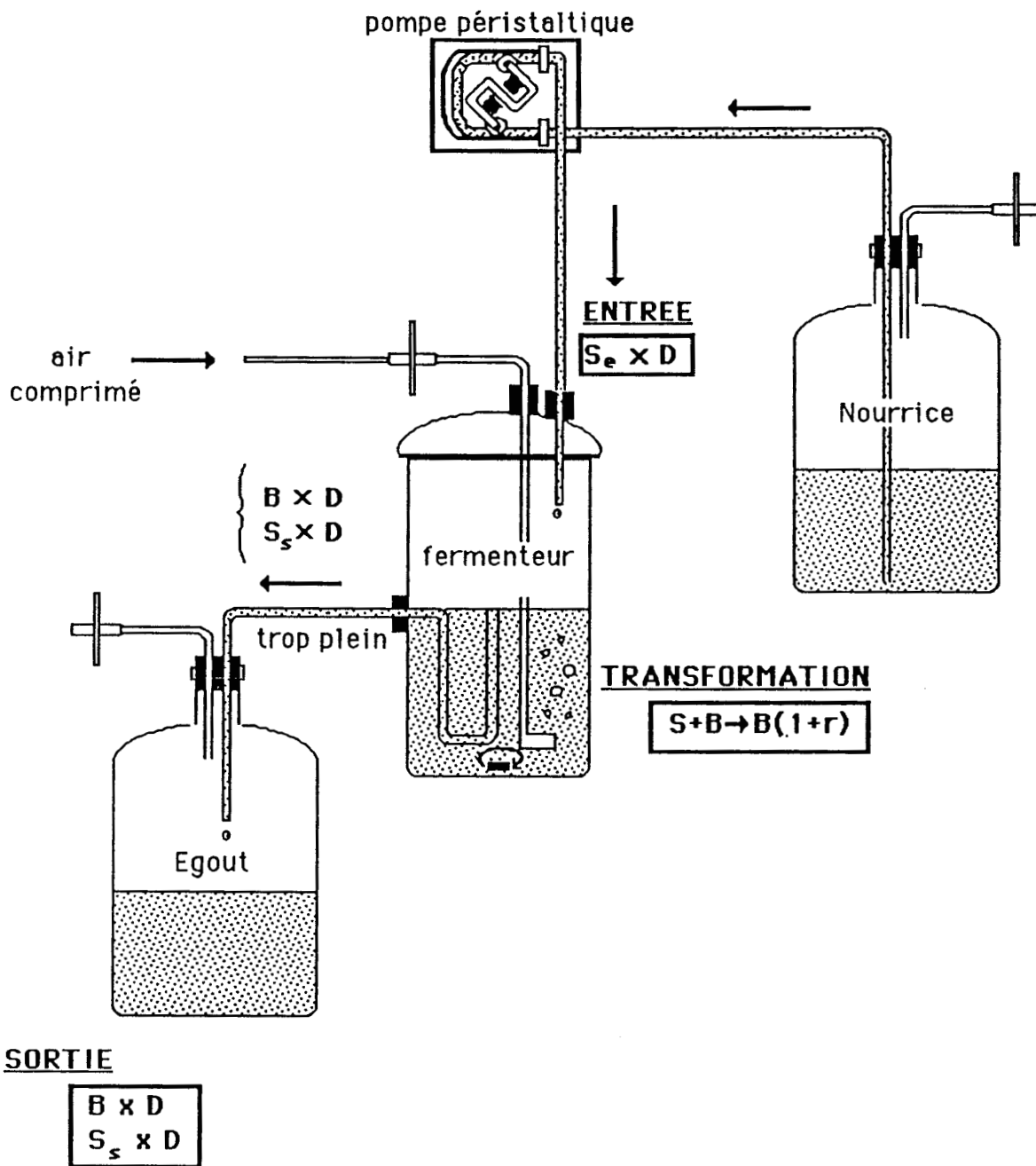


Figure 1.2 : Schéma et représentation mathématique du fonctionnement d'un chémostat.

l'entrée du chémostat), l'entrée du substrat dans le chémostat se fait à la vitesse

$$S_e \times D$$

Au sein du chémostat, le substrat est consommé par les bactéries. La variation de la concentration en substrat S_S est fonction

- de la biomasse B
- de la concentration en substrat disponible dans le chémostat (qui est aussi celle du milieu de sortie) S_S
- de la vitesse maximale V_m à laquelle un individu de l'espèce étudiée (ou une unité de biomasse) assimile une molécule de substrat. V_m est aussi la vitesse de croissance initiale.
- du rendement de conversion du substrat en biomasse r

ce qui s'écrit

$$\frac{dS_S}{dt} = - \frac{V_m}{r} \times f_1(S_S) \times f_2(B) \quad (1)$$

La croissance bactérienne se fait au dépend du substrat:

$$\frac{dB}{dt} = V_m \times f_1(S_S) \times f_2(B) \quad (2)$$

où f_1 et f_2 sont des fonctions respectives de la concentration en substrat et en biomasse dans le chémostat.

Si l'on pose:

$$\mu(S_S) = V_m \times f_1(S_S) \quad (3)$$

$\mu(S_S)$ est alors défini comme taux de croissance instantané de la souche étudiée.

A la sortie du chémostat sont évacués

- des cellules à la vitesse $B \times D$
- du substrat à la vitesse $S_S \times D$

Nous avons représenté schématiquement l'ensemble de ces transformations sur la figure 1.2.

traditionnellement (Monod, 1950) on choisit pour f_1 une fonction de Michaelis-Menten:

$$\left\{ \begin{array}{l} f_1(S_S) = \frac{S_S}{K_m + S_S} \\ f_2(B) = B \end{array} \right. \quad (4)$$

où K_m est une constante d'"affinité" de la souche pour son substrat. C'est aussi la constante de "demi-saturation" car c'est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de consommation du substrat par la souche étudiée est égale à la moitié de sa vitesse maximale.

$$\mu(K_m) = \frac{1}{2} V_m \quad (5)$$

Le bilan final se traduit alors sous la forme des équations suivantes:

Pour la biomasse

$$\frac{dB}{dt} = \boxed{\text{production}} - \boxed{\text{sortie}} \quad (6)$$

$$\frac{dB}{dt} = V_m \times \frac{S_s}{K_m + S_s} \times B - D \times B$$

Pour le substrat

$$\frac{dS}{dt} = \boxed{\text{entrée}} - \boxed{\text{consommation}} - \boxed{\text{sortie}} \quad (7)$$

$$\frac{dS}{dt} = D \times S_e - \frac{V_m}{r} \times \frac{S_s}{K_m + S_s} \times B - S_s \times D$$

D'où, à l'équilibre :

$$\frac{dB}{dt} = \frac{dS}{dt} = 0 \quad (\text{la teneur en biomasse et en substrat ne varie plus})$$

Alors :

$$(7) \Rightarrow D (S_e - S_s) = \frac{V_m}{r} \times \frac{S_s}{K_m + S_s} \times B \quad (8)$$

$$(6) \Rightarrow \text{Soit } V_m \times \frac{S_s}{K_m + S_s} = D, \text{ c'est à dire } \mu(S_s) = D \quad (9)$$

Le taux de croissance de la population est égal au taux de dilution

$$\text{Alors, d'après (8), on a soit : } D = 0, \text{ soit } S_e - S_s = \frac{B}{r} \quad (10)$$

Soit $B = 0$. La biomasse est élue du chémostat. Alors

d'après(8) on a : $S_s = S_e$

Si on laisse de côté les cas triviaux, on obtient :

$$V_m \times \frac{S_s}{K_m + S_s} = D \quad (11)$$

Le temps de génération, étant égal à $\ln(2)/D$, peut ainsi être estimé.

On a alors :

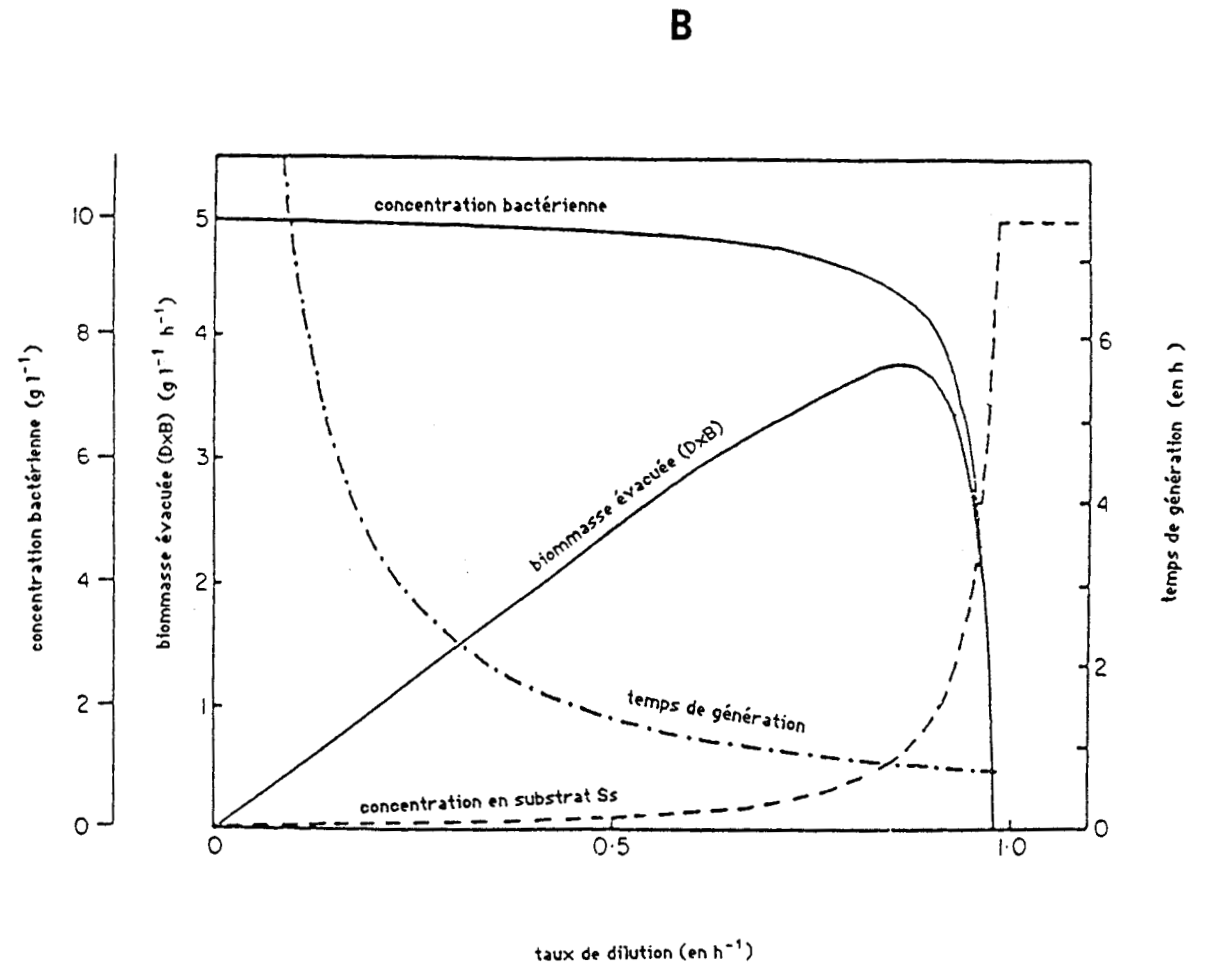
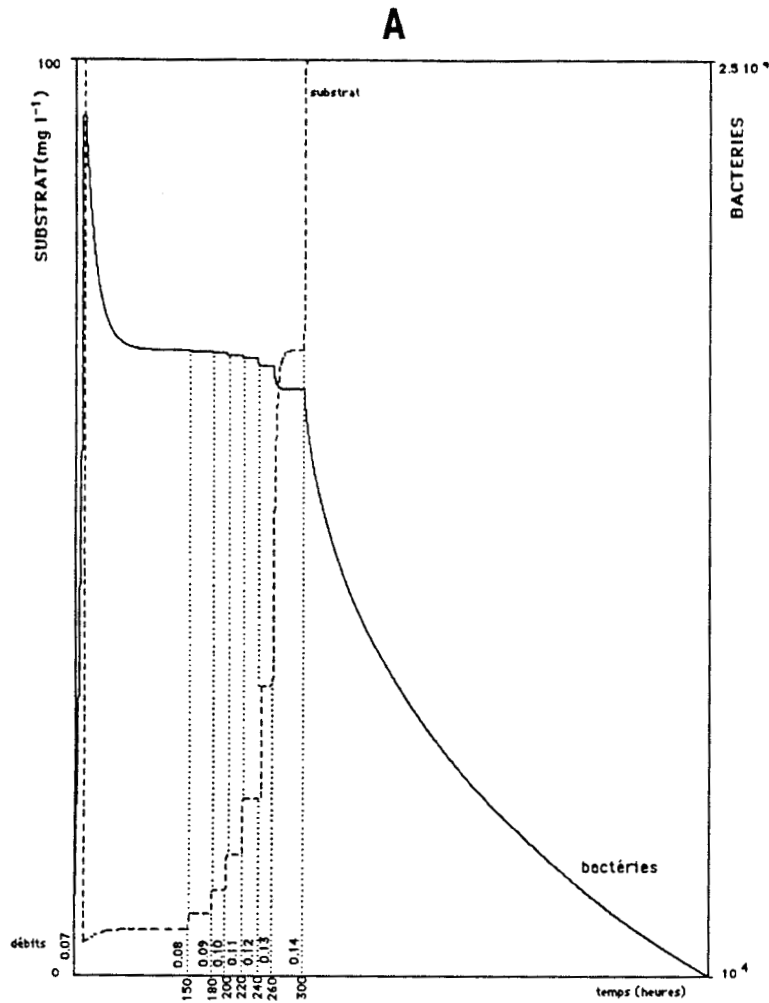


Figure 1.3 : Comportement d'un micro-organisme en culture pure dans un chémostat.

A : états transitoires après modification du taux de dilution. La courbe est obtenue après simulation à partir du modèle de Monod (1950). Les valeurs des paramètres utilisés ont été empruntées à Tyler et Finn(1974). Les conditions expérimentales ont été choisies arbitrairement. Les simulations ont été réalisées à l'aide du logiciel Dynamac Rousseau 1987.

B : évolution des états d'équilibre (biomasse, concentration en substrat, temps de génération) en fonction du taux de dilution.

$$S_s(D) = \frac{D \times K_m}{V_m - D} \quad (12)$$

$$B = r (S_e - S_s(D)) \quad (13)$$

On peut essayer de prévoir l'évolution de la biomasse et de la concentration en substrat dans le chémostat en fonction du débit choisi par l'expérimentateur. Ainsi, le modèle de Monod (1950) prévoit que :

-1- La concentration en substrat dans le chémostat à l'équilibre est indépendante de la biomasse, de la concentration en substrat du milieu d'alimentation et même du rendement de la conversion du substrat en biomasse (d'après 12).

-2- L'ajustement des résultats de mesures de la concentration en substrat dans le chémostat en fonction du débit appliqué à l'expression théorique écrite en (12) permet d'estimer les paramètres V_m et K_m d'une souche pure.

-3- $S_s(D)$ est une fonction croissante de D (d'après 12)

$$\frac{\partial S_s(D)}{\partial D} > 0$$

Lorsque l'on augmente le débit

- la concentration en substrat dans le chémostat croît
- la biomasse diminue (d'après 13)

Ces propriétés sont illustrées sur les courbes présentées sur la figure 1.3 (a et b) obtenues par simulation du comportement du modèle différentiel présenté ci-dessus (logiciel Dynamac; Rousseau, 1987; Pavé *et al.*, 1988). Les valeurs des paramètres utilisés ont été empruntées à la bibliographie : Tyler et Finn, (1974). Les conditions initiales ont été choisies arbitrairement.

5- VARIANTES AU MODELE DE MONOD (1952)

Ces résultats théoriques ne s'accordent pas toujours aux comportements des chéostats observés dans la réalité. Aussi d'autres modèles ont été développés. Les variantes au modèle de Monod (1950) présentées dans la bibliographie peuvent être classées en plusieurs groupes :

- Celles qui conservent le mécanisme de base présenté par Monod et jouent sur les fonctions f_1 et f_2 (présentées en (4)) en introduisant des formulations plus complexes et/ou de nouveaux paramètres.

- celles qui prennent en considération des comportements plus complexes tels que l'adhésion aux parois, l'énergie de maintenance, ou l'agrégation des micro-organismes (hétérogénéité de la répartition spatiale).

5.1 Les dérivés du modèle de Monod

La recherche de modèles de croissance bactérienne plus sophistiqués a été motivée par des résultats imprédictibles à partir du modèle proposé par Monod en 1942. Diverses généralisations et spécialisations de ce modèle sont disponibles dans la bibliographie. On trouvera un grand nombre de ces expressions et leurs propriétés détaillées dans le travail de Roels (1983) et Comby (1989). Nous ne redonnerons pas par conséquent ici une liste exhaustive des modèles de croissance bactérienne mais nous rappellerons juste, à titre d'illustration, quelques expressions mathématiques qui nous ont paru intéressantes parce qu'elles traduisent une approche mécaniste plus détaillée de la croissance bactérienne.

Les résultats d'études de la croissance d'*Aerobacter aerogenes* en chimostat ont montré que le taux de croissance spécifique $\mu(S_s)$ était fonction de la densité de la population et non pas seulement de la concentration en substrat limitant. Ainsi Contois, en 1959, proposait -il pour le taux de croissance intrinsèque l'expression suivante:

$$\mu(S_s) = \frac{V_m \times S_s}{K_m B + S_s} \quad (14)$$

Cette dernière expression tient compte de l'existence d'une compétition intraspécifique entre les individus d'une même souche microbienne, phénomène négligé dans l'expression proposée par Monod. L'expression de Contois, implique en effet que lorsque la biomasse augmente, le taux de croissance de la souche diminue. Mais sans doute parce qu'elle entraînait une difficulté plus grande dans l'étape d'estimation des paramètres, cette formulation du taux de croissance a été peu utilisée. Rappelons que dans les années cinquante, l'estimation des paramètres V_m et K_m se faisait par linéarisation de l'expression de Monod (Gaudy *et al.*, 1967).

$$\frac{1}{\mu(S_s)} = \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{S_s} + \frac{1}{V_m} \quad (15)$$

L'introduction dans l'expression du taux de croissance d'une seconde variable s'est faite à l'heure où les algorithmes d'ajustement non linéaires en étaient à leurs balbutiements. Il reste à ajouter que l'introduction d'un paramètre supplémentaire, même s'il a une importance biologique significative, n'est justifié au niveau mathématique que s'il améliore sensiblement l'adéquation du modèle aux résultats ce qui n'est pas toujours le cas.

C'est sans doute pour les mêmes raisons que le modèle proposé par Moser en 1957, qui se présente comme une généralisation du modèle de Monod n'a pas été non plus retenu. L'expression du taux de croissance proposée par cet auteur fait intervenir un paramètre supplémentaire dont, de plus, l'interprétation biologique est difficile :

$$\mu(S_s) = \frac{V_m \times (S_s)^x}{K_m + (S_s)^x} \quad (16)$$

5.2 Introduction de l'énergie de maintenance

Jusqu'à présent, nous avons supposé constant le rendement de croissance (r) introduit en (1). Cette hypothèse apparaît comme une simplification de ce qui est réellement observé dans la réalité. Dans la pratique, une variation du rendement de transformation du substrat en biomasse (r) en fonction du taux de croissance peut être observée (Pirt, 1965). Celui-ci-ci est attribué à la consommation à taux constant d'énergie (sous forme de substrat) pour la maintenance (ΔS)_M à laquelle vient s'ajouter la consommation d'énergie pour la croissance cellulaire (ΔS)_C. Le rendement énergétique d'une production ΔB de biomasse s'écrit alors :

$$r = \frac{\Delta B}{(\Delta S)_M + (\Delta S)_C} \quad (17)$$

(On retrouve le cas précédent en annulant le terme correspondant à l'énergie de maintenance).

Ainsi il apparaît que plus faible est le taux de croissance d'un micro-organisme, plus importante est la part de l'énergie consommée qui est utilisée pour la simple maintenance de celui-ci. Ce terme apparaît en particulier d'une importance capitale lorsque la concentration en substrat est

faible. Le "vrai" rendement de croissance (substrat produisant effectivement de la biomasse) est alors défini par:

$$r_c = \frac{\Delta B}{(\Delta S)_c} \quad (18)$$

Herbert (1958 *in* Pirt, 1965), a proposé alors l'expression suivante pour traduire l'évolution de la biomasse dans le chémostat :

$$dB = (\mu(S_s) - m) \times B \quad (19)$$

où $\mu(S_s)$ est le taux de croissance instantané et m le déficit (supposé constant) de biomasse dû à l'utilisation des ressources pour la maintenance. Cette déperdition d'énergie se retrouve également au niveau d'une surconsommation de substrat :

$$\frac{dS_s}{dt} = \left(\frac{dS_s}{dt} \right)_m + \left(\frac{dS_s}{dt} \right)_c \quad (20)$$

où les deux termes introduits représentent respectivement la quantité de substrat consommé pour la maintenance (m) et la quantité de substrat consommé pour la croissance (c).

En posant $\left(\frac{dS_s}{dt} \right)_c = -\mu(S_s) \times B / r_c$ et $\left(\frac{dS_s}{dt} \right)_m = -m \times B$ (21)

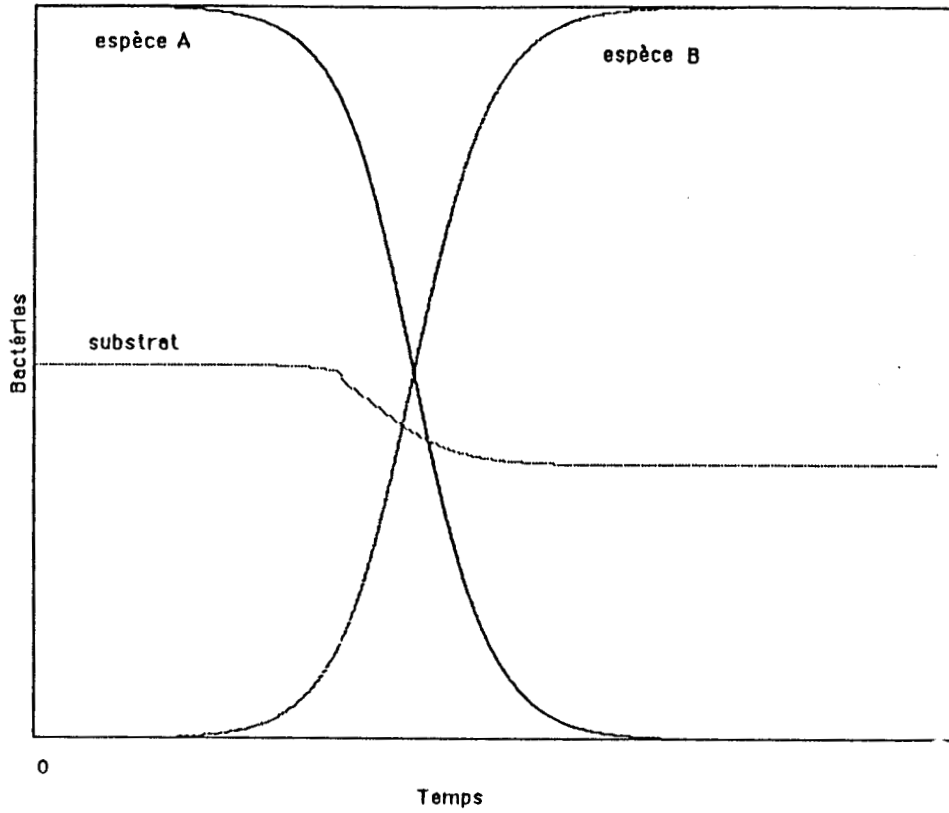
on obtient une relation permettant de calculer le terme correspondant à l'énergie de maintenance et le rendement de croissance.

$$1/r = m/\mu(S_s) + 1/r_c \quad (22)$$

5.3 Introduction de l'hétérogénéité spatiale : l'adhésion des micro-organismes aux parois

Certains écarts au principe d'exclusion ont également été attribués à une mauvaise agitation du milieu de culture et à l'adhésion des micro-organismes à la paroi du chémostat (Topiwala et Hamer, 1971), en d'autres termes, à une hétérogénéité de la répartition, dans l'espace, des micro-organismes et du substrat. La formation de flocules est un phénomène

2



1

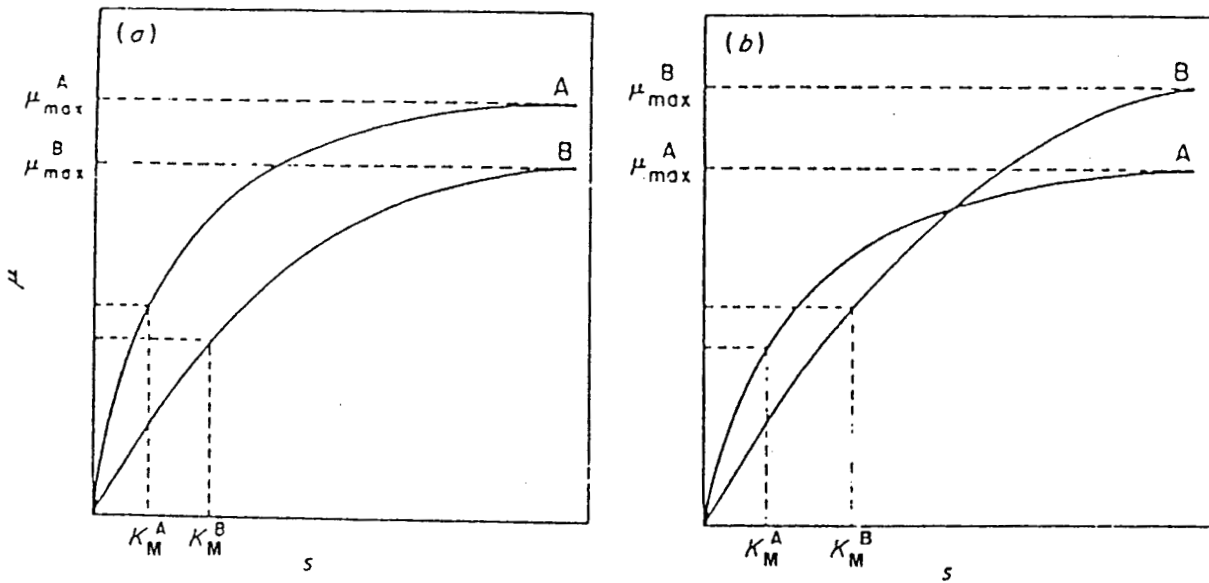


Figure 1.4 : Compétition entre deux souches A et B cultivées en chémostat.

1 : comparaison des paramètres μ_{\max} et K_m

a : $\mu_{\max}^A > \mu_{\max}^B$ et $K_m^A < K_m^B$

b : $\mu_{\max}^B > \mu_{\max}^A$ et $K_m^A < K_m^B$

2 : Issue de la compétition; $K_m^A = K_m^B$ et $\mu_{\max}^A < \mu_{\max}^B$

couramment observé en culture continue pouvant introduire un gradient de concentration du substrat entre le milieu de culture et le centre de l'agrégat bactérien. Ce phénomène, s'avère particulièrement intéressant lorsque le substrat utilisé présente une certaine toxicité à l'égard de la culture bactérienne et dans ce cas, une croissance peut être encore observée à des concentrations relativement élevées en substrat. Il est alors nécessaire d'introduire une formulation particulière pour tenir compte du phénomène. Topiwala et Hamer proposent alors la correction suivante :

Soit K la quantité de cellules (que ces auteurs supposent constante) attachée à la paroi du récipient où se trouve la culture. Dans le chémostat à l'équilibre l'égalité du taux de croissance au taux de dilution s'écrit alors :

$$D.B = \mu(S_s) \times (B + K) \quad (23)$$

Mais c'est historiquement le modèle de Monod, par sa simplicité, qui a été conservé et a servi à la construction d'expressions plus complexes, et notamment, celles s'intéressant aux cultures mixtes.

6-GÉNÉRALISATION AU CAS OU PLUSIEURS ESPECES RENTRENT EN COMPÉTITION VIS À VIS D'UN MEME SUBSTRAT.

6.1 Modélisation de la culture mixte en chémostat

Powell, en 1958 semble avoir été parmi les premiers à s'intéresser au comportement d'une culture mixte en chémostat. Cet auteur étudiait les facteurs nécessaires à l'apparition et surtout au maintien d'un contaminant dans une culture continue. Ainsi il généralisait le modèle de Monod à deux souches et établissait les lois de la compétition interspécifique : le mutant ou le contaminant qui apparaît dans le chémostat ne peut se maintenir que si ses taux de croissance et la constante de saturation obéissent à certaines relations (figure 1.4). Dans ce cas, il exclut la souche sauvage du chémostat. Renneboog-Squilbin, 1967, aboutit à des conclusions différentes. Il affirme en particulier que dans certaines conditions une coexistence, entre le mutant (le contaminant) et la souche sauvage, est possible. Mais il suppose lors du développement de ses calculs, que le taux de croissance est constant quelle que soit la concentration en substrat ce qui restreint la validité de son

approche compte-tenu des constatations de nombreux résultats expérimentaux. Meers, en 1971 étudie expérimentalement l'effet du taux de dilution sur l'issue d'une compétition en chémostat au sein d'une culture mixte de *Bacillus subtilis* et *Torula utilis*. Il faut cependant attendre 1972 (Janash et Velkamp) pour trouver une approche plus systématique, plus rigoureuse du comportement du modèle proposé par Powell en 1958 : le comportement théorique d'un chémostat où deux ou plusieurs espèces rentrent en compétition vis à vis d'un même substrat a été étudié par Taylor et Williams, 1975; Hsu *et al.* 1976 et Hsu *et al.*, 1981. Ces auteurs se sont intéressés à l'issue d'une compétition en chémostat entre plusieurs espèces lorsqu'un seul substrat était limitant, les autres éléments nutritifs étant en excès dans le milieu de culture. Ils généralisent le modèle de Monod à plusieurs souches en appliquant le bilan établi précédemment à chaque souche i présente dans le milieu.

Pour chacune des souches présentes, on a :

$$\frac{dB_i}{dt} = \boxed{\text{production}} - \boxed{\text{sortie}} \quad i = 1 \text{ à } N \quad (24)$$

$$\frac{dB_i}{dt} = V_{m_i} \times \frac{S_s}{K_{m_i} + S_s} \times B_i - D \times B_i$$

et la consommation du substrat s'écrit alors :

$$\frac{dS}{dt} = \boxed{\text{entrée}} - \boxed{\text{consommation souche n°1}} - \dots - \boxed{\text{consommation souche n°N}} - \boxed{\text{sortie}} \quad (25)$$

$$\frac{dS}{dt} = D \times S_e - \frac{V_{m_1} \times \frac{S_s}{K_{m_1} + S_s} \times B_1}{r_1} - \dots - \frac{V_{m_N} \times \frac{S_s}{K_{m_N} + S_s} \times B_N}{r_N} - S_s \times D$$

A l'équilibre on a:

-pour la biomasse : $\frac{dB}{dt} = 0$

-pour le substrat : $\frac{dS}{dt} = 0$

On obtient ainsi $N+1$ équations. Les équations traduisant la stabilité des souches donnent N valeurs de S_s pour lesquelles l'équilibre est établi :

$$S_s(i) = K_{m_i} \frac{D}{V_{m_i} - D} \quad (26)$$

La souche pour laquelle cette valeur est la plus faible est sensée l'emporter sur les autres "excluant" du chémostat. Nous avons illustré ces résultats sur la figure 1.4. Nous remarquerons que la concentration en substrat nécessaire au

maintien de la souche i dans le chémostat est égale au produit de la constante de demi-saturation (K_m) par le rapport du taux de disparition de la souche (D) au taux absolu de croissance de cette même souche ($V_m - D$) dans le chémostat. Le taux de disparition D étant identique pour toutes les souches lorsque la mortalité est négligée (la disparition des souches n'est due qu'au renouvellement du milieu de culture), l'organisme "vainqueur" sera donc celui pour lequel la constante de Michaelis-Menten sera la plus faible rapportée à son taux de croissance intrinsèque dans le chémostat (Hsu et al, 1977). Il est important de noter que selon le modèle proposé, l'issue de la compétition est indépendante du nombre initial des compétiteurs aussi bien que de leur rendement de croissance.

6.2 Remarques à propos du principe d'exclusion

De nombreuses observations expérimentales contredisent cette conclusion. Mais il apparaît que les auteurs, au vu des résultats de leurs travaux se contentent de mettre en cause le principe d'exclusion alors qu'ils utilisent un modèle trop simple pour les phénomènes observés. D'importantes remarques doivent être faites ici à la lumière de travaux modulant la force de ce résultat théorique trop bien connu et quelquefois mal interprété. Souvent présenté sous le nom de principe d'exclusion compétitive, terme introduit par Gause en 1934, ce résultat ne reste vrai et donc applicable que si les hypothèses utilisées pour la construction du modèle défini ci-dessus sont respectées (je citerai une croissance michaelienne, une compétition simple entre les souches, l'absence d'inhibition par tout type de substance y compris le substrat, l'absence de prédation, de lyse cellulaire...) Il est rare que l'ensemble de ces conditions soit vérifié par l'expérience. Des modèles théoriques plus récents ont donc tenté de se rapprocher des conditions expérimentales et de rendre compte des faits observés. Nous allons rappeler ici quelques résultats d'études théoriques montrant que l'introduction d'un paramètre supplémentaire dans l'expression définie ci-dessus, rendant compte de l'existence de phénomènes ou d'interactions plus complexes suffit, la plupart du temps, à prévoir la coexistence.

6.3 Etudes théoriques de la coexistence.

La démarche théorique de Smith, (1982) aboutit à des conclusions intéressantes que l'expérimentateur ne devrait pas ignorer. Etudiant le comportement théorique d'un système à trois équations différentielles modélisant le comportement de deux espèces microbiennes en compétition, cultivées en chémostat sur un substrat limitant et supposant que la croissance des deux souches est de type michaelienne l'auteur introduit, à l'aide d'une fonction sinusoïdale, des variations périodiques de la concentration en substrat du milieu d'alimentation. Il montre alors que dans le cas où l'amplitude des variations introduites est comprise entre deux valeurs limites, la coexistence des deux populations microbiennes en compétition doit être attendue.

De même, Grenney *et al.* (1973) remarquent sur des simulations du comportement de populations d'algues en compétition vis à vis de l'azote dont la concentration dans le milieu est soumise à des variations nycthémérales, que le devenir des communautés dépend de l'amplitude des variations périodiques du substrat : lorsque l'amplitude des variations est petite, l'une des espèces exclut ses compétitrices. Mais dès que l'amplitude des variations atteint une certaine limite, c'est la coexistence des espèces qui est observée. Le principe d'exclusion est de nouveau vérifié lorsque l'on augmente encore l'amplitude des variations mais c'est l'espèce dominante dans le premier cas qui disparaît alors du milieu. Ainsi, comme l'affirment ces auteurs : " Les continues variations des conditions environnementales au cours du temps peuvent être un facteur majeur contribuant au phénomène observé de la coexistence de nombreuses espèces dans ce qui apparaît être un même environnement isotrope". Stewart et Levin (1973) aboutissent à des conclusions similaires.

Enfin, Butler & Wolkowicz (1987) étudient le comportement d'un modèle tenant compte de l'inhibition de l'activité des souches par le substrat lorsque celui-ci est présent à forte concentration. Ces auteurs montrent alors que dans certains cas, si l'inhibition par le substrat est trop importante, non seulement la coexistence est observée mais de plus, aucun des organismes en compétition ne peut survivre en l'absence de ses rivaux. Ainsi, une coopération peut-elle être mise en place entre des micro-organismes en situation de compétition. La nécessité de la détoxification d'un substrat, même si celui-ci est la seule ressource disponible, oblige en quelque sorte les

micro-organismes à coopérer. Ce cas de figure pourrait expliquer la coexistence de souches dégradant un même substrat (voire la sélection de souches initialement dépourvues de capacité dégradante et ayant acquis cette propriété au cours du temps) lorsqu'une culture continue est alimentée par un substrat présentant une certaine toxicité à l'égard des micro-organismes qui le dégradent. Ainsi, si l'on rapproche ce résultat théorique des résultats obtenus par Senior *et al.*, 1976, on peut proposer une explication à la sélection d'un quatrième utilisateur primaire du Dalapon observée au bout de 2900 heures de cultures dans une communauté où trois micro-organismes dégradant ce substrat sont déjà présents.

7 LORSQUE PLUSIEURS ESPECES ENTRENT EN COMPÉTITION POUR PLUS D'UN SUBSTRAT LIMITANT

L'expression proposée par Monod pour le taux de croissance a été généralisée à plusieurs substrats. Meege *et al.* (1972) ont proposé l'expression suivante pour modéliser l'évolution du taux de croissance lorsqu'une souche était cultivée en chémostat sur un milieu où plus d'un élément était limitant :

$$\mu(S_s) = V_{m1} \times \frac{S_{s1}}{K_{m1} + S_{s1}} \times V_{m2} \times \frac{S_{s2}}{K_{m2} + S_{s2}} \quad (27)$$

On reconnaît dans la formulation précédente le produit de deux taux de croissance indépendants (tels qu'ils ont été définis en (4)) d'une souche pour deux substrats différents S1 et S2.

Dans les situations où plus d'un élément nutritif est limitant, il devient nécessaire d'établir le rôle des différentes substances sur la croissance et les interactions pouvant exister entre ces substances une fois absorbées par les souches, dans les mécanismes de la croissance. Leon et Tumpson, 1975, ont distingué deux classes principales de substances nutritives : les substances "complémentaires" (une source de carbone et une source d'azote) et les substances pouvant se substituer l'une à l'autre (deux sources carbonées métabolisables).

Hsu *et al.*, 1981 se sont intéressés au cas de substances "complémentaires" : pour n souches entrant en compétition pour t substrats, on peut écrire pour chacune des n souches présentes, $i = 1$ à n ; $j = 1$ à t :

$$\frac{dB_i}{dt} = \left(\frac{V_{m_{i1}} S_{s1}}{K_{m_{i1}} + S_{s1}} \times \frac{V_{m_{i2}} S_{s2}}{K_{m_{i2}} + S_{s2}} \times \dots \times \frac{V_{m_{it}} S_{st}}{K_{m_{it}} + S_{st}} \right) \times B_i - D \times B_i \quad (28)$$

Soit encore:

$$\frac{dB_i}{dt} = \left[\prod_{1 \leq j \leq t} \left(\frac{V_{m_{ij}} S_{sj}}{K_{m_{ij}} + S_{sj}} \right) - D \right] \times B_i \quad ; i=1,2,\dots,n, \quad (29)$$

Pour chacun des t substrats, $j=1, t$:

$$\frac{dS_{sj}}{dt} = (S_{e_j} - S_{s_j}) \times D - \sum_{i=1}^n \left(\frac{V_{m_{ij}}}{r_{ij}} \frac{S_{sj}}{K_{m_{ij}} + S_{sj}} \times B_i \right) \quad ; j=1,2,\dots,t, \quad (30)$$

Il est possible d'appliquer dans ce cas la même démarche que celle que nous avons exposée lorsque plusieurs souches étaient supposées être en compétition vis à vis d'un seul substrat limitant. C'est ainsi que Levin (1970), défini un principe d'exclusion étendu à plus d'une espèce entrant en compétition pour plus d'un substrat limitant. Son étude peut être considérée comme une généralisation de l'approche précédente dans le cas où le taux de croissance est une fonction quelconque de la concentration en substrat. Il aboutit alors à la conclusion suivante : "Plusieurs espèces peuvent coexister dans la mesure où leur croissance est limitée par des substrats différents ". L'énoncé de ce principe est plus connu sous la forme proposée par Levins (1968 *in* Stewart et Levin, 1973) : "Le nombre d'espèces ne peut excéder le nombre des substrats". Ce principe ne reste encore applicable qu'au cas de la simple compétition entre les espèces en interaction.

Il apparaît ainsi que même les représentations mathématiques les plus simples de la dynamique des populations en biologie sont par essence composées d'un nombre rapidement élevé d'équations différentielles non linéaires. Par conséquent, les "points d'équilibre" de tels systèmes ne sont pas forcément des points comme ce serait le cas pour des systèmes linéaires. Ils peuvent aussi bien être des cycles limites (May & Leonard, 1975). Ces auteurs ont montré, en étudiant un système modélisant l'évolution de trois espèces en compétition, que celui-ci pouvait développer des oscillations aperiodiques des trois populations d'amplitude liée, croissant avec le temps. Plus généralement, Smale, (1976), a montré que tout système composé de plus de quatre populations en compétition vis à vis d'une même proie (donc un même substrat), pouvait présenter des comportements chaotiques. Plus récemment, on trouve, dans la bibliographie des systèmes modélisant la dynamique de trois espèces en compétition présentant ce type de

comportement (May, 1975, Samardzija & Greller, 1988). Sans entrer dans les détails mathématiques qui n'auraient pas leur place ici, on pourra retenir de tout cela l'idée suivante : tout système différentiel composé de trois équations au moins et présentant un degré de non-linéarité suffisant peut exhiber un comportement étrange de type chaotique. Ce qui, traduit en termes biologiques, signifie que toute communauté d'au moins trois espèces en interaction (ou même un système de deux espèces en compétition vis à vis d'un substrat...) présentant des relations entre ses membres suffisamment complexes peut théoriquement développer des dynamiques pouvant paraître aléatoires à l'expérimentateur.

Le cas du chémostat, où deux (ou plus) espèces microbiennes rentrent en compétition vis à vis d'un même substrat, s'intègre à cette problématique. On peut cependant reprocher parfois à la bibliographie théorique quelques hypothèses injustifiées sur le plan expérimental : ainsi, un équivalent du modèle de Monod écrit sous forme d'une expression "logistique" proche de celle proposée par Verhulst (1838) a été présenté par Smouse (1980). Pour ce faire il utilise les approximations suivantes. L'auteur suppose que la concentration du substrat à l'entrée du chémostat est analogue à la concentration en substrat à la sortie de celui-ci et d'autre part, que la biomasse est proche de zéro ce que quoiqu'il dise n'est vrai qu'aux conditions initiales juste immédiatement après l'inoculation d'un chémostat. Un certain recul doit donc être pris par rapport à certains énoncés théoriques Ceci ne signifie pas qu'il faut rejeter le principe d'exclusion dans son ensemble. Les modèles exposés ont de grandes chances de décrire correctement le comportement de deux souches microbiennes proches ou d'une souche et de son mutant lorsque celles-ci sont cultivées ensemble dans un même chémostat. Il est peu probable que les modèles exposés, qui se trouvent être aussi parmi les plus simples rencontrés dans la bibliographie théorique, rendent compte de situations complexes telles qu'elles sont rencontrées dans les situations expérimentales. Cependant, la connaissance de leur comportement mathématique et surtout de leur traduction en terme d'implications biologiques peut permettre de tester des hypothèses de fonctionnement énoncées sur des objets d'étude malgré leur complexité.

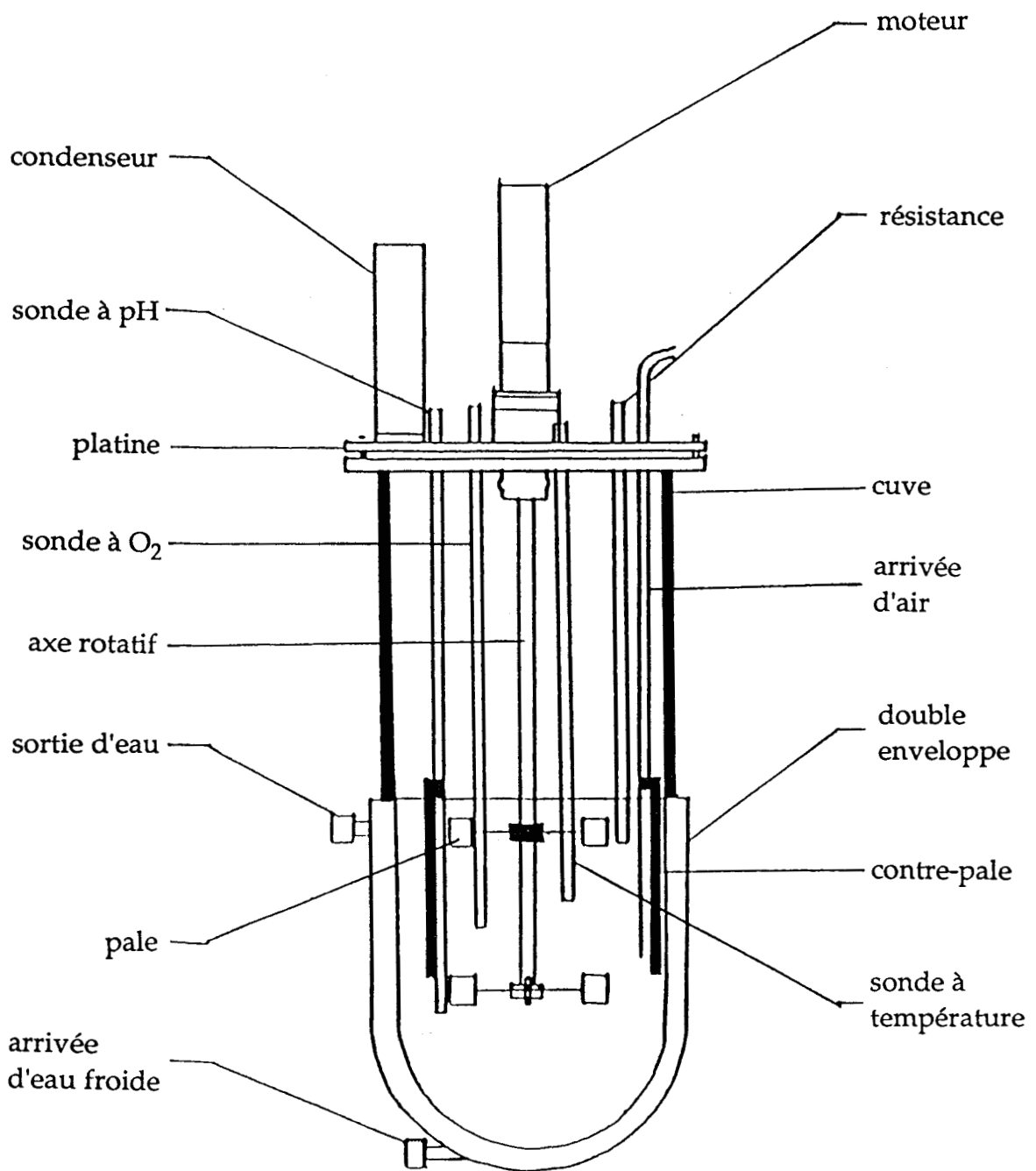


Figure 1.5 : Description du fermenteur Biolafitte; différents points de contrôle.

II. APPROCHE EXPERIMENTALE

A MATÉRIEL ET MÉTHODES

1- MATÉRIEL DE FERMENTATION UTILISÉ POUR LA SÉLECTION DE LA COMMUNAUTÉ DÉGRADANTE

1.1 Description du chémostat

Un chémostat (Biolaffite) de 2 litres équipé d'une sonde de pH et d'une sonde à oxygène dissous (Ingold) stérilisables, ainsi que d'un mécanisme d'agitation et d'une double enveloppe permettant de réguler la température de la cuve a été utilisé pour notre étude. Une entrée d'air comprimé munie d'un filtre Millex-FG50 (diamètre des pores 0,2 μ) permettait de maintenir une oxygénation suffisante dans le chémostat (figure 1.5). Un coffret de régulation (Biolaffite) équipé d'un enregistreur autorisait le suivi de la température et de l'oxygène dissous, ainsi que la régulation automatique du taux d'aération et de la température autour d'un point de consigne (respectivement 90% du taux de saturation en oxygène du milieu et 20°C). La vitesse de rotation des pales est fixée à 200 tours par minute. Avant l'expérimentation, l'ensemble du dispositif est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 30 minutes.

L'alimentation en continu du chémostat était assurée par une pompe péristaltique (Watson Marlow 502S/R) à vitesse variable. Un collecteur de fractions (Microcol TDC 80 Gilson) relié à une pompe péristaltique Watson-Marlow 101F effectuait un prélèvement toutes les 20 à 40 minutes dans des tubes à hémolyse de 8 ml (toutes les 2,5 à 4 heures au début de l'expérience). Le débit des prélèvements étant inférieur au taux d'alimentation du chémostat, le volume de liquide de celui-ci (un litre) était maintenu fixe grâce à une sonde d'évacuation à niveau constant reliée à une pompe péristaltique Watson Marlow 502S à vitesse variable. L'introduction de 1,2 ml d'HCl 0,1N dans les tubes de prélèvement permettait d'arrêter l'activité microbienne dans les échantillons prélevés en abaissant le pH à 3,5. Un système permettait d'effectuer des prélèvements en conditions stériles par augmentation de la pression d'air dans le chémostat.

1.2 Milieux d'alimentation du chémostat

Différents milieux ont été successivement utilisés pour l'alimentation du chémostat. La composition du milieu à l'extrait de sol est présentée en annexe (fiche technique 1)

Le chémostat, initialement alimenté par du milieu dont l'extrait de sol constituait la principale source de carbone (fiche technique 1, "milieu extrait de sol") a été successivement alimenté par des milieux où la part de carbone organique issu de l'extrait de sol était progressivement diminuée en faveur d'une quantité de carbone croissante sous forme de 2,4-D (le dosage du carbone organique total dans ce milieu était réalisé à l'aide d'un analyseur de carbone (DC-80 Dorhman). La concentration en 2,4-D a été amenée successivement à 50, 80, 100, 150 puis 200 mg l⁻¹. Le dernier milieu utilisé ne comprenait que du 2,4-D comme source de carbone.

2- MILIEUX GÉLOSÉS

La composition détaillée des milieux gélosés utilisés tout au long de ce travail est présentée en annexe (fiche technique 1). La composition de milieux employés uniquement lors d'une expérience très précise est développée au niveau du chapitre concerné.

3- MÉTHODES DE MESURES DE L'ACTIVITÉ DÉGRADANTE

3.1 Mesure de l'activité dégradante dans le chémostat par spectrophotométrie U.V.

Le 2,4-D a été dosé par spectrophotométrie UV dans les fractions collectées à partir du chémostat. La concentration en 2,4-D était mesurée par l'excédent d'absorption à 283 nm par rapport à une ligne de base tangente aux minimas du spectre d'absorption du 2,4-D observés à 258 et 305 nm (méthode de correction d'Allen).

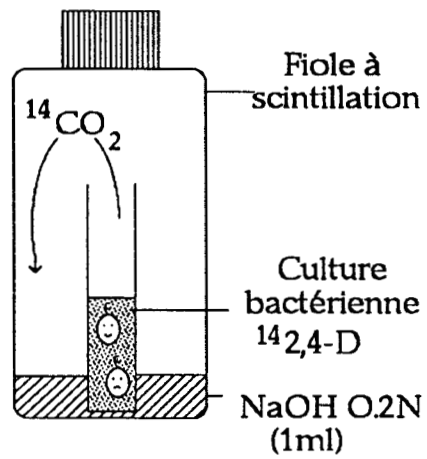


Figure 1.6 : Dispositif expérimental de mise en évidence et de mesure de la dégradation du 2,4-D par les micro-organismes.

3.2 Dispositif expérimental de mesure du $^{14}\text{CO}_2$ dégagé à partir de ^{14}C -2,4-D

Le dispositif expérimental utilisé était constitué d'une fiole à scintillation en polyéthylène contenant 1 ml de soude 0,2N dans laquelle était placé un tube à hémolyse également en polyéthylène, stérile, contenant le milieu de culture (milieu 2,4-D minimal décrit sur la fiche technique 1) ou un agrégat (figure 1.6). Au début de l'expérience, environ 0,16 kBq sont introduits dans chaque tube sous forme de 2,4-D marqué soit sur le carbone 2 de la chaîne, soit sur le cycle (2,4-D en solution dans du toluène, Amersham International PLC). L'activité spécifique des solutions mères était respectivement de 2,07 GBq mmole⁻¹ et de 1,7 GBq mmole⁻¹. Après inoculation à partir de la suspension bactérienne à tester ou d'un agrégat de sol, les fioles à scintillation sont incubées à 20°C. A intervalles déterminés, les tubes à hémolyse sont transférés dans de nouvelles fioles à scintillation contenant le même volume de soude 0,2N. Le $^{14}\text{CO}_2$ piégé par la soude pendant la durée de l'incubation est alors dosé à l'aide d'un compteur à scintillation. Ce dispositif présentait l'avantage de sa simplicité. De nombreuses cinétiques de dégradation pouvaient ainsi être suivies simultanément. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque mesure.

3.3 Milieu de Loos (1975)

La capacité à dégrader le 2,4-D par des colonies isolées a été testée sur milieu de Loos (1975) (fiche technique 1). Les colonies dégradant le 2,4-D sont colorées en rouge après une semaine d'incubation à 28°C, les colonies dépourvues de cette capacité restent blanches.

3.4 Mesures de l'activité dégradante d'association de souches issues du chémostat

Le dispositif expérimental décrit précédemment en 3.2 a été utilisé pour de telles études.

4-ISOLEMENT, DÉNOMBREMENT ET CARACTÉRISATION DES SOUCHES DU CHÉMOSTAT

4.1 Isolement et caractérisation des souches

Le milieu Nutrient Agar (Difco) ainsi qu'un milieu minimal à base d'extrait de sol apportant 17,4 mg l⁻¹ de carbone organique, gélosé à 2% (poids/volume) étaient utilisés pour la caractérisation et le dénombrement de la microflore totale du chémostat (fiche technique 1). Les boîtes de Pétri étaient incubées à 28°C pendant 72 heures. Les différentes souches du chémostat ont été isolées selon le type morphologique de leurs colonies sur milieu gélosé (forme, couleur, consistance, aspect lisse ou rugueux).

La caractérisation biochimique des souches ainsi isolées du chémostat a été réalisée à l'aide de galeries API 20 NE.

4.2 Dénombrement des micro-organismes dégradants

Des dilutions au dixième sont réalisées à partir du milieu de culture du chémostat. La microflore dégradante a été dénombrée soit sur milieu de Loos (1975) soit à l'aide du dispositif décrit en 3.2 afin de déterminer les dilutions auxquelles aucune dégradation n'est observable. Trois répétitions sont réalisées par dilution. Le nombre de micro-organismes dégradants est alors déterminé à l'aide des tables de Mac Grady.

5- TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNÉES

5.1 Analyse de variance sur données répétées

Une procédure permettant de réaliser l'analyse de variance sur mesures répétées a été choisie (Crowder et Hand, 1990) pour traiter les résultats issus des cinétiques de dégradation obtenues à l'aide du dispositif expérimental décrit au paragraphe 3.2. Pour ce faire, le logiciel SAS a été utilisé (Statistical Analysis System version 6.03 puis 7 sous Unix, Freund *et al.*, 1986).

5.2 Ajustements

Des ajustements de modèles aux données ont été réalisés à l'aide du logiciel SAS.

B EXPÉRIMENTATIONS

1-INOCULATION DU CHÉMOSTAT

De petits agrégats d'un sol argilo-limoneux de Dijon (de l'ordre de 20 mg) avaient été préalablement traités avec du ^{14}C 2,4-D. Leur capacité à dégrader le 2,4-D avait été testée par mesure du dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ à partir de ^{14}C -2,4-D. Un dispositif analogue à celui décrit en 3.2 ne contenant que l'agrégat et la solution de ^{14}C -2,4-D, a été utilisé de façon à contrôler la présence de micro-organismes dégradants dans notre inoculum. Le chémostat a alors été inoculé à partir de 100 mg d'agrégats du même sol puis maintenu en batch pendant 10 jours afin d'éviter le lessivage prématuré des micro-organismes. Après avoir mis en évidence une légère diminution de la D.O. à 283 nm et donc un début d'activité dégradante dans le chémostat, nous avons enclenché le dispositif d'alimentation, puis le dispositif de collecte automatique des échantillons. Initialement, le milieu d'alimentation comprenait 50 mg l⁻¹ de 2,4-D. Le débit d'alimentation du chémostat a été fixé à 1,5 ml h⁻¹ ce qui correspond à un taux de renouvellement initial de 0.0015 h⁻¹. Le système de collecte automatique était initialement réglé pour prélever un échantillon toutes les quatre heures.

2-ACTIVITÉ DÉGRADANTE INITIALE DANS LE CHÉMOSTAT

2.1 Objectif initial

On connaît peu de molécules de pesticides pour lesquelles aient été isolées des souches pures capables de tirer de la dégradation de ces composés à la fois l'énergie et le carbone nécessaires à leur croissance. La difficulté à isoler des souches pures capables de dégrader seules un composé xénobiotique semble être conditionnée par la faible probabilité qu'une souche donnée rassemble toute l'information génétique nécessaire à la succession de transformations du produit initial aboutissant au stade où celui-ci peut être utilisé en tant que source énergétique. Il est en effet possible que le métabolisme "accidentel" d'un composé xénobiotique ne puisse pas aboutir à sa minéralisation complète et génère au cours de sa séquence de transformations un composé éventuellement toxique. Le regroupement de micro-organismes au sein de communautés présentant des activités métaboliques complémentaires

et agissant en tant qu'unités fonctionnelles peut être un moyen d'aboutir au stade ultime, la minéralisation d'un tel composé. D'autres explications peuvent également être avancées. Une activité de détoxification, totale ou partielle, ne peut être maintenue dans de nombreux cas au sein d'un micro-organisme que si la souche active à l'égard du composé xénobiotique trouve dans son milieu naturel un autre substrat capable de couvrir ses besoins énergétiques et carbonés. Aussi avons nous choisi initialement de tenter de sélectionner une communauté dégradant le 2,4-D en alimentant un chémostat à partir d'un milieu comprenant une source carbonée autre que le pesticide. Notre choix s'est porté sur l'extrait de sol qui nous permettait d'apporter des substrats plus représentatifs de ceux habituellement rencontrés par les micro-organismes dans le milieu naturel étudié, le sol.

2.2 Matériel et méthodes

Le suivi de l'activité dégradante dans le chémostat a été effectué sur les fractions collectées à partir du chémostat selon le dispositif décrit en 1.1 à l'aide du protocole exposé en 3.1. Les dénombrements de la microflore totale et des micro-organismes dégradants ont été effectués selon les protocoles décrits respectivement en 4.2 et 3.2. Des étalements ont également été réalisés sur milieu 2,4-D agar (milieu minimum gélosé contenant 1 mM de 2,4-D, 60 mg l⁻¹ de NH₄NO₃, 1 ml l⁻¹ de solution A de sels minéraux (fiche technique 1) et 18 g l⁻¹ d'agar bactériologique de type E Biokar). Des dénombrements ont été réalisés sur le même milieu auquel avaient été ajoutés 250 mg l⁻¹ d'extrait de levure. Une première lecture était réalisée après 8 jours d'incubation, une seconde lecture après 15 jours d'incubation.

2.3 Résultats - Discussion

La concentration en 2,4-D dans l'effluent du chémostat oscillait entre 5 et 20 mg l⁻¹.

La microflore totale dans le chémostat, dénombrée sur nutrient agar, comprenait 2.10⁷ UFC par ml. Ce chiffre était inférieur d'une puissance de 10 lorsque les dénombrements étaient réalisés sur milieu 2,4-D avec extrait de levure ce qui pouvait indiquer une sensibilité d'une partie des micro-organismes présents dans le chémostat à la dose employée de 2,4-D dans ce milieu. Aucune

colonie n'était visible sur milieu 2,4-D aux dilutions effectuées (de 10^{-8} à 10^{-4}), indiquant que la microflore capable de pousser sur ce substrat comme seule source de carbone était inférieure à 10^5 UFC par ml.

Après six mois de fonctionnement, 19 souches ont été isolées selon les caractères morphologiques de leurs colonies (couleur, taille, consistance, aspect lisse ou rugueux) sur milieu complet Nutrient Agar contenant 1 mM de 2,4-D. Les tests de dégradation, effectués séparément sur chacune de ces 19 souches n'ont permis de mettre en évidence chez aucune d'entre elles la capacité à dégrader le 2,4-D (aucune des souches cultivées en présence de 2,4-D marqué sur le cycle ou sur la chaîne ne libérait de $^{14}\text{CO}_2$ au bout de 20 jours d'incubation). De même, aucune colonie rouge n'a été observée sur le milieu de Loos (1975). Ces résultats pouvaient être la conséquence de deux phénomènes.

1-Les souches responsables de la dégradation du 2,4-D n'avaient pas été isolées

2-Aucune des souches isolées n'était capable de dégrader seule la molécule d'herbicide. L'activité dégradante observée dans le chémostat pouvait alors être la conséquence d'une collaboration microbienne. La dégradation du 2,4-D faisant intervenir plusieurs étapes métaboliques, celles-ci pouvaient être le fait de plusieurs souches distinctes de micro-organismes. Ainsi devenait-il nécessaire d'étudier l'activité dégradante de l'association des souches isolées du chémostat

3- COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ DÉGRADANTE DE LA COMMUNAUTÉ DU CHÉMOSTAT ET DE LA COMMUNAUTÉ RECONSTITUÉE À PARTIR DES SOUCHES ISOLÉES DE CELUI-CI.

3.1 Matériel et méthode

Afin de tester laquelle de ces deux hypothèses était vérifiée, nous avons réalisé des tests de dégradation du 2,4-D marqué sur le cycle en présence d'une part, d'une aliquote de culture prélevée stérilement à partir du chémostat et d'autre part, d'une communauté "reconstituée" comprenant l'ensemble des souches isolées. Celles-ci avaient préalablement été ensemencées (à partir des colonies isolées sur milieu gélosé) sur un milieu à l'extrait de sol (fiche technique 1) contenant 20 mg l^{-1} de 2,4-D, concentration maximale observée dans le chémostat, afin d'éviter tout phénomène de toxicité tout en maintenant une pression de sélection en faveur d'une éventuelle activité de dégradation. Pour

cela 100 μ l de la suspension des différentes espèces isolées ont été rassemblés dans un tube auquel ont été ajoutés 3 ml de milieu extrait de sol contenant 20 mg l⁻¹ de 2,4-D froid. 100 μ l de ce mélange de précultures ont alors été utilisés pour ensemercer le dispositif expérimental décrit en 3.2.

3.2 Résultats-Discussion.

Aucune activité n'a été observée dans les flacons contenant la communauté reconstituée. Ces résultats pouvaient provenir de l'absence, dans la communauté reconstituée, des souches impliquées dans la dégradation du 2,4-D. Il était également possible, si nous nous trouvions dans le cadre d'une collaboration microbienne, que l'une au moins des souches impliquées n'ait pas été isolée et soit donc absente de la communauté "reconstituée". Cette éventualité étant d'autant plus probable qu'aucune des souches isolées n'était capable de dégrader séparément le 2,4-D marqué sur la chaîne et donc de réaliser ce qui constitue habituellement une étape métabolique bien définie de la voie de dégradation du 2,4-D (d'après notre présentation bibliographique exposée en introduction). Ils pouvaient également être la conséquence d'un rapport inadéquat entre les tailles des populations introduites ou encore d'une forte instabilité de l'activité dégradante sur le milieu complet ayant servi à isoler les micro-organismes. La première explication nous paraissait cependant plus vraisemblable compte-tenu du milieu d'alimentation utilisé pour le chémostat. En effet, si l'on s'appuyait sur les considérations théoriques de la culture continue, la présence d'extrait de sol dans le milieu de culture (mélange complexe d'une multitude de composés pouvant servir de substrats à des micro-organismes) devait sans aucun doute entretenir dans le chémostat, un nombre important de souches microbiennes "parasites" n'intervenant pas dans la dégradation du 2,4-D. Le rapport du carbone issu de l'extrait de sol à celui du carbone introduit sous forme de pesticide devait sans aucun doute favoriser le développement de micro-organismes de ce type dans le chémostat et augmenter leur probabilité d'isolement par rapport à des micro-organismes réellement impliqués dans l'activité recherchée.

Deux points nous paraissaient alors importants. Tout d'abord, la nécessité d'un enrichissement de la communauté en micro-organismes dégradants qui permette leur isolement, d'autre part, la diminution de la diversité spécifique des micro-organismes présents dans le chémostat.

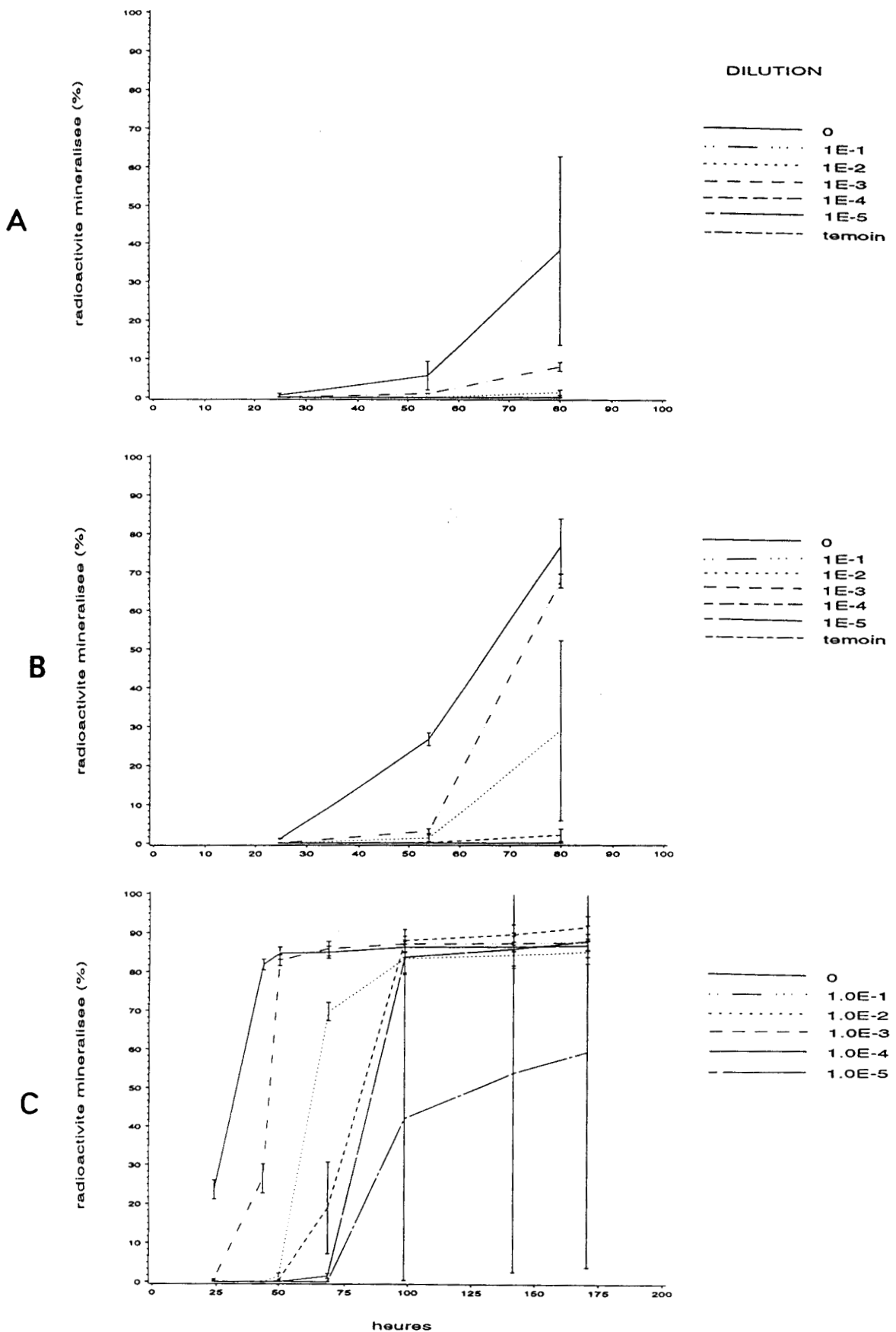


Figure 1.7 : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D mesurées sur les dilutions au dixième successives de la culture microbienne maintenue en chémostat, pour trois concentrations en 2,4-D du milieu d'alimentation.

- A : 2,4-D (80 mg l^{-1}) marqué sur la chaîne
- B : 2,4-D (160 mg l^{-1}) marqué sur la chaîne
- C : 2,4-D (200 mg l^{-1}) marqué sur la chaîne
- D : 2,4-D (80 mg l^{-1}) marqué sur le cycle
- E : 2,4-D (160 mg l^{-1}) marqué sur le cycle
- F : 2,4-D (200 mg l^{-1}) marqué sur le cycle

4- ENRICHISSEMENT DU CHÉMOSTAT EN MICRO-ORGANISMES DÉGRADANTS

4.1 Objectif

Notre but était alors d'isoler le micro-organisme ou l'association minimale de micro-organismes impliqués dans la dégradation du 2,4-D.

4.2 Méthode d'enrichissement

L'enrichissement du chémostat en micro-organismes dégradants a été réalisé en augmentant progressivement la concentration en 2,4-D du milieu d'alimentation. L'activité dégradante a été suivie dans le chémostat par spectrophotométrie U.V. Le rapport de la microflore dégradante à la microflore totale a été déterminé pour chaque nouveau milieu utilisé pour l'alimentation du chémostat à l'aide des méthodes décrites en 4.1, 4.2 et 3.2. Des dilutions au dixième étaient alors réalisées à partir d'un prélèvement du chémostat. 100 µl des différentes dilutions étaient utilisées pour ensemercer le dispositif décrit en 3.2 dans lequel avaient préalablement été introduits 900 µl de mélange de milieu d'alimentation du chémostat et de solution de 2,4-D marquée. Les cinétiques de minéralisation de la radioactivité introduite ont été suivies sur environ 80 heures d'incubation (170 heures pour le dernier milieu utilisé).

Nous n'avons finalement plus ajouté l'extrait de sol qui n'entrait pas dans la composition du dernier milieu utilisé pour l'alimentation du chémostat

4.3 sélection d'une communauté réduite dégradant le 2,4-D

Les résultats des dénombrements de micro-organismes minéralisant d'une part, la chaîne latérale et d'autre part, le cycle de la molécule de 2,4-D sont représentés respectivement sur les figures 1.7 (A à F) et figure 1.8. On remarque que l'ajout de 2,4-D dans le milieu de culture n'entraîne pas une augmentation sensible de la biomasse dégradante dans le chémostat. Par contre, la substitution complète du carbone issu de l'extrait de sol par du 2,4-D provoque une prolifération des micro-organismes dégradant l'herbicide. On remarque également, d'après ces résultats, qu'un nombre similaire de micro-organismes capables de dégrader le cycle et la chaîne latérale du 2,4-D sont présents dans le

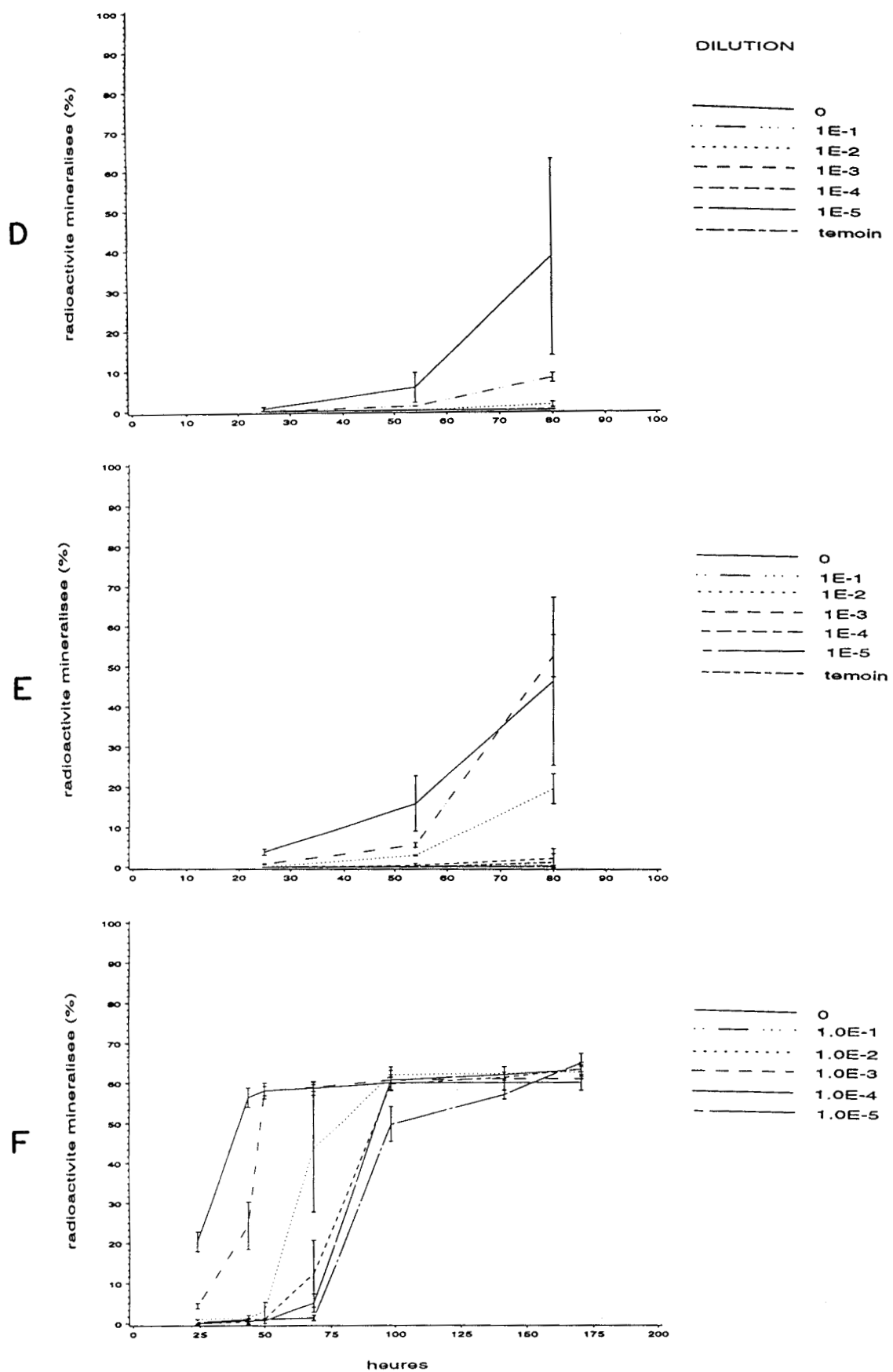


Figure 1.7 (suite) : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D mesurées sur les dilutions au dixième successive de la culture microbienne maintenue en chémostat, pour trois concentrations en 2,4-D du milieu d'alimentation.

- A : 2,4-D (80 mg l^{-1}) marqué sur la chaîne
- B : 2,4-D (160 mg l^{-1}) marqué sur la chaîne
- C : 2,4-D (200 mg l^{-1}) marqué sur la chaîne
- D : 2,4-D (80 mg l^{-1}) marqué sur le cycle
- E : 2,4-D (160 mg l^{-1}) marqué sur le cycle
- F : 2,4-D (200 mg l^{-1}) marqué sur le cycle

chémostat quelle que soit la concentration en pesticide employée ce qui pourrait suggérer qu'une même espèce microbienne pourrait intervenir dans ces deux étapes de la dégradation.

Cependant, tant que du carbone sous forme d'extrait de sol restait présent dans le milieu d'alimentation du chémostat, la diversité spécifique restait trop importante et aucune colonie rouge n'a pu être mise en évidence sur le milieu de Loos (1975). Le milieu d'alimentation du chémostat contenant 50 mg l⁻¹ de carbone sous forme d'extrait de sol et 160 mg l⁻¹ de 2,4-D entretenait encore une communauté de 12 souches distinguables d'après les caractéristiques morphologiques de leur colonie sur milieu gélosé. Comme aucune souche apparemment "nouvelle" n'avait été isolée, nous avons complètement substitué le carbone extrait de sol par du carbone sous forme de 2,4-D.

Cette démarche a abouti à la sélection d'une communauté microbienne stable, composée de quatre souches bactériennes, A, B, C, D capables de se maintenir dans un milieu où la seule source de carbone était formée par le 2,4-D. L'inoculation de galeries API 20 NE a permis d'identifier A et B comme étant respectivement *Pseudomonas aureofaciens* et *Xanthomonas maltophilia*. Les souches C et D ont été identifiées par l'Institut Pasteur comme étant respectivement *Alcaligenes paradoxus* et *Pseudomonas sp.* Cette communauté a été maintenue en chémostat alimenté par un milieu comprenant du 2,4-D comme seule source de carbone pendant 3 ans.

5-RECHERCHE DU ROLE DES MICRO-ORGANISMES COMPOSANT LA COMMUNAUTÉ DÉGRADANTE.

5.1 Objectifs

Le milieu d'alimentation du chémostat ne comprenait alors plus qu'une seule source carbonée qui pouvait être considérée comme limitante pour la croissance de la communauté établie. La théorie de la culture continue prédit alors qu'en cas de compétition simple entre plusieurs souches formant une communauté microbienne, pour un taux de renouvellement du chémostat donné et pour un substrat donné, le micro-organisme possédant le taux de croissance le plus élevé, ou la constante de saturation la plus faible, doit être sélectionné au détriment des autres membres de la communauté microbienne. Le principe d'exclusion prévoit en effet qu'en cas de compétition simple entre espèces pour un substrat donné, seule une espèce doit se maintenir (Gause, 1934,

concentrations (mg l ⁻¹) en - 2,4-D - carbone issu de l'extrait de sol	80 50	160 50	200 0
nombre de microorganismes minéralisant la chaîne (par ml)	1,1 10 ⁵	0,78 10 ⁵	2,4 10 ⁶
nombre de microorganismes minéralisant le cycle (par ml)	0,45 10 ⁵	0,68 10 ⁵	>2,4 10 ⁶

Figure 1.8 : Evolution du nombre de micro-organismes dégradant le 2,4-D dans le chémostat en fonction des concentrations en 2,4-D et en extrait de sol (carbone) du milieu d'alimentation.

in Leslie, 1957). La coexistence implique donc l'existence de relations plus complexes entre les différentes espèces microbiennes formant la communauté dégradante. Ce sont ces relations que nous avons cherché à déterminer et plus particulièrement le rôle que pouvaient jouer les différentes espèces dans la dégradation du 2,4-D. Dans certains cas, les différents membres de la communauté sont impliqués dans des étapes successives de la dégradation d'un pesticide. Dans d'autres cas, des relations trophiques peuvent exister entre les différents membres d'une communauté microbienne cultivée sur un substrat donné (Senior *et al.*, 1976). Aussi, dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au rôle des différents micro-organismes composant cette association microbienne dans la dégradation du 2,4-D. En particulier nous avons cherché à mettre en évidence une éventuelle collaboration métabolique entre les souches présentes. Leur nombre restreint nous permettait d'aborder une telle étude.

5.2 Dispositif utilisé

La démarche précédente a été réitérée. Afin de déterminer quelles étaient les souches de la communauté responsables de la dégradation du 2,4-D, celles-ci ont été cultivées séparément sur milieu de Loos (1975). Pour compléter cette étude, des cinétiques de dégradation ont été réalisées à l'aide du dispositif présenté en 3.2 afin de tester l'aptitude des souches à dégrader l'herbicide séparément. Chaque souche est remise en suspension dans de l'eau physiologique stérile et diluée jusqu'à obtenir une densité optique de 2 à 600 nm. 12 ml de milieu 2,4-D (fiche technique 1: II.4) sont introduits dans huit fioles de 100 ml. Quatre d'entre elles reçoivent alors du 2,4-D marqué sur le cycle et quatre du 2,4-D marqué sur la chaîne. Chaque paire de fioles est alorsensemencée par 2 ml de suspension bactérienne (chacune reçoit l'une des quatre souches à tester). 1 ml de chaque culture est alors introduit dans le dispositif décrit en 3.2. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement. (L'expérience exposée au paragraphe suivant étant réalisée au même moment, l'ensemble des 12 ml de solution sont utilisés). Des prélèvements ont été réalisés après 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15 et 19 jours d'incubation. Des dénombrements ont été réalisés à partir des cultures des souches microbiennes ayant servi à l'inoculation (Dictor, 1990).

L'utilisation de 2,4-D marqué sur le cycle ou sur la chaîne devait mettre en évidence une dégradation totale ou partielle de la molécule. Des bactéries pouvaient en effet être capables de dégrader la chaîne latérale du xénobiotique sans pour cela être capables de s'attaquer au cycle. Nous avons donc recherché

des différences de comportement entre les souches au moyen de leurs cinétiques de minéralisation du 2,4-D (ou d'une partie de la molécule).

5.3 Principe de l'analyse statistique appliquée : l'ANOVA et la MANOVA sur mesures répétées

En termes statistiques, nous voulions savoir si un effet traitement était sensible (dans notre cas, un effet de la souche inoculée) sur la cinétique de minéralisation du 2,4-D mesurée par la quantité de $^{14}\text{CO}_2$ dégagée (la variable à expliquer) en fonction du temps (l'une des variables explicatives, l'autre étant la souche inoculée). Notre but était dans un premier temps de comparer les cinétiques de minéralisation de la radioactivité introduite (2,4-D marqué sur le cycle ou la chaîne) par les différentes souches microbiennes et de chercher si une différence pouvait être mise en évidence entre les souches. Une interaction temps-traitement était également recherchée (les courbes étaient-elles parallèles ou de forme similaire). Généralement, le modèle d'analyse de la variance classique ne peut être appliqué dans le cas où l'une des variables explicatives présente des niveaux non-indépendants. Dans notre cas, d'une part, les temps n'étaient pas randomisés et d'autre part, la quantité de $^{14}\text{CO}_2$ dégagée par une espèce bactérienne à un temps donné n'était pas indépendante de la quantité dégagée au temps de mesure précédent. Dans de telles circonstances, les tests relatifs à l'effet inter-groupe de l'ANOVA classique qui, dans notre cas, concerne l'effet "souche inoculée" restent valides (le 2,4-D marqué est réparti aléatoirement dans les cultures inoculées par les différentes souches; celles-ci sont indépendantes). Au contraire, les tests intra-groupe de l'effet temps et de l'interaction temps-souche ne sont alors valides que si les corrélations entre les différents temps sont identiques (hypothèse de sphéricité- critère de Mauchly). Or si l'effet du temps est évident sur nos cinétiques de minéralisation (son étude statistique ne présente par conséquent pas d'intérêt), l'effet de l'interaction temps-souche peut dans certains cas nous apporter des renseignements intéressants. En particulier, si une similarité des formes des courbes peut être mise en évidence, on peut lors d'une étape ultérieure de modélisation réaliser des comparaisons quantitatives. Une solution consiste alors à effectuer une analyse de variance multivariée où les temps jouent le rôle des variables. Les tests de Wilks, la trace de Pillai, celle de Hotelling-Lawley ainsi que la plus grande valeur propre de Roy permettent alors de discuter de la cohérence d'un effet de l'interaction temps-traitement (la signification de ces tests est décrite

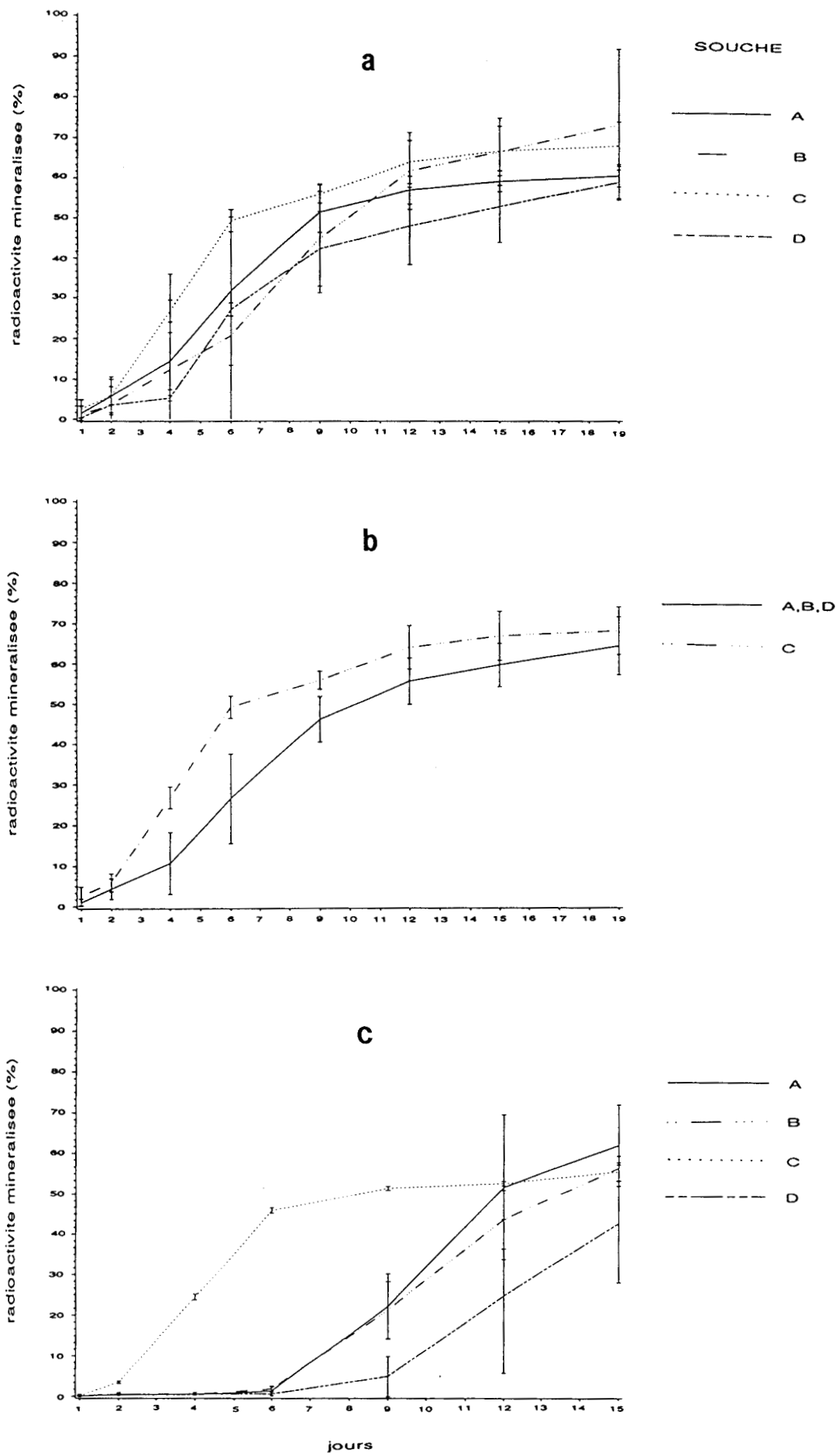


Figure 1.9 : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur la chaîne (a et b) et sur le cycle (c) par les souches pures isolées du chémostat. (a) et (c) présentent les cinétiques par souche. Au niveau de (b), les résultats des cinétiques de minéralisation des trois souches A, B et D ont été regroupés dans une même classe.

plus loin). Une autre solution consiste à réaliser des corrections sur les résultats des tests de l'ANOVA (Geisser-Greenhouse, 1959 et Huynh-Feldt, 1970 *in* Freund *et al.*, 1986). Ces approches sont disponibles en activant l'option "repeated" de la procédure ANOVA de SAS.

5.4 Résultats-Discussion

Seule la souche C (que nous appellerons *Alcaligenes paradoxus* TV1 dans la suite de ce travail) a donné une réaction positive sur le milieu de Loos (1975) (coloration en rouge de la bactérie cultivée sur ce milieu).

5.4.1 Minéralisation de la chaîne latérale de la molécule de 2,4-D

-Analyse de l'effet souche

Les cinétiques de dégradation du ^{14}C -2,4-D par les souches pures (figure 1.9) montrent que les quatre souches sont capables d'utiliser le carbone de la chaîne latérale de la molécule de 2,4-D. Aucune différence statistiquement significative n'a pu être observée entre les cinétiques de dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ à partir du 2,4-D marqué au niveau du carbone 2 de la chaîne par les différentes souches (Figure 1.9a) : l'effet souche n'était pas significatif lorsque les quatre souches étaient considérées séparément (facteur souche à quatre niveaux). Cependant la courbe de minéralisation du 2,4-D marqué sur la chaîne par la souche C semblait se situer au dessus des autres courbes de minéralisation. Aussi, avons nous cherché à savoir si l'absence de l'effet souche établi ne provenait pas d'une identité de comportement des souches A,B et D, ce qui revenait à introduire un nombre de degrés de liberté artificiellement trop élevé dans les calculs précédents. Aussi avons-nous regroupé dans nos calculs les données des cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur la chaîne par les souches A, B et D dans une même classe. Nous avons alors cherché à savoir (en réitérant l'analyse précédente) si l'activité de la souche C à l'égard de la chaîne latérale de la molécule pouvait être discernée de l'activité des autres souches de la communauté microbienne. Un effet souche significatif au seuil de 5 % pouvait alors être observé (non significatif au seuil de 1%). La courbe moyenne des cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur la chaîne par les souches A,B et D regroupées a été comparée à la courbe moyenne obtenue pour la souche C sur la figure 1.9b. Il apparaît sur ces courbes que la vitesse maximale de

souche introduite	nombre de bactéries (ml ⁻¹)
A	4 10 ⁷
B	17 10 ⁷
C	2 10 ⁷
D	25 10 ⁷

Figure 1.10 : Dénombrement des bactéries présentes dans les suspensions mères utilisées pour les cinétiques de minéralisation du 2,4-D.

minéralisation de cette partie de la molécule par la souche C (pente au point d'inflexion) est supérieure à celle des autres souches de la communauté microbienne alors que la vitesse initiale de minéralisation semble similaire pour l'ensemble des souches. Il était nécessaire de vérifier que cette différence de comportement n'était pas due à une différence du niveau d'inoculation mais bien à une différence de capacité intrinsèque de dégradation chez les souches étudiées.

Le résultat des dénombrements a montré au contraire que la souche C était celle qui présentait la densité de population la moins élevée au moment de l'inoculation. (figure 1.10). Ces résultats suggéraient donc que la souche C présentait une vitesse maximale de minéralisation de la chaîne latérale de la molécule de 2,4-D plus importante. Toutefois, l'ensemble des souches de la communauté isolées du chémostat étaient capables de réaliser cette étape de la voie de dégradation du 2,4-D.

-analyse de l'interaction souche-temps et discussion

Sur les quatre tests réalisés par la procédure MANOVA du logiciel SAS lorsque l'option "repeated" est spécifiée, trois nous poussent à conclure à l'absence d'interaction temps-souche(λ de Wilks, Trace de Pillai et Trace de Hotelling-Lawley). La plus grande valeur propre de Roy quant à elle conclut à l'existence d'une différence significative (au seuil de 5%) entre les groupes. Pour interpréter ces résultats il est nécessaire de revenir à la définition de ces tests.

Le modèle de l'analyse de la variance multivariée s'écrit:

$$Y_{n,t} = X_{n,k} \cdot \Theta_{k,t} + \mathcal{E}_{n,t}$$

où Y est le vecteur des observations contenant autant de colonnes que de temps de mesures (t) et de lignes que de souches multipliées par le nombre de répétitions (n=12 dans notre cas), Θ est la matrice des paramètres, et k, le nombre de populations différenciées (4 dans notre cas)

Si $E_{t,t}$ est la matrice de covariance des erreurs, $H_{t,t}$, la matrice de covariance des moyennes des groupes et $\lambda_1 > \lambda_2 > \dots > \lambda_p$, les valeurs propres de $H.E^{-1}$ ($p = \min(k-1, t)$), alors les quatre tests sont définis par:

Trace de Pillai :

$$\sum_i \frac{\lambda_i}{1 + \lambda_i}$$

Lambda de Wilks :

$$\prod_i \frac{\lambda_i}{1 + \lambda_i}$$

Trace de Hotteling-Lawley :

$$\sum_i \lambda_i$$

Plus grande valeur propre de Roy: λ_1 . (cette valeur propre définit la direction la plus discriminante entre les groupes).

En d'autres termes, les trois premiers tests tiennent compte de l'ensemble des axes discriminants entre les groupes (ils font intervenir l'ensemble des valeurs propres), le dernier test ne prend en considération qu'une seule direction discriminante. Nos résultats montrent donc que si, sur l'ensemble des données, il n'y a pas de différence de comportement à travers le temps entre les souches, il existe cependant une dimension discriminant leur comportement. Nous avons cherché à savoir si celle-ci était la conséquence de conditions initiales différentes (influence du premier temps de mesure qui pourrait entre autres s'interpréter par des tailles de populations inoculées sensiblement différentes) et réitéré les tests sur les données en éliminant la première mesure obtenue (24 heures d'incubation). Le quatrième test (plus grande valeur propre de Roy) montrait alors l'existence hautement significative (cette fois au seuil de 1%) d'un axe discriminant. Par contre ce test n'indiquait plus de différence significative de comportement entre les souches lorsque l'on a travaillé sur l'ensemble des données privées des deux premières mesures (temps 1 et 2 jours d'incubation facteur souche à 4 niveaux). Le risque de première espèce pour ce test était alors de 14%.

A la lumière de ces résultats et de la forme des courbes expérimentales, on peut proposer l'explication suivante. Une légère différence existe entre le comportement des souches qui n'est pas dû à la vitesse initiale de minéralisation de la chaîne latérale de la molécule de 2,4-D (que l'on peut relier à une capacité initiale de minéralisation et donc à une taille de population inoculée). Par contre, supprimer les deux premiers temps de mesure du tableau des données revient, dans l'ensemble, à ne pas inclure dans les calculs, le point d'inflexion des différentes courbes. Si une différence existait, elle serait alors à rechercher au niveau de la vitesse à l'inflexion c'est à dire de la vitesse maximale de minéralisation ou, en d'autre terme, de la capacité intrinsèque des populations à minéraliser la chaîne latérale de la molécule. Cette différence serait probablement due à un comportement "plus efficace" de la souche C (Une

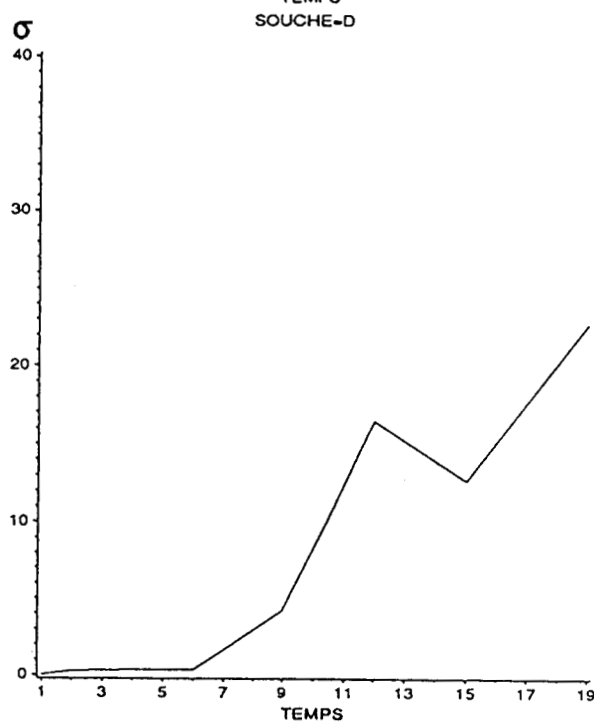
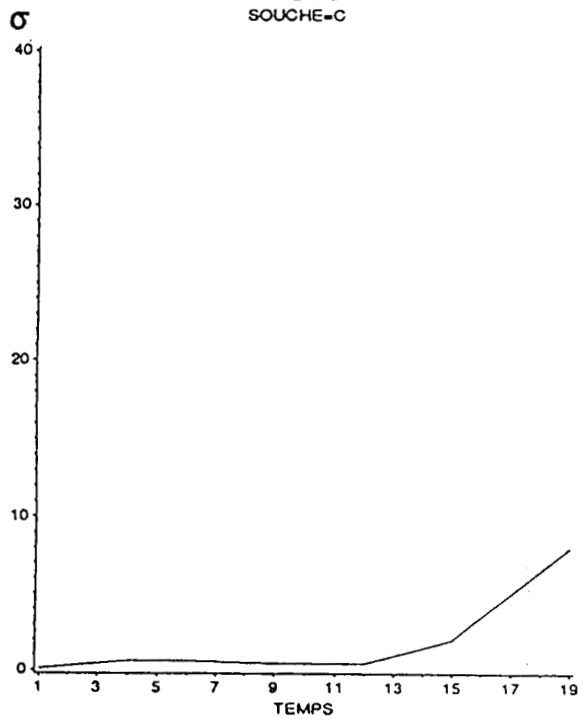
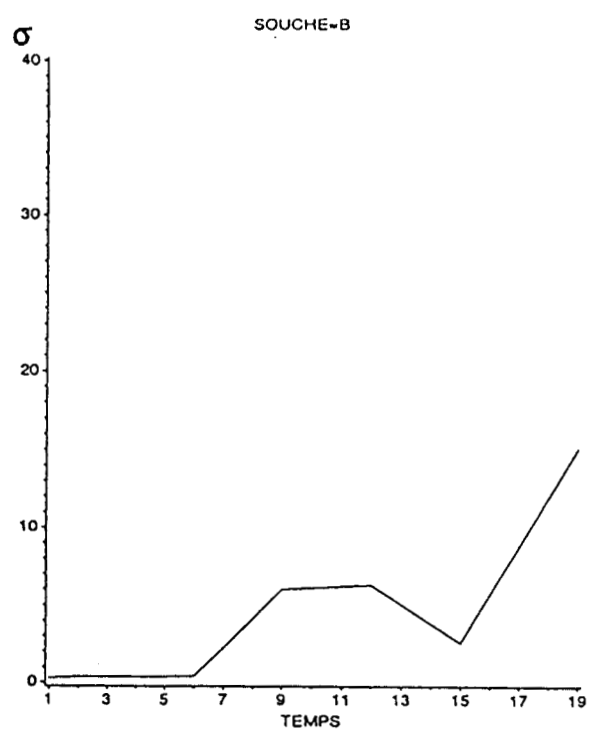
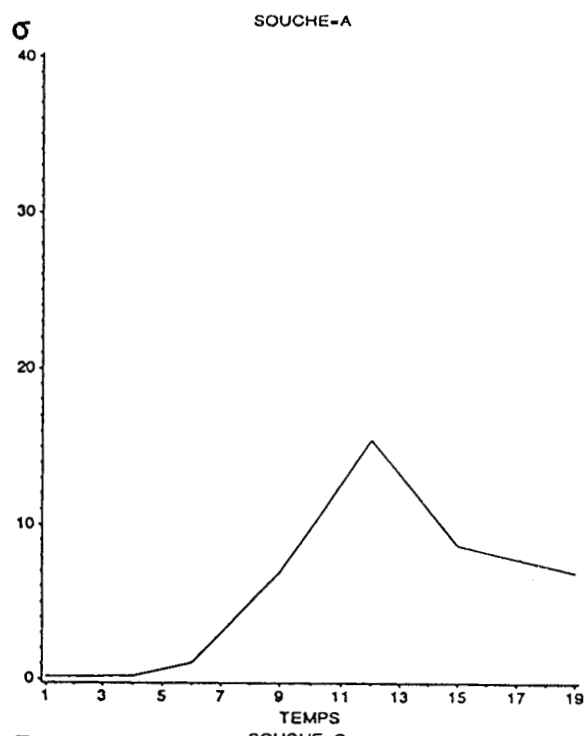


Figure 1.11 : Evolution des écart-types des cinétiques de minéralisation présentées en 1.9c.

analyse de variance multivariée sur les données privées des deux premiers temps de mesure en regroupant les souches A,B et D dans une même classe (facteur souche à 2 niveaux) indiquait alors un risque de première espèce de 56% pour le test de la plus grande valeur propre appliqué à l'interaction temps-souche et confirmait nos conclusions du paragraphe précédent).

5.4.2 Minéralisation du cycle

Lorsque le 2,4-D utilisé était marqué sur le cycle, une différence statistiquement significative (au seuil de 0,1%) était immédiatement détectable entre les courbes de dégagement de CO₂ marqué (variable souche à quatre niveaux). Celle-ci restait essentiellement due au comportement de la souche C (*A. paradoxus*) pour laquelle la vitesse initiale de minéralisation du 2,4-D apparaissait nettement supérieure à celle des autres souches composant la communauté (figure 1.9c). En ce qui concerne l'interaction temps -souche, les tests de Wilks, de Hotteling-Lawley, et de Roy s'accordaient cette fois pour accepter l'hypothèse d'une identité de comportement des souches. Par contre la trace de Pillai indique, dans ce cas un risque de première espèce de 30% (non significatif). Nous n'avons pas trouvé d'interprétation à ces résultats.

Les cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle par les souches A,B et D, présentent des écarts-types, importants, croissants avec le temps qui sont moins marqués chez la souche C (figure 1.11). L'aptitude à dégrader le cycle qui se manifeste chez les souches A,B, et D de la communauté serait susceptible d'être la conséquence d'une contamination lors des prélèvements (transferts des tubes contenant les cultures dans les nouvelles fioles à scintillation). Une contamination constitue un événement aléatoire pouvant entraîner l'apparition d'une activité dégradante à un instant quelconque et qui s'amplifie au cours du temps sous l'effet de la multiplication cellulaire. Les mesures n'étant pas indépendantes, un tel événement pourrait expliquer l'augmentation de la variance observée au cours du temps sur les cinétiques de minéralisation du 2,4-D par les souches A,B et D. On remarque en effet que la variance reste négligeable pendant les six premiers jours d'incubation, puis augmente de façon importante sur ces cinétiques alors qu'elle garde une valeur relativement faible pour la souche C tout au long de l'expérience. Malgré la sélectivité du milieu qui ne comprend que du 2,4-D comme seule source de carbone, un tel événement ne peut être exclu compte-tenu de la longue durée de l'expérience et de la fréquence importante d'ouverture des flacons d'incubation.

L'absence de la coloration rouge sur milieu de Loos (1975) caractéristique de la déchloration qui semble se produire généralement après l'ouverture du cycle nous conforte dans cette explication. D'après l'étude bibliographique présentée en introduction, le métabolisme du 2,4-D semblerait commencer par la rupture de la liaison éther entre le cycle et la chaîne latérale, et la production de 2,4-dichlorophénol. L'attaque du cycle constituerait fréquemment l'étape suivante et la déchloration (responsable du changement de couleur du milieu de Loos sous l'effet d'une diminution du pH en présence d'ions Cl^- libres) n'interviendrait que très tardivement. Nous ne disposons d'aucune connaissance en ce qui concerne le métabolisme du 2,4-D par *A. paradoxus* (et sans aucun doute, ce type de données faciliterait nos interprétations). Cependant, si l'on émet l'hypothèse que la dégradation du 2,4-D chez cette bactérie emprunte la même voie et que les étapes se succèdent dans l'ordre le plus fréquemment rencontré, l'absence de coloration rouge sur le milieu de Loos signalant l'absence de déchloration du 2,4-D impliquerait également l'absence de l'étape d'ouverture du cycle.

Une différence du niveau d'inoculation initial ne pourrait expliquer le comportement général de la variance. Tout d'abord, une même loi de la variance devrait être visible sur l'ensemble des cinétiques de minéralisation y compris celles de la souche C. D'autre part, une représentation de la variance, dans le cas où les écarts d'activité observés entre les répétitions d'un même traitement serait uniquement due à une différence de niveau d'inoculation, serait une courbe "en cloche" présentant un maximum au niveau des points d'inflexion des cinétiques de minéralisation. (Un exemple de ce type de comportement nous est donné par la variance des cinétiques de dénombrement présentées sur la figure 1.7F). Une différence du niveau d'inoculation pourrait donc expliquer le comportement de la variance des cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle par la souche A et le premier pic de la variance observé pour la souche B et peut-être D. Dans l'ensemble, une autre explication doit être recherchée pour expliquer le comportement de la variance des cinétiques de minéralisation du 2,4-D après 15 jours d'incubation. La mortalité cellulaire, la mauvaise aération des échantillons, pourraient en être la cause. Le système expérimental utilisé est particulièrement peu fiable aux longs temps d'incubation. Par conséquent nous en déduisons que seule la souche C est capable de minéraliser l'herbicide dès le premier jour d'incubation et d'utiliser la totalité du carbone du 2,4-D. Les autres souches composant la communauté microbienne ne montrent une activité à l'égard du 2,4-D marqué sur le cycle qu'au bout de six jours. Cette relative inefficacité nous a fait supposer que la souche C (*A.*

paradoxus TV1 dans la suite de ce travail) était responsable de la majeure partie de la dégradation du 2,4-D dans le chémostat.

Cependant, et bien qu'il se soit montré peu fiable au longs temps d'incubation, le dispositif expérimental utilisé a été conservé pour la suite de notre étude. Il permettait en effet de suivre simultanément un grand nombre de cinétiques de minéralisation. Afin de déterminer le rôle des souches A, B et D dans le chémostat, il nous était possible d'utiliser ce dispositif pour comparer l'activité des différentes associations reconstituées à partir des quatre souches isolées. Compte tenu du comportement des souches A,B et D vis à vis du 2,4-D marqué sur la chaîne et le cycle, nous avons cherché à expliquer leur présence au sein de la communauté établie dans le chémostat. La souche C étant capable de dégrader seule l'ensemble de la molécule de 2,4-D, la communauté ne pouvait constituer une coopération métabolique où les souches A,B et D dégraderaient la chaîne latérale de la molécule qui serait alors à son tour minéralisée par la souche C. Cette dernière présentait même une tendance à dégrader plus vite la chaîne que les autres souches de la communauté. Cette étape n'était donc pas limitante pour la souche C.

6-DÉGRADATION DU 2,4-D PAR DES ASSOCIATIONS MICROBIENNES DE LA COMMUNAUTÉ DU CHÉMOSTAT

6.1 buts et limites d'une étude préliminaire

Un problème d'inoculation se pose quelque soit le dispositif expérimental utilisé. Celui-ci reste le facteur limitant dans l'ensemble de l'étude qui suit, parce que difficilement contrôlable. Une question se pose lorsque l'on cherche à comparer l'activité d'une souche à celle d'un ensemble de souches rassemblées. Quel niveau d'inoculation choisir et surtout quelles parts attribuer aux différentes souches lorsqu'elles sont réunies. Fallait-il conserver le niveau de la souche C constant qu'elle soit inoculée seule ou au sein d'une communauté reconstituée ou fallait-il tenter dans la mesure du possible d'introduire un nombre total identique des différentes souches dans les deux traitements ou encore un nombre inversement proportionnel à leur activité propre? Peut-être la solution serait-elle d'inoculer les souches en fonction du pourcentage de ce qu'elles représentent dans la communauté naturelle, mais alors comment corriger ces chiffres lorsqu'une souche est supprimée de l'association? Aussi, est-il nécessaire

associations	souches			
	A	B	C	D
A	1			
B		1		
C			1	
D				1
AB	0.5	0.5		
AC	0.5		0.5	
AD	0.5			0.5
BC		0.5	0.5	
BD		0.5		0.5
CD			0.5	0.5
ABC	0.3	0.3	0.3	
ABD	0.3	0.3		0.3
ACD	0.3		0.3	0.3
BCD		0.3	0.3	0.3
ABCD	0.25	0.25	0.25	0.25

Figure 1.12 : Reconstitution des différentes associations de souches. Les chiffres sont les volumes, en ml, des suspensions de souches pures introduites dans les tubes à hémolyse. Les volumes indiqués sur la même ligne correspondent au même tube à hémolyse (d'après Dictor, 1990).

de considérer d'emblée cette étape de notre travail simplement comme une approche préliminaire permettant d'orienter la suite de nos recherches.

6.2 Matériel et méthodes

A l'aide du dispositif expérimental précédent, nous avons suivi les cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué au ^{14}C sur le cycle et la chaîne par les différentes associations des souches de la communauté. Nous avons repris le dispositif précédent pour tester les 11 associations restantes (Les résultats des associations d'une seule souche ayant été exposés dans le paragraphe précédent) . Une telle étude demandait à ce que la disparité entre le nombre de micro-organismes présents dans chacun des traitements reste dans une limite acceptable, celle-ci ayant une influence directe sur les vitesses de minéralisation. Aussi avons nous réparti les 8 préparations contenant les cultures et le mélange de 2,4-D froid et marqué décrites en 5.2 selon le protocole énoncé sur la figure 1.12 (Dictor, 1990).

Les dénombrements des cultures mères ayant servi à l'inoculation avaient été réalisés (figure 1.10).

6.3 Résultats.

6.3.1 Minéralisation du cycle

L'approche statistique précédente a été appliquée à l'ensemble des courbes obtenues. Elle nous a permis de définir 4 classes de comportements. Un effet souche significatif (au seuil de 5%) ainsi qu'une interaction souche-temps significative étaient observés lorsque l'on regroupait sous une même classe l'ensemble des associations n'incluant pas C, dans une seconde classe l'ensemble des associations de plus d'une souche incluant C mais ne contenant pas les quatre souches, dans une troisième classe la souche C seule et, enfin, dans une quatrième classe la communauté complète, reconstituée à partir des quatre souches. Cette dernière semble présenter la vitesse initiale de minéralisation la plus élevée.

A

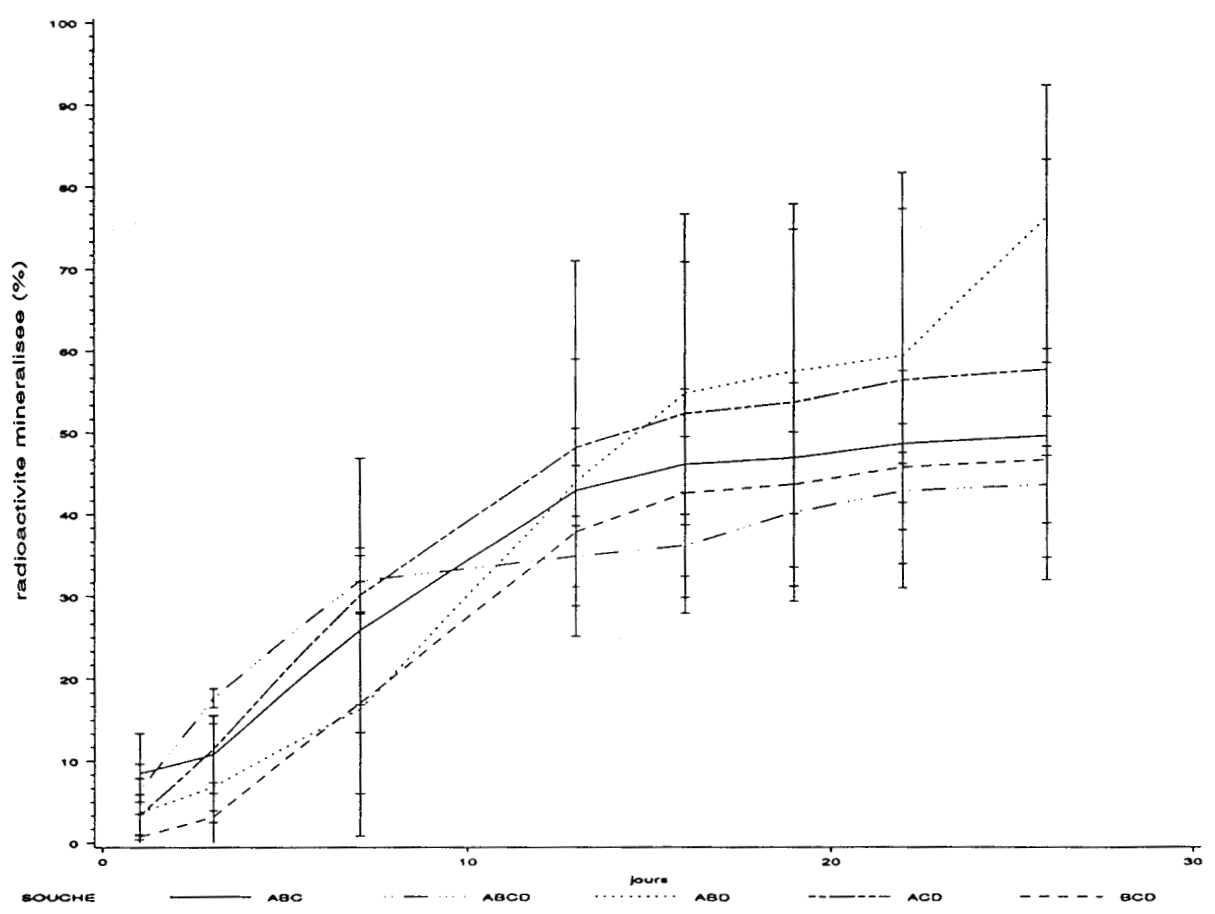
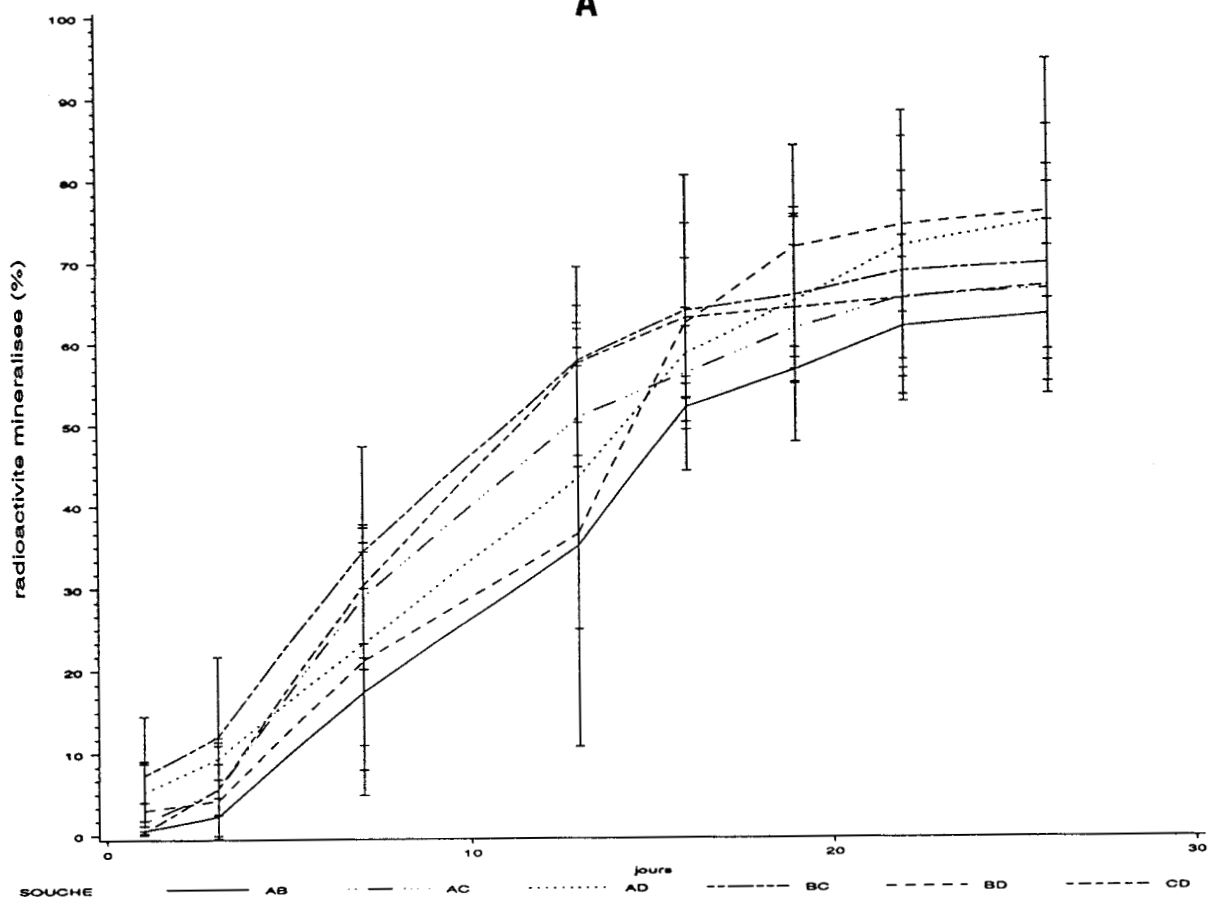


Figure 1.13 : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur la chaîne (A) et sur le cycle (B) par des associations de microorganismes isolés du chémostat.

Au niveau des associations par deux (figure 1.13b1), deux groupes de courbes se dégagent des résultats. Les associations contenant la souche C possèdent toutes une vitesse de minéralisation initiale du cycle plus importante que les associations ne contenant pas la souche C. Ces dernières se comportent alors à l'image des souches cultivées seules en présence de 2,4-D marqué sur le cycle. Le même type de comportement est dans ce cas vérifié par l'évolution de la variance (faible jusqu'à 12 jours d'incubation puis démesurément élevée) alors que celle-ci reste d'ampleur limitée pour les associations comprenant la souche C. Ces conclusions restent vérifiées dans le cadre des associations par 3. Les courbes de minéralisation par les associations de 2 ou 3 espèces n'incluant pas la souche C sont superposables (figure 1.13b1 et 2).

Il apparaît d'après ces résultats que :

1-la présence de la souche C (*Alcaligenes paradoxus*) est nécessaire à une minéralisation efficace du cycle de la molécule de 2,4-D.

2- La présence d'une ou de deux autres souches, quelles qu'elles soient retarde le processus de minéralisation du 2,4-D par la souche C. Ce résultat peut simplement être la conséquence du protocole expérimental suivi. Le nombre de cellules de la souche C introduit est divisé par deux ou par trois dans les associations microbiennes par rapport au nombre de cellules de cette souche lorsqu'elle est inoculée seule. Cependant, un effet inhibiteur doit intervenir puisque les cinétiques de minéralisation des associations contenant C et une ou deux autres souches de la communauté (et par conséquent un nombre différent de cellules de la souche C) sont malgré tout superposables (ne présentent pas d'effet souche significatif).

3- La présence des quatre souches entraîne l'apparition immédiate de l'activité dégradante maximale (absence de point d'inflexion sur les courbes) impliquant une collaboration entre les souches dans la dégradation de la molécule de 2,4-D

6.3.2 Minéralisation de la chaîne

L'effet souche était dans l'ensemble non significatif (figure 1.13a 1 et 2) et il était difficile, dans ce cas précis de réaliser des regroupements à priori. Le comportement de la communauté reconstituée se détachait par la forme de la courbe. On constatait en effet dans ce cas l'absence de point d'inflexion. Celle-ci pouvait constituer un groupe indépendant. De même les associations AB, AD, BD, et ABD (associations d'au moins deux souches ne contenant pas C)

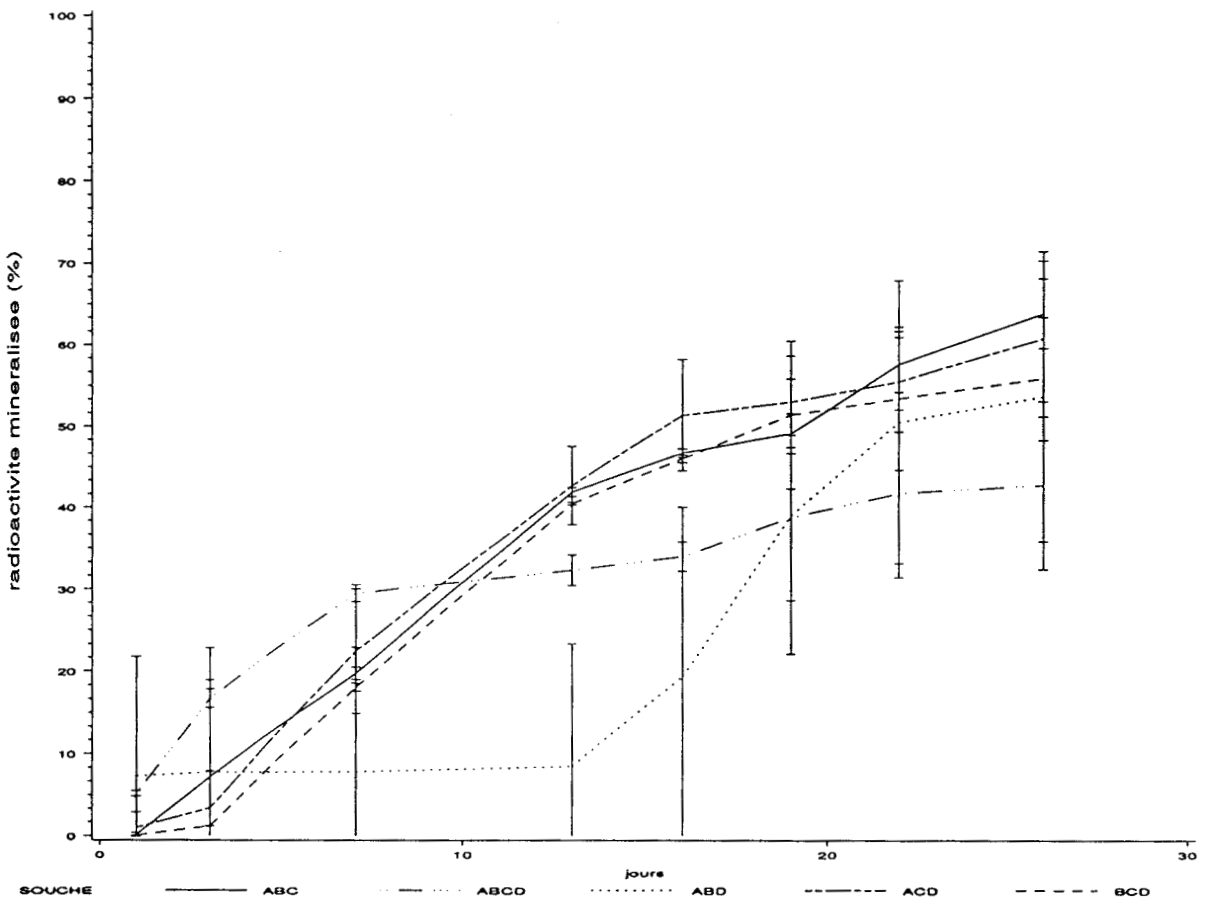
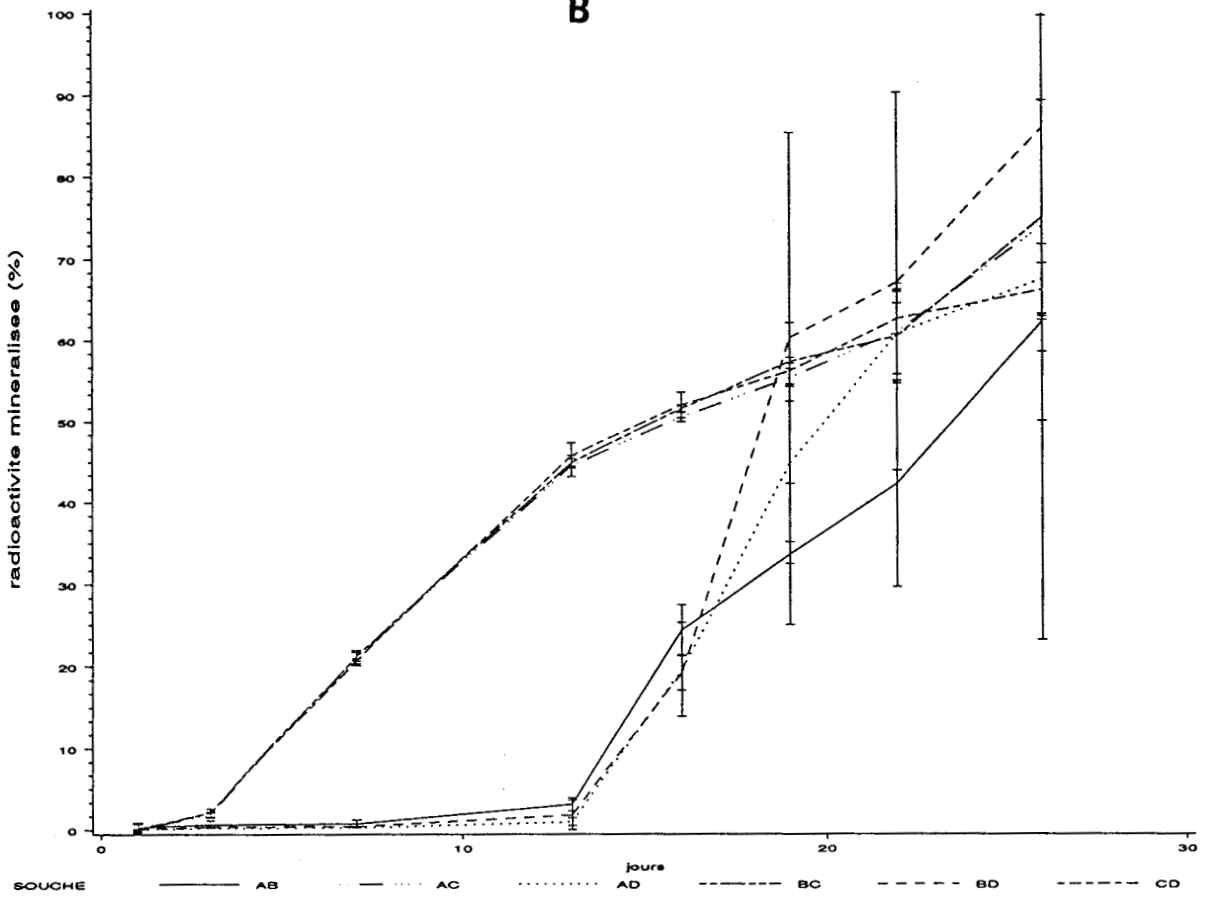
B

Figure 1.13 (suite) : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur la chaîne (A) et sur le cycle (B) par des associations de microorganismes isolés du chémostat.

montraient plus d'un point d'inflexion et présentait un comportement particulier. Cependant, le recours à d'autres techniques de traitement des données était nécessaire dans ce cas pour délimiter des sous-ensembles distincts de comportements au sein des associations de souches.

6.3.3 Comparaison des cinétiques de minéralisation du cycle et de la chaîne latérale de la molécule de 2,4-D

Enfin, les courbes de minéralisation de la chaîne et du cycle par la communauté reconstituée sont superposables, indiquant une identité de comportement des quatre micro-organismes dans la communauté reconstituée vis à vis de la minéralisation des deux parties de la molécule, phénomène que l'on ne retrouve pas dans les autres cas. La vitesse de minéralisation du cycle, comme celle de la chaîne sont plus élevées au début de l'expérience lorsque les quatre souches sont rassemblées.

Ces résultats nous ont donc poussés à rechercher quelle influence pouvait avoir la présence des souches A,B et D sur la dégradation de la molécule du 2,4-D par la souche C, en particulier lorsque celle-ci était marquée sur le cycle (minéralisation complète de la molécule). Nous avons cherché à définir, si ces souches permettaient d'accroître la capacité maximale de dégradation de l'herbicide (c'est à dire la vitesse maximale ou vitesse au point d'inflexion).

7-COMPARAISON DES CINÉTIQUES DE MINÉRALISATION DU 2,4-D MARQUÉ SUR LE CYCLE PAR LA SOUCHE C SEULE ET PAR LA COMMUNAUTÉ RECONSTITUÉE.

7.1 objectif de l'étude

Nous avons cherché à comparer la vitesse de dégradation du 2,4-D par la souche C seule à celle de l'association des quatre souches ABCD. Pour ce faire, nous avons repris les cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle précédemment obtenues. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés

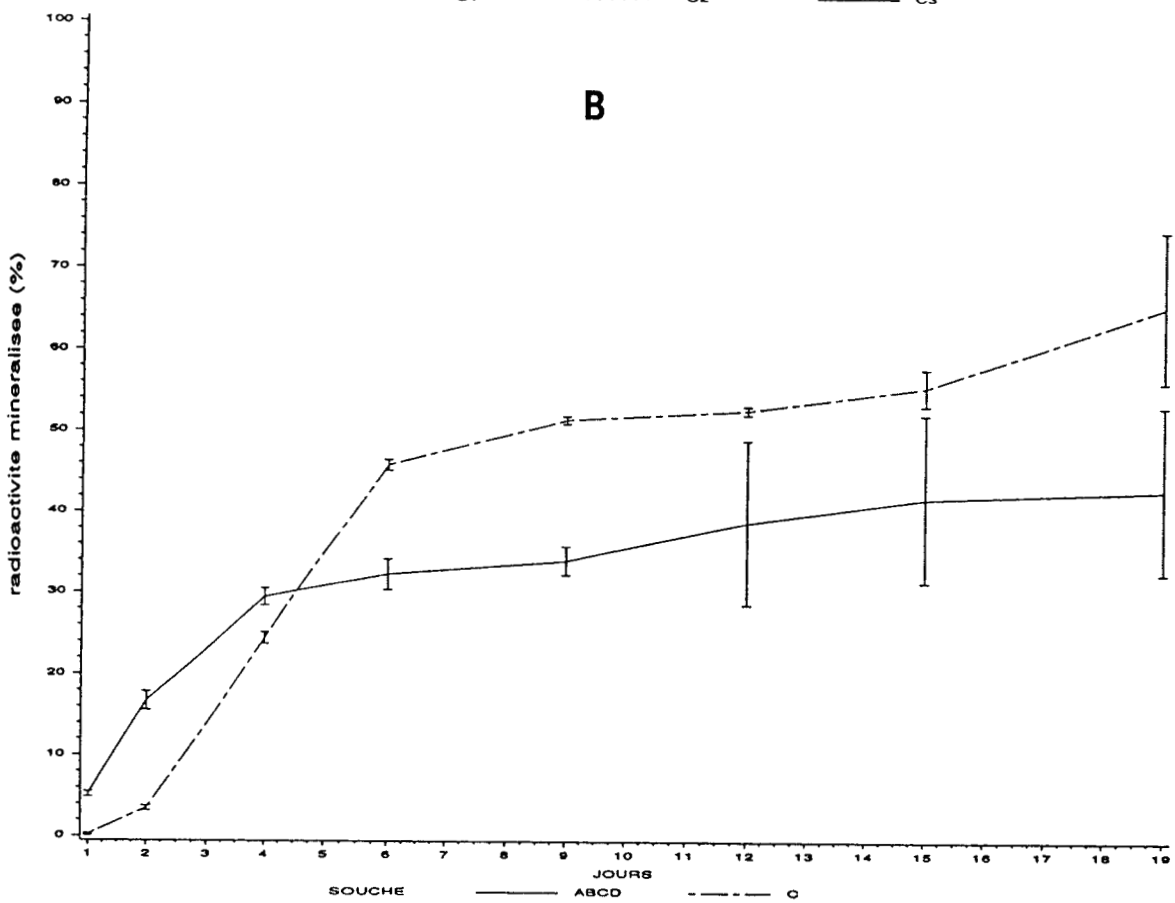
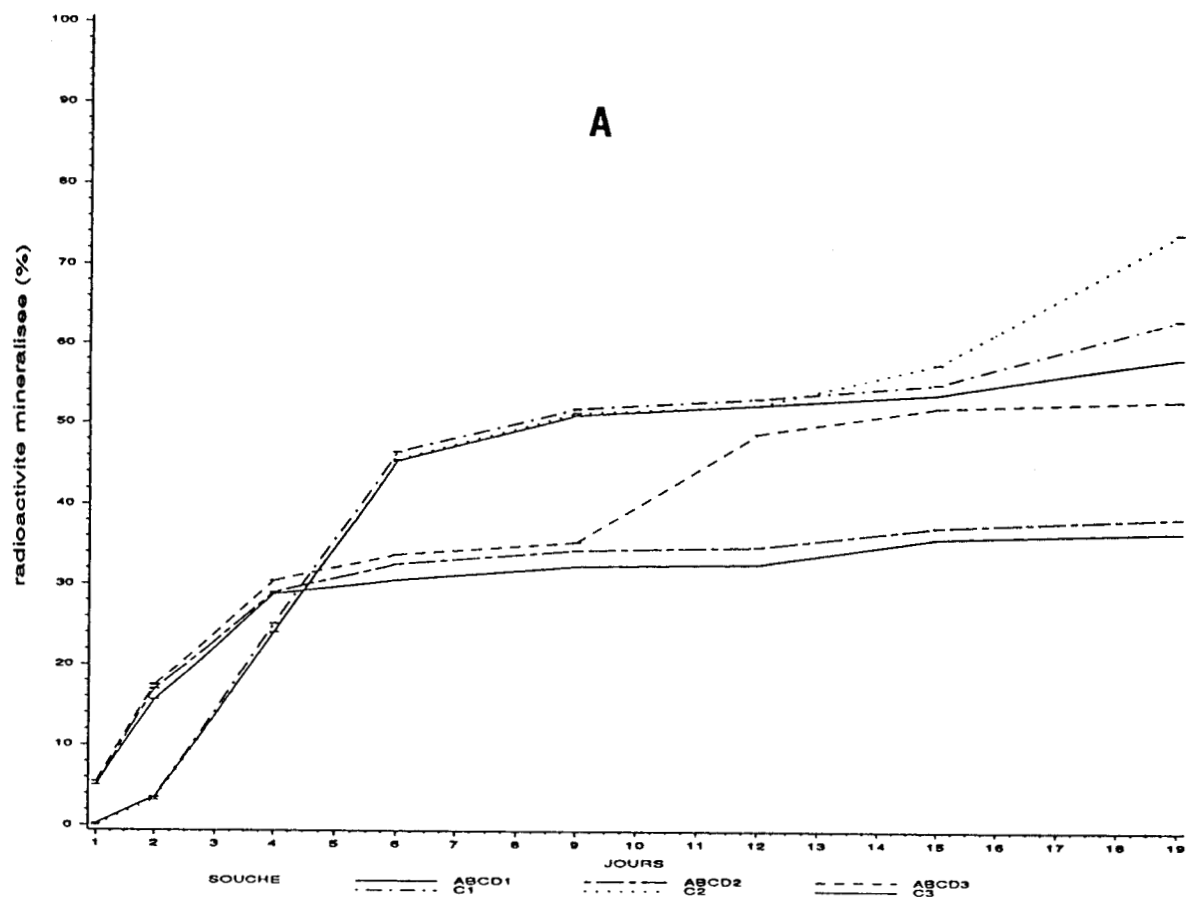


Figure 1.14 : Comparaison des cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle par la souche C seule et la communauté reconstituée.

A : mesures individuelles

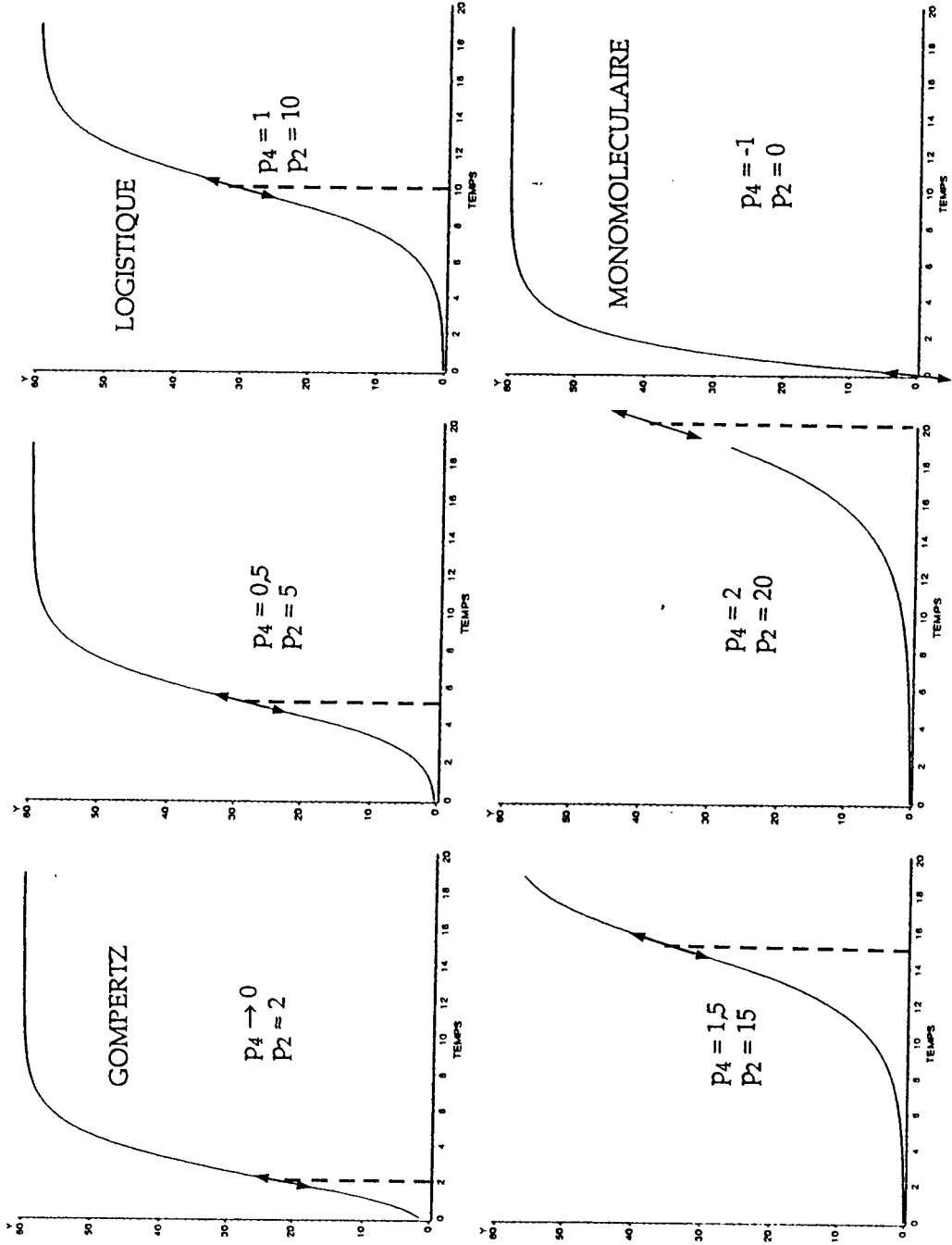
B : courbes moyennes

aux caractéristiques des courbes, puis nous avons tenté d'ajuster un modèle aux données obtenues.

7.2 comportement des courbes et définition d'un modèle

Les courbes de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle par la souche C seule et la communauté présentent des formes différentes. Il n'est pas utile dans ce cas d'effectuer un test sur l'interaction temps-souche, la différence de comportement étant immédiatement sensible à l'expérimentateur. La courbe de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle par la souche C seule montre une forme sigmoïde, de type logistique présentant un point d'inflexion entre deux "asymptotes". Une première limite est fixée par l'expérience, la concentration en CO₂ initialement dégagée étant supposée nulle, la deuxième pourrait être située en première approximation à la hauteur de 50% de la radioactivité minéralisée (figure 1.14 a). La courbe de minéralisation par la communauté reconstituée présente quant-à-elle une forme de type monomoléculaire (un point d'inflexion "virtuel" se situerait alors à l'origine), présentant une asymptote à la hauteur de 35% environ de radioactivité minéralisée.

Les quantités maximales de radioactivité minéralisée (représentées par les asymptotes supérieures) sont différentes. La communauté microbienne présente un taux de minéralisation maximum moins important que celui de la souche C lorsque celle-ci est cultivée seule. Ces résultats pourraient s'interpréter par un taux d'incorporation plus important de la radioactivité dans la biomasse au sein de la communauté. Celle-ci pourrait être due soit à une croissance microbienne (formation de biomasse à partir du carbone marqué) soit à une simple accumulation de produit marqué au sein de cette biomasse sans métabolisme ultérieur. Un redémarrage de la minéralisation semble se produire sur les courbes moyennes (par classe) au bout de 9 jours d'incubation pour la communauté et au bout de 15 jours d'incubation pour la souche C seule. Dans le premier cas, ce redémarrage résulte d'une erreur expérimentale comme le montrent les cinétiques individuelles (figure 1.14 b). Dans le second cas, la tendance se retrouve sur l'ensemble des courbes individuelles et pourrait traduire un début d'épuisement des réserves dans le milieu poussant les cellules



LOGISTIQUE GENERALISEE :

$$y = p_5 + p_1 x (1 + p_4 \exp((p_2 - t) / p_3)^{-1} / p_4)$$

$p_5 = 0$
 $p_1 + p_5 = 60$
 $p_2 = 10 p_4$ sauf pour GOMPERTZ et MONOMOLECULAIRE
 $p_3 = 1,5$

Figure 1.15 : Les différentes formes de courbes générées par simulation à partir du modèle logistique généralisé

à consommer leurs réserves carbonées. Le carbone marqué, initialement accumulé dans la cellule, serait alors minéralisé.

Le comportement des deux classes de courbes était donc différent. Or les tests sur les paramètres d'un modèle ne peuvent s'appliquer que si l'ensemble des courbes sont ajustées à un même modèle ou à des modèles emboîtés (même formulation, même signification des paramètres communs). Il était donc nécessaire de choisir une formulation mathématique pouvant rendre compte des deux types de comportements tout en évitant une surparamétrisation du modèle compte-tenu du nombre relativement restreint de mesures dans le temps. Notre but étant simplement de comparer les vitesses de minéralisation maximale afin de savoir si la présence de A, B et D avait pour conséquence d'augmenter la vitesse de minéralisation du 2,4-D par la souche C (ce qui ne ressort pas directement à l'observation des courbes), une approche mécaniste n'était pas, dans un premier temps, indispensable. Il se trouve que les courbes obtenues par simulation à partir du modèle logistique généralisé (dont les modèles logistique et monomoléculaire constituent des sous-modèles) présentaient à première vue des comportements analogues à ceux de nos données expérimentales (figure 1.15) à l'exception près du dernier temps de mesure pour la souche C. Ce phénomène étant sans aucun doute le résultat d'une culture en batch prolongée nous avons pris le parti de le négliger. Nous avons donc tenté d'ajuster nos données expérimentales au modèle logistique généralisé et à ses deux sous-modèles, les modèles logistique et monomoléculaire. La démarche a été dans un premier temps de partir des modèles particuliers les plus simples (présentant le plus faible nombre de paramètres) et de tester indépendamment pour chaque classe de courbe ("C" et "ABCD") l'effet de l'introduction d'un paramètre supplémentaire sur la qualité de l'ajustement.

7.2 Pondération des mesures expérimentales

Compte-tenu de nos conclusions concernant la variance, nous avons cherché à pondérer l'influence des valeurs expérimentales obtenues dans nos estimations. Nous souhaitions accorder à nos résultats expérimentaux une "fiabilité" inversement proportionnelle à leur variance de manière à ce que le "poids", dans les estimations, des informations recueillies à la fin de l'expérience soit moindre par rapport à celle réalisées aux courts temps d'incubation. Traditionnellement, on définit comme fonction de pondération (P), l'inverse de la

1. Logistique généralisée

Modèle : $y(t) = p_5 + p_1 / [1 + p_4 \exp [(p_2-t) / p_3]]^{1/p_4}$

Paramètres :

p_5	est l'asymptote inférieure
p_1	est l'asymptote supérieure
p_2	est l'abscisse du point d'inflexion
$[p_1/(1+p_4)]^{1/p_4}$	est l'ordonnée du point d'inflexion

Modèle reparamétré

$$y(t) = p_5 + p_1 [1 + p_4 \exp [(p_2-t) / p_3 (V_m(1 + p_4))^{(1+p_4)/p_4}]]^{-1/p_4}$$

Nouveau paramètre

$$V_m \text{ est la vitesse au point d'inflexion : } V_m = p_1/p_3 (1 + p_4)^{(1+p_4)/p_4}$$

2. Logistique (cas particulier du modèle général pour $p_4 = 1$)

Modèle : $y(t) = p_5 + p_1 / [1 + \exp [(p_2-t) / p_3]]$

Paramètres

p_5	est l'asymptote inférieure
p_1	est l'asymptote supérieure
p_2	est l'abscisse du point d'inflexion
$(p_1+p_5)/2$	est l'ordonnée du point d'inflexion
$p_1/4p_3$	est la vitesse au point d'inflexion

Modèle reparamétré

$$y(t) = p_5 + p_1 / [1 + \exp [(p_2-t) V_m / 4]]$$

Nouveau paramètre

$$V_m \text{ est la vitesse au point d'inflexion : } V_m = p_1/4p_3$$

3. Monomoléculaire (cas particulier du modèle général pour $p_4 = -1$ et $p_2 = 0$)

Modèle : $y(t) = p_5 + p_1 [1 - \exp (-t / p_3)]$

Paramètres

p_5	est l'asymptote inférieure
p_1	est l'asymptote supérieure
p_1/p_3	est la vitesse à l'origine (point d'inflexion virtuel)

Modèle reparamétré

$$y(t) = p_5 + p_1 [1 - \exp (-V_m t / p_1)]$$

Nouveau paramètre

$$V_m \text{ est la vitesse au point d'inflexion : } V_m = p_1/p_3$$

Figure 1.16 : Expressions mathématiques des modèles ajustés aux données expérimentales et signification des paramètres.

variance, après avoir ajusté cette dernière à un modèle. Dans notre cas, une fonction croissante du temps (t) devait être choisie pour la variance. Cependant, une fonction linéaire en t ou t^2 apparaissait inadéquate et une fonction exponentielle du temps (du type $a \exp(b.t)$, a et b étant des constantes réelles positives pouvant être déterminées par l'ajustement de la variance. au modèle proposé) ne convenait que dans le cas de la souche C. De plus, elle impliquait ultérieurement d'associer à une mesure présentant une variance nulle, un poids infini. Nous avons donc recherché une fonction de pondération P qui associe à une mesure ayant un écart-type (σ) nul (mesure certaine) le poids 1 et qui accorde un poids tendant vers 0 lorsque son écart-type tend vers l'infini. Aussi nous avons posé $P = \exp(-b. \sigma)$. "b" a été arbitrairement fixé à 0,092 (cette valeur de la constante nous permettait d'affecter à une mesure présentant un écart-type de 50% une pondération égale à un centième de celle d'une valeur certaine). Nous avons alors testé l'influence de ce type de pondération sur la qualité des estimations obtenues.

7.3 Modèles ajustés et méthodes utilisées.

Les modèles ajustés aux données sont présentés sur la figure 1.16 Nous avons également indiqué sur cette figure la signification des paramètres. Les ajustements ont été réalisés à l'aide de la procédure "nlin" du logiciel SAS en spécifiant l'option "Marquardt" permettant d'utiliser l'algorithme de Gauss-Marquardt pour le calcul de la direction de descente lors de l'étape de minimisation de la fonction des moindres carrés. L'option "weight" permet alors de travailler à l'aide de l'estimateur des moindres carrés pondérés sur un fichier contenant les mesures expérimentales affectées de leur poids.

7.4 Le test du rapport de vraisemblance

Soit A l'hypothèse à tester ("un modèle à p_A paramètre convient") et H l'hypothèse adverse ("un modèle à p_H paramètres suffit") Dans la mesure où la variance est une fonction du plan d'expérience mais non des paramètres du modèle (nous supposons être dans ce cas), l'estimateur des moindres carrés pondérés est équivalent à l'estimateur du maximum de vraisemblance. Un test F peut être réalisé sur le rapport :

MODELES	ESTIMATIONS						SC _E	SC _R	DDL
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	V _M			
1 logistique P ₅ =0 non pondéré (3 paramètres)	56,14	4,37	0,99	-	-	14,177 ⁽¹⁾	45857	503	21
2 logistique P ₅ =0 pondéré (3 paramètres)	54,78	4,30	1,04	-	-	13,168 ⁽¹⁾	36759	289	21
3 logistique P ₅ ≠0 pondéré (4 paramètres)	59,88	4,08	1,17	-	-4,65	12,795 ⁽¹⁾	36786	261	20
4 logistique généralisé P ₅ =0 pondéré (4 paramètres)	55,79	3,65	1,61	1,5.10 ⁻⁷	-	12,748 ⁽¹⁾	36800	247	20
5 logistique généralisé P ₅ ≠0 pondéré (5 paramètres)	55,99	3,64	1,62	1.10 ⁻⁷	-0,19	12,715 ⁽¹⁾	36801	247	19
6 logistique reparamétré P ₅ ≠0 pondéré (3 paramètres)	60,02	4,08	-	-	-4,77	12,5 ⁽²⁾	36787	260	20
7 logistique généralisé reparamétré pondéré (4 paramètres)	convergence non obtenue								

(1) valeur calculée à partir des autres paramètres

(2) valeur estimée

SC_E : somme des carrés des écarts (variabilité expliquée par la régression)

SC_R : somme des carrés résiduels (variabilité résiduelle)

DDL : degrés de liberté

Figure 1.17 : Résultats des ajustements réalisés à partir des cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle par la souche C.

$$\frac{(SS_R(\hat{\Theta}_H) - SS_R(\hat{\Theta}_A)) / (p_A - p_H)}{SS_R(\hat{\Theta}_A) / (n - p_A)} \underset{\infty}{\sim} F(p_A - p_H, n - p_A)$$

où les sommes des carrés SCR ont été obtenues après ajustement du modèle aux données expérimentales à l'aide de l'estimateur des moindres carrés pondérés (n est le nombre d'observations).

Ce test peut être également utilisé pour vérifier l'identité (ou la différence) d'un paramètre intervenant dans deux modèles différents à condition que ces derniers soient "emboîtes". Il a donc été appliqué pour définir, d'une part, le modèle le plus adapté (parmi les modèles testés) à l'ajustement des cinétiques de minéralisation du 2,4-D par la souche C et la communauté reconstituée, et d'autre part, l'existence d'une différence entre les vitesses maximales de minéralisation du 2,4-D. La répartition des résidus a également été observée. Elle constitue un critère important qu'il faut considérer lors du choix d'un modèle.

7.5 Résultats -discussion

L'utilisation de la pondération est justifiée par le comportement de la variance : on remarque qu'elle améliore la qualité des ajustements (la diminution de la variabilité résiduelle (SCR) sur la figure 1.17 entre les cas 1 et 2 est rapportée à titre d'exemple). L'influence de la reparamétrisation qui fait intervenir directement la vitesse maximale dans l'expression du modèle logistique ajusté est moins sensible (cas 3 comparé à 6). Elle permet cependant d'effectuer des tests ultérieurs concernant la différence de vitesse maximale entre les deux types de cinétiques étudiées (ce qui ne serait pas acceptable sur des expressions faisant intervenir plusieurs paramètres estimés). Parmi l'ensemble des modèles ajustés aux cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle par la souche C, les modèles logistiques généralisés sans asymptote inférieure puis le modèle logistique reparamétré se sont avérés les plus adéquats compte-tenu des sommes des carrés résiduelles obtenues rapportés à leur degré de liberté. Cependant, l'introduction d'un paramètre supplémentaire relativement au modèle ajusté le plus simple (modèle logistique sans asymptote inférieure) ne semblait pas être justifiée d'après le résultat des tests du rapport de vraisemblance (figure 1.18). Compte-tenu d'une meilleure répartition des résidus nous avons cependant préféré conserver les résultats des ajustements obtenus pour ces modèles et accepté un risque de première espèce de l'ordre de 15 %.

hypothèse testée	cas comparés à partir de la figure 1.17	$\frac{(SS_R(\hat{\Theta}_H) - SS_R(\hat{\Theta}_A)) / (p_A - p_H)}{SS_R(\hat{\Theta}_A) / (n - p_A)}$	$F_{\substack{P_A - P_H \\ n - P_A}}(P_A - P_H, n - P_A)$	$F_{5\%}$	risque de 1 ^{ère} espèce	décision
introduction d'une asymptote inférieure	3 et 2	2,25	1 21	4,32	14,85%	NS
position du point d'inflexion	4 et 2	2,38	1 21	4,32	13,78%	NS
position du point d'inflexion et asymptote inférieure	5 et 2	1,19	2 21	3,47	32%	NS

NS : non significatif

Figure 1.18 : Résultats des tests du rapport de vraisemblance relatifs à l'introduction de paramètres supplémentaires au modèle logistique sans asymptote inférieure.

MODELES (données pondérées)	ESTIMATIONS						SC _E	SC _R	DDL
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	V _M			
1 monomoléculaire P ₅ =0 (2 paramètres)	41,46	-	4,04	-	-	10,262 ⁽¹⁾	15498	328	22
2 monomoléculaire P ₅ ≠0 (3 paramètres)	47,37	-	2,89	-	-7,86	14,315 ^{(1)*}	15535	291	21
3 logistique généralisé P ₅ ≠0 (5 paramètres)	42,00	1,00	1,81	1.10 ⁻⁷	-6	8,58 ⁽¹⁾	15427	400	19
4 monomoléculaire reparamétré P ₅ ≠0 (3 paramètres)	47,37	-	-	-	-7,86	16,38 ^{(2)*}	15535	291	21

(1) valeur calculée à partir des autres paramètres

(2) valeur estimée

* l'introduction d'un P₅ négatif revient à supposer une phase de latence avant l'apparition de l'activité dégradante. Le paramètre à retenir est, dans ce cas, la vitesse à l'intersection de la courbe avec l'axe des abscisses :

- modèle 2, v₀ (temps = 0,524 jour; radioactivité minéralisée = 0) = 13,671% jour⁻¹

- modèle 4, v₀ (temps = 0,279 jour; radioactivité minéralisée = 0) = 15,14% jour⁻¹

Figure 1.19 : Résultats des ajustements réalisés à partir des cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle par la communauté reconstituée (souches A, B, C, D).

hypothèse testée	cas comparés à partir de la figure 1.19	$\frac{(SS_R(\hat{\theta}_H) - SS_R(\hat{\theta}_A)) / (p_A - p_H)}{SS_R(\hat{\theta}_A) / (n - p_A)}$	$F_{\frac{p_A - p_H}{p_A - p_H}, \frac{n - p_A}{n - p_A}}$	$F_{5\%}$	risque de 1 ^{ère} espèce	décision
ordonnée à l'origine non nulle	2 et 1	2,797	1 22	4,30	10,86%	NS
introduction d'un point d'inflexion et d'une asymptote inférieure	3 et 1	augmente la SC_R	- -	-	-	NS

NS : non significatif

SC_R : somme des carrés résiduels

Figure 1.20 : Résultats des tests du rapport de vraisemblance relatifs à l'introduction des paramètres supplémentaires au modèle monomoléculaire sans asymptote.

Les valeurs de V_m (respectivement recalculées d'après les estimations ou estimées directement) étaient alors de 12,7 et 12,5 % de radioactivité minéralisée par jour pour la souche C.

Le même type de démarche nous a conduits à estimer la vitesse maximale de minéralisation du 2,4-D par la communauté reconstituée à une valeur de 14,3 à 16,4 % par jour, ce qui représentait des valeurs maximales effectives de 13,67 à 15,14 % de radioactivité minéralisée par jour. En effet l'introduction d'un paramètre p_5 non nul dans le modèle monomoléculaire et estimé comme étant un réel négatif, revient à considérer en pratique, la présence d'une phase de latence dans la minéralisation. (Ces valeurs ont respectivement été calculées d'après les estimations du modèle monomoléculaire et estimées directement par son homologue reparamétré (figures 1.19 et 1.20). Les meilleurs ajustements réalisés pour la souche C et la communauté reconstituée (au regard de la répartition des résidus et des écarts-types des paramètres) ont été présentés sur la figure 1.21 (a et b). Compte-tenu de nos résultats il apparaissait douteux de vérifier à l'aide d'un test statistique si la différence observées entre les deux vitesses estimées était significative. Un test du rapport de vraisemblance pouvait être réalisé entre les deux modèles reparamétrés. Il nous a conduit à conclure, comme on pouvait l'attendre, à une différence non significative entre les deux vitesses maximales de minéralisation (donc encore moins significative entre les vitesses maximales effectives.) Cependant, et surtout dans le cas des cinétiques de minéralisation du 2,4-D par la communauté reconstituée, le plan d'expérience apparaissait inadéquat. Aucune mesure n'avait été réalisée entre 0 et 24 heures d'incubation et ne permettait pas de nous orienter dans le choix d'un modèle. Nous ne pouvions décider, au vu des résultats, de la présence effective d'un point d'inflexion ou d'une phase de latence. Le paramètre que l'on cherchait à estimer sortait du cadre du plan d'expérience et la tendance pressentie pouvait sans doute être confirmée à l'aide d'un plan expérimental ciblé (Bardsley et Mc Ginlay, 1989; Vila, 1990).

Il est surtout nécessaire, pour ces interprétations de revenir d'une part aux dénombrements des souches introduites dans les tubes sur lesquels nous avons effectués nos mesures de taux de minéralisation (figure 1.21 c) et d'autre part, aux mesures des taux de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle effectuées sur les souches A,B et D cultivées seules. Pour ces dernières, il était apparu que la vitesse initiale de minéralisation du cycle était quasi-nulle. Or il se trouve que la vitesse de minéralisation maximale du cycle pour la communauté reconstituée est à peu de choses près, sa vitesse initiale. La différence de vitesse maximale entre les cinétiques de minéralisation du cycle par la souche C seule et

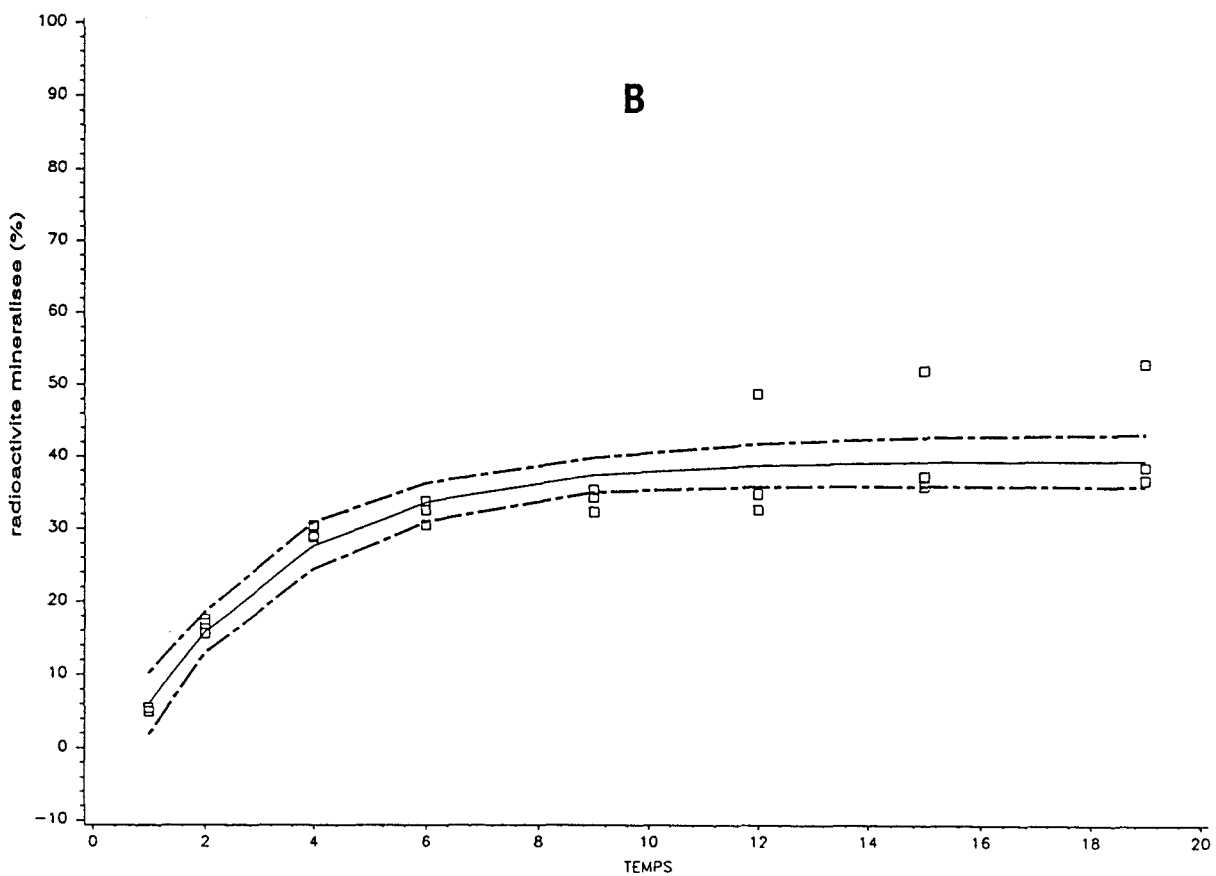
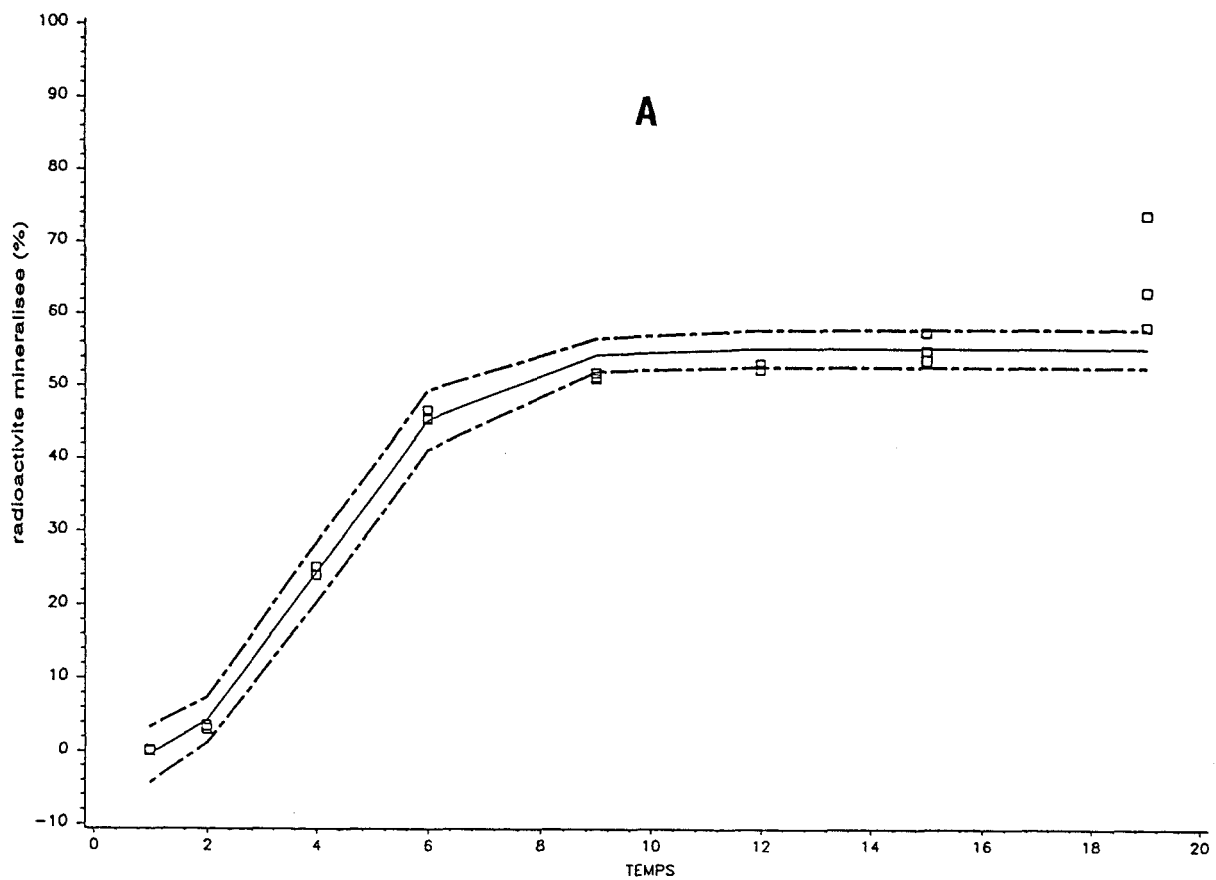


Figure 1.21 : Ajustements des courbes de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle
 A : souche C, modèle logistique
 B : communauté reconstituée, modèle monomoléculaire
 □ : données expérimentales
 — : courbe ajustée
 --- : intervalle de confiance

la communauté reconstituée ne peut, par conséquent être attribuée à l'activité additionnelle des souches A,B, et D. De plus, les résultats des dénombrements montrent que l'augmentation (même statistiquement non significative) de la vitesse maximale ne peut être attribuée à un plus grand nombre de souches C présentes au sein de la communauté reconstituée compte-tenu du protocole de répartition des souches (figure 1.21 c). Il est par conséquent probable que l'augmentation d'activité maximale soit liée à une interaction positive entre les souches (et que d'autres niveaux d'inoculation de la souche C auraient conduit à une différence statistiquement significative).

Ces résultats suggèrent donc que la présence des trois souches A, B, et D permettrait d'accroître la capacité d'*A. paradoxus* à dégrader le 2,4-D. La souche d'*A. paradoxus* présente dans le chémostat étant capable de minéraliser seule la totalité de la molécule de 2,4-D, il était peu vraisemblable que les relations entre les souches soient de nature coopérative (dans le sens d'une co-opération métabolique dans la dégradation). Nous nous sommes orientés vers la recherche de relations trophiques entre les différentes souches. La souche C, bien que capable de croître sur 2,4-D comme seule source de carbone, pouvait être dépendante des autres membres de la communauté vis-à-vis d'une source de carbone, d'azote, d'acides aminés...

8 RECHERCHE DE RELATIONS TROPHIQUES ENTRE LES SOUCHES DE LA COMMUNAUTÉ DÉGRADANT LE 2,4-D.

8.1 Matériel et méthode

Nous avons cultivé la souche C seule en chémostat en ajoutant successivement au milieu de base contenant 200 mg l⁻¹ de 2,4-D, de la méthionine à 20 mg l⁻¹, à 10 mg l⁻¹ (source de carbone, d'azote et de soufre), du glutamate à la même concentration (source de carbone et d'azote) puis du glucose, toujours à 20 mg l⁻¹ (source de carbone). Nous avons alors suivi la concentration en 2,4-D dans le chémostat par spectrophotométrie U.V. pour savoir si l'adjonction de ces substances au milieu de culture pouvait favoriser la dégradation du 2,4-D. Les différentes substances ont été ajoutées au milieu

	nombre de bactéries introduites par tube					souche C (% du total)	vitesse max. estimée (% jour ⁻¹)
	A	B	C	D	total		
Communauté reconstituée	1,4 . 10 ⁶	6 . 10 ⁶	0,7 . 10 ⁶	8,9 . 10 ⁶	17 . 10 ⁶	4	13,7 à 15,1
Souche C seule	-	-	2,8 . 10 ⁶	-	2,8 . 10 ⁶	100	12,5 à 12,7

figure1.21c : Relation entre la vitesse maximale de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle (en pourcentage de la radioactivité initiale introduite) et le nombre de bactéries apportées à t=0.

d'alimentation du chémostat et l'effet sur la dégradation du 2,4-D a été observé sur une période de 5 à 20 jours.

8.2 Résultats- discussion

Les résultats sont présentés sur la figure 1.22. On remarque que la méthionine permet d'accroître la capacité de la souche C à dégrader le 2,4-D lorsque celle-ci est ajoutée au milieu à raison de 20 mg l⁻¹. Si l'on diminue la concentration en méthionine, la concentration en 2,4-D remonte dans le chémostat. Un apport de glutamate ajouté au milieu de culture à raison de 20 mg l⁻¹ entraîne une nouvelle diminution de la concentration en 2,4-D, qui était remontée à plus de 60 mg l⁻¹. L'ajout de méthionine à raison de 10 mg l⁻¹ au milieu d'alimentation du chémostat provoque une lente remontée de la concentration en 2,4-D de celui-ci alors qu'une augmentation brusque de la concentration en 2,4-D est observée si l'on supprime complètement la méthionine dans le milieu. L'addition de 20 mg l⁻¹ de glucose suffit à faire chuter la concentration du 2,4-D dans le chémostat. Il apparaît donc que la dégradation du 2,4-D par la souche d'*A. paradoxus* étudiée est favorisée par l'apport d'une source carbonée autre que le pesticide. La nécessité de la présence de substrats carbonés autres que le pesticide pour la dégradation de ces derniers par des souches microbiennes a déjà été maintes fois soulignée dans la bibliographie. Ainsi, Rosenberg et Alexander (1980) ont isolé 19 souches microbiennes capables de dégrader le 2,4,5-T en présence d'une autre source de carbone (glucose, glycérol ou succinate). Ils ont montré qu'en présence de ces substrats, certaines souches étaient capables d'assurer l'ouverture du cycle aromatique de la molécule de 2,4,5-T. Bauer *et al.* (1979), ont mis en évidence la formation d'un monochlorophénol par une souche de *Pseudomonas* sp. lorsque celle-ci était cultivée sur 2,4-D en présence de benzoate.

Au sein de communautés microbiennes dégradant un xénobiotique, des relations trophiques où l'un des membres de la communauté fournirait à un autre un substrat nécessaire à sa croissance ont déjà été signalées (Lappin-Scott *et al.*, 1986). Nos résultats suggèrent qu'une relation de ce type peut exister au sein de notre communauté. Malgré l'aptitude des différentes souches à dégrader le 2,4-D, une différence de vitesse de métabolisme de la molécule ou de rendement de transformation a dû conduire à une forme de "spécialisation" des souches, responsable sans doute de leur interdépendance et donc de la stabilité de la communauté étudiée. Une autre explication serait que l'une des souches A,

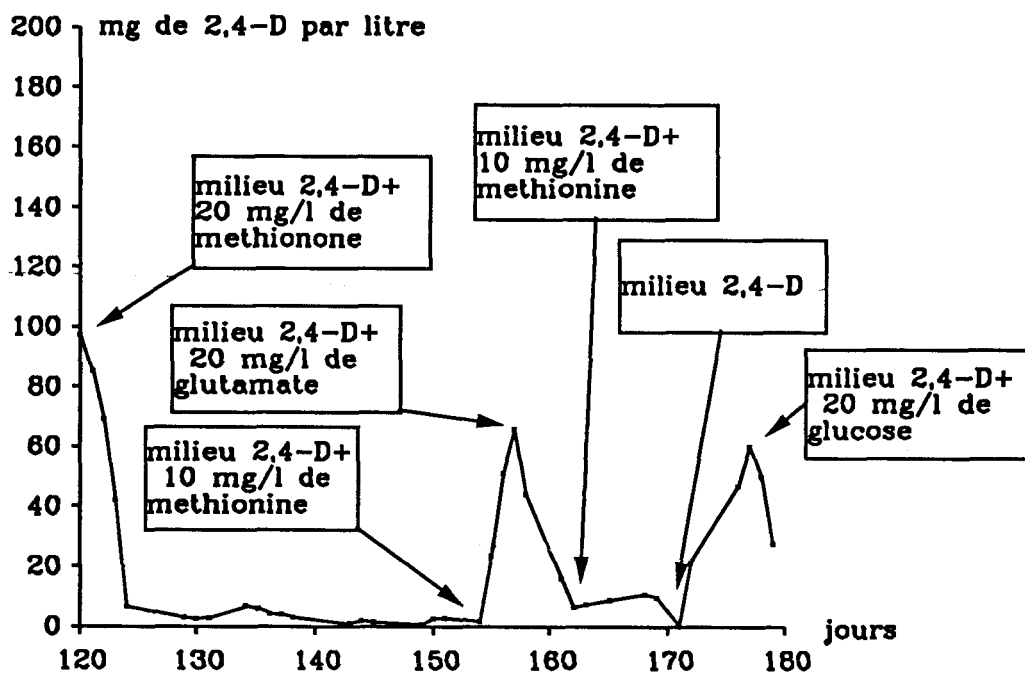


Figure 1.22 : Effet de différents apports de substrats carbonés au milieu de base sur la cinétique de dégradation du 2,4-D par la souche C (d'après Dictor, 1990).

B ou D (ou plusieurs d'entre elles) jouerait le rôle d'"éboueur" maintenant dans le milieu des conditions propres à une bonne croissance.

Une autre façon de répondre à la question : "quel rôle jouent les souches A,B et D au sein de la communauté ? " était de comparer, directement dans le chimostat, l'activité de la souche C seule à celle de la communauté microbienne. Nous disposions désormais de connaissances à priori sur les vitesses de minéralisation de la molécule par la communauté et par la souche C seule. Il était également intéressant d'évaluer le taux de croissance maximal de cette souche et de le comparer à celui de la communauté microbienne. Une étude en chimostat devait nous permettre également de confirmer nos premiers résultats.

9 DÉTERMINATION DU TAUX DE CROISSANCE DE LA SOUCHE D'*A. PARADOXUS* DÉGRADANT LE 2,4-D EN CULTURE CONTINUE EN FONCTION DU TAUX DE DILUTION.

9.1 Matériel et méthodes

La souche C a été maintenue seule dans le chimostat décrit en 1.1. Le système de collecte automatique des échantillons décrit au même paragraphe permettait d'effectuer une mesure de la concentration en 2,4-D du chimostat toutes les 40 minutes environ. Ces dosages étaient réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre U.V. Le chimostat a été alimenté par le milieu décrit en annexe I (2.4) et contenant 200 mg de 2,4-D par litre. Différents taux de dilutions ont été appliqués (0,002; 0,004; 0,006 et 0,007 h⁻¹). Nous avons attendu à chaque fois qu'un nouvel état d'équilibre soit atteint avant toute nouvelle modification des conditions de l'étude.

9.2 Résultats -Discussion

L'évolution de la concentration en 2,4-D dans le chimostat a été représentée sur la figure 1.23 pour les trois premiers taux de dilutions appliqués, une augmentation de la concentration en substrat était progressivement visible. Nous avons présenté sur la figure 1.24 l'évolution du taux de dilution (et par

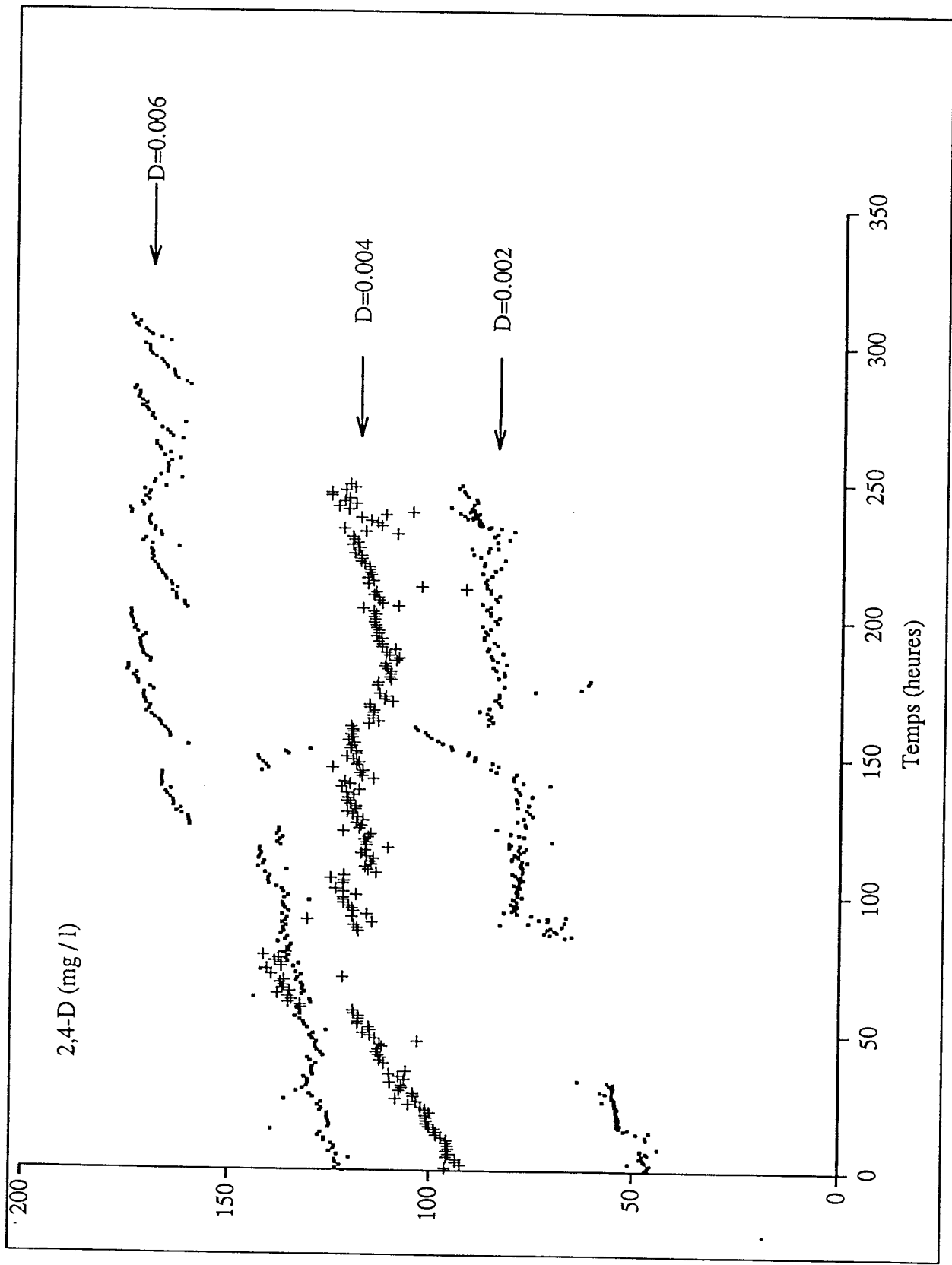


Figure 1.23 : Suivi de la dégradation du 2,4-D par la souche *A. paradoxus* isolée du chémostat en fonction du taux de dilution exprimé en heure⁻¹

conséquent du taux de croissance) en fonction de la concentration en 2,4-D dans le chémostat. Cependant l'application d'un taux de dilution plus important (0.07 h^{-1}), a conduit à une chute de la concentration en 2,4-D, et ne nous a pas permis de pousser plus loin cette étude. Le phénomène traduisait sans aucun doute une instabilité de la souche C, peut être sous l'action de mutations qui pouvaient donner naissance à des phénotypes mieux adaptés aux conditions de culture appliquées.

10 CONCLUSIONS

Le dispositif expérimental utilisé pour les mesures de vitesses de minéralisation nous a permis de mettre en évidence une tendance de la communauté microbienne à accroître la capacité de minéralisation du 2,4-D de la souche d'*A.paradoxus*. Cependant, les biais introduits par notre plan d'expérience et notre dispositif de mesure ne nous ont pas permis de confirmer la réalité de cette tendance. Le premier biais est introduit par notre dispositif. Celui-ci génère des erreurs expérimentales artificiellement élevées parce que cumulatives, conséquences d'une corrélation des mesures dans le temps. Il serait cependant possible de conserver le même dispositif tout en réalisant des mesures indépendantes. Il serait alors nécessaire de sacrifier à chaque mesure les échantillons. Ce type de dispositif devrait permettre également de mesurer la radioactivité incorporée dans la biomasse en évitant les déperditions dues aux fréquentes ouvertures des flacons.

Un gain de précision pourrait également être obtenu par une meilleure planification de l'expérience. Il est en effet possible d'optimiser le plan expérimental en s'appuyant sur les premières estimations obtenues et définir un plan approprié à l'estimation précise de certains paramètres (critère de D-optimalité). Il est nécessaire en effet de souligner que les paramètres auxquels nous nous intéressons ont tendance à être extrapolés à partir des données expérimentales. Ceci est particulièrement vrai dans le cas des courbes de minéralisation du 2,4-D par la souche C pour laquelle la vitesse maximale de minéralisation semble être la vitesse initiale alors qu'aucune mesure de dégradation n'est réalisée avant 24 heures d'incubation. Il serait cependant préférable avant de s'engager dans une telle approche de définir préalablement un modèle explicatif tenant compte d'une incorporation de la radioactivité dans la biomasse. Un modèle à compartiment pourrait convenir pour représenter le comportement de la radioactivité entre le moment de son incorporation par la

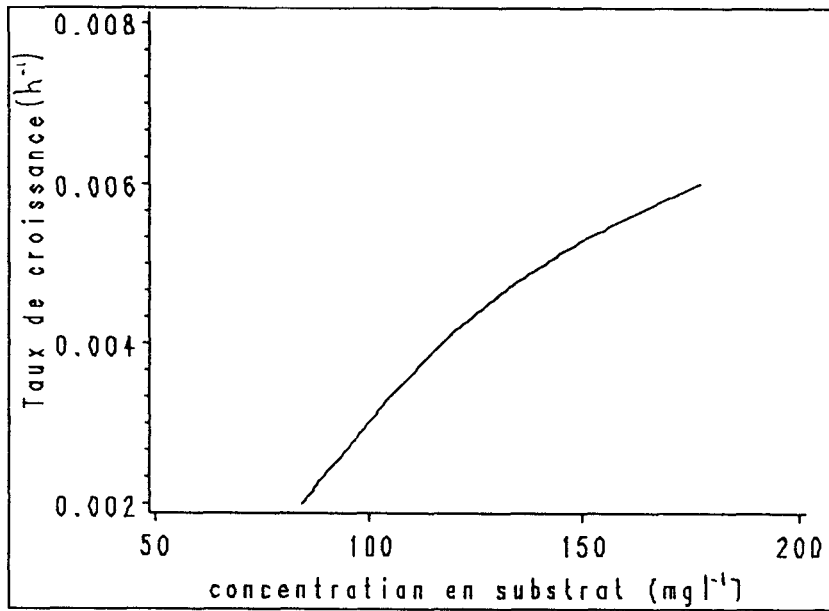


Figure 1.24 : Evolution du taux de croissance en fonction de la concentration en 2,4-D à la sortie du chémostat.

cellule et son métabolisme proprement dit aboutissant à la production de CO₂ marqué. Enfin, l'utilisation des techniques de l'analyse des données pourrait apporter des renseignements complémentaires. Celle-ci pourrait se faire directement sur les données expérimentales obtenues en réalisant une Analyse en Composantes Principales. Une telle approche nécessiterait cependant des précautions particulières compte-tenu de la non-indépendance des données dans le temps (Jolliffe, 1986). Il serait préférable de réaliser cette analyse ultérieurement sur les paramètres de modèles ajustés aux données expérimentales et sur les résidus obtenus après ajustement (Houiller, 1987; Caussinus et Ferre, 1989). Une telle démarche apporterait sans doute un complément d'information sur l'organisation des données recueillies et donc sur les relations entre les souches composant la communauté dégradant le 2,4-D dans notre chémostat.

Les conclusions auxquelles cette étude a abouti ne sont donc que partielles. Sans doute ne nous a-t-elle permis que d'apprécier des tendances. La confirmation de celles-ci nécessite de poursuivre le travail entrepris, de le compléter par d'autres approches, par d'autres méthodes, par d'autres moyens. " C'est par recoupement, par comparaison, par validation d'un modèle qu'on finit par se convaincre d'une relation entre variables et par lui donner une forme" déclare J.M. Legay dans son discours d'introduction sur les " méthodes et modèles dans l'étude des systèmes complexes" mais sans doute ne faut-il pas limiter cette affirmation aux modèles mathématiques. Notre chémostat, notre communauté ne sont eux-aussi que des modèles et les modèles de modèles que constituent nos formulations mathématiques aussi sophistiquées soient-elles, ne sont que des moyens d'appréhender une réalité complexe par une approche qui ne peut être que réductionniste.

Cette première étude nous a cependant poussé à nous poser de nouvelles questions, et sans doute, à travers elle, de définir une approche du système différente et à une autre échelle : parmi toutes celles qui peuvent nous venir à l'esprit, une question a retenu notre attention : d'autres méthodes pouvaient-elles nous permettre de confirmer les résultats de nos études cinétiques et éventuellement, de répondre à la question posée et à laquelle nous n'avions trouvé que quelques éléments de réponse, j'entends le rôle des souches dans la communauté? Le manque de données sur le métabolisme du 2,4-D chez les souches de la communauté étudiée ne nous avait pas permis d'interpréter certains résultats, en particulier de confirmer la présence d'une activité de dégradation du cycle chez les souches A, B et D. *A. paradoxus* TV1 (souche C) semblait capable de dégrader l'ensemble de la molécule de 2,4-D. Disposait elle

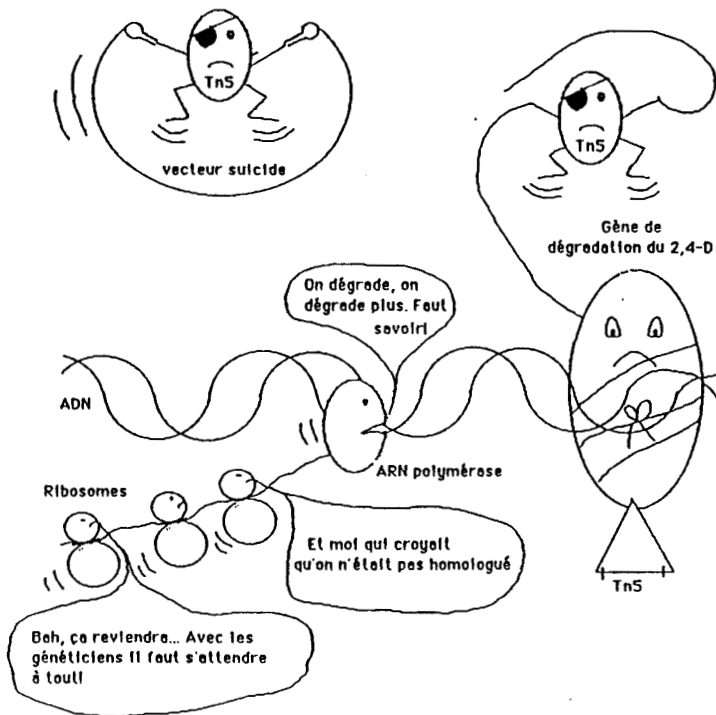
de l'éventail des gènes nécessaires? Qu'en était-il des autres souches de la communauté? La capacité des souches A, B et D à dégrader la chaîne latérale de la molécule de 2,4-D était-elle propre à ces souches où provenait-elle d'un transfert d'information génétique en provenance de la souche C auquel cas il était plus aisé d'expliquer une présence fortuite de cette capacité chez ces souches quel que soit, par ailleurs, leur rôle.

Une autre question nous a également semblé importante : la souche C d'*A. paradoxus* responsable sans doute de l'essentiel de la dégradation du 2,4-D dans le chémostat était-elle apparue dans la communauté à la suite d'échanges d'information génétique successifs ou préexistait-elle en faible nombre au sein de la communauté initiale du chémostat et n'avait simplement pas pu être mise en évidence faute de moyens techniques adéquats?

Les méthodes dont nous disposions au début de cette étude, les mesures que nous avons réalisées, ne nous permettait pas de répondre à la question. Les milieux gélosés que l'on pourrait qualifier de trop sélectifs (ne contenant que du 2,4-D comme seule source de carbone) ne nous avaient pas permis de sélectionner des micro-organismes capables de croître sur une seule et unique substance carbonée. Des milieux "discriminants" tels que le milieu de Loos ne pouvaient pas en pratique nous permettre de repérer un micro-organisme dégradant si son niveau de population était 1000 fois inférieur à celui de la population totale ce qui est le cas en général dans les sols. Si l'on voulait comprendre la séquence d'événements qui nous a conduit à sélectionner, au sein de la communauté établie dans le chémostat, notre souche d'*A. paradoxus*, si l'on souhaitait réitérer cette expérience avec d'autres sols ou dans d'autres conditions expérimentales, il nous était nécessaire de mettre au point une technique plus fiable de mise en évidence des micro-organismes dégradant le 2,4-D. Ainsi apparaissait une nécessité de mise au point méthodologique.

DEUXIEME PARTIE

Caractérisation génétique d'une souche d'*Alcaligenes paradoxus* dégradant l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique. Localisation des gènes impliqués dans la dégradation du pesticide.



I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

MISE EN EVIDENCE DU ROLE DES PLASMIDES DANS LA DEGRADATION DES COMPOSES XENOBIOTIQUES

1-ASPECTS HISTORIQUES

1.1 Introduction

En 1960, Audus signale le caractère non permanent de la capacité dégradante d'une bactérie à l'égard de composés xénobiotiques dès lors que celle-ci est cultivée un certain temps en l'absence de tels composés. Il remarque en effet que des bactéries maintenues en culture pure, normalement capables de dégrader des herbicides phénoxyacétiques, perdent leur capacité de détoxification à l'égard de ces molécules lorsque celles-ci ne leur sont plus fournies. L'explication de cette perte du pouvoir dégradant a nécessité de nombreuses années de recherche. Elle a demandé le transfert de connaissances de la recherche médicale vers la microbiologie des sols, l'adaptation de techniques disponibles pour l'étude des entérobactéries à celles de bactéries du sol, la mise au point de méthodes originales....

En 1972, pour expliquer le phénomène d'adaptation des sols à l'égard de certains composés phytosanitaires, Waid suggère l'existence d'éléments génétiques transférables, capables de se disperser au sein des populations microbiennes naturelles, et d'y disséminer la capacité à dégrader un produit xénobiotique nouveau, initialement possédée par un nombre restreint de micro-organismes. Signalons qu'à ce moment, les plasmides sont déjà connus chez les entérobactéries en tant qu'éléments transmissibles entre bactéries d'une même espèce, mais également entre bactéries d'espèces différentes (plasmides à large spectre d'hôte). Waid connaît leur existence puisqu'il cite les travaux de Watanabe (1963) et d'Anderson (1966) s'intéressant à la transmissibilité de facteurs de résistance chez les entérobactéries. L'existence de véritables opérons comportant un ensemble de gènes de résistance aux antibiotiques les plus couramment utilisés dans le traitement de maladies telles que la dysenterie ou les gastro-entérites est connue depuis les années 1950 et leur apparition a été signalée chez un nombre croissant d'espèces différentes d'entérobactéries (Stanier *et al.*, 1985).

Chez les non-entérobactéries la présence d'un facteur plasmidique est évoquée dès 1967 par Higashi qui remarque que la capacité à noduler le trèfle est

plasmides	voie de dégradation	transmissibilité *	taille (kbases)	références
CAM	camphre	+	>100	Chakrabarty (1976)
OCT	<i>n</i> -octane	-	>100	Fennewald <i>et al.</i> (1978)
SAL	salicylate	+	55, 48, 42	Farrel <i>et al.</i> (1978), Heinaru <i>et al.</i> (1978), Mylroie <i>et al.</i> (1977)
NAH	naphtalène	+	46	Farrel <i>et al.</i> (1978), Heinaru <i>et al.</i> (1978)
TOL	xylène/toluène	+	76	Mylroie <i>et al.</i> (1977), Heinaru <i>et al.</i> (1978)
XYL-K	xylène/toluène	+	90	Mylroie <i>et al.</i> (1977)
pAC21	<i>p</i> -chlorobiphényl	+	65	Kamp et Chakrabarty (1979)

* + : plasmide transmissible - : plasmide non transmissible

Figure 2.1 : Propriétés de quelques plasmides de dégradation (d'après Farrel et Chakrabarty, 1979)

transférable d'une souche de *Rhizobium trifolii* vers une souche de *Rhizobium phaseoli*. Alors pourquoi de telles structures ne seraient-elles pas observables chez d'autres bactéries du sol et ne seraient-elles pas, au moins en partie, responsables de l'adaptation des micro-organismes du sol aux produits phytosanitaires (Audus, 1960)? C'est là une des idées fondamentales émises par Waid en 1972. Mais les techniques d'extraction proprement dites, mises au point pour l'étude des plasmides d'*E. coli*, ne permettent pas alors d'extraire les plasmides de bactéries isolées du sol.

1.2 Mise en évidence des premiers plasmides de dégradation

Les premiers plasmides de non-entérobactéries mis en évidence sont ceux impliqués dans la dégradation de composés aromatiques. La preuve de leur existence est faite à l'aide de conjugaisons, c'est à dire du transfert d'une propriété dégradante d'une souche (en l'occurrence la capacité à dégrader tel ou tel substrat aromatique) vers une autre souche dépourvue de cette voie métabolique. Comme preuve additionnelle, on montre alors que la souche "guérie" de son plasmide à la suite d'un traitement avec un agent mutagène perd également sa capacité dégradante (la mutagénèse transpositionnelle n'est alors pas connue). C'est la mytomyicine C qui est la plus fréquemment employée (Chakrabarty, 1972; Williams et Murray, 1974), parce que plus active que les autres agents mutagènes alors disponibles tels que l'acridine orange, l'acriflavine, le sodium dodécyl sulfate ou les rayonnements ultra-violetts (Chakrabarty, 1972). Dans certains cas, des mutants spontanés non dégradants sont sélectionnés directement sur des milieux non sélectifs (Williams et Worsey, 1976). D'autre part, la souche guérie, marquée par une résistance à un antibiotique, une auxotrophie ou par la perte d'un caractère particulier tel que la fluorescence (Williams et Worsey, 1976), est réutilisée comme souche receveuse. La restauration de l'activité dégradante est une preuve supplémentaire de l'implication d'un plasmide comme support des gènes impliqués. Ainsi paraissent de nombreux travaux qui mettent en évidence le rôle de plasmides dans la dégradation de composés aromatiques naturels tels que les salicylates (SAL) (Chakrabarty, 1972), le camphre (CAM) (Rheinwald *et al.*, 1973), le naphthalène (NAH) (Dunn et Gunsalus, 1973), les benzoates (Williams et Murray, 1974), et le toluène (TOL) (Worsey et Williams, 1975) (figure 2.1). Le retrotransfert n'est pas applicable aux plasmides non conjugatifs qui nécessitent pour leur transfert la présence d'un autre plasmide capable de les mobiliser

(plasmide "helper") (Friello *et al.*, 1976). Aucun exemple de plasmide non conjugatif non mobilisable n'est alors donné.

1.3 Vers la mise au point de techniques d'isolement plasmidique applicables aux bactéries du sol

En 1973, conscients des limites des méthodes génétiques de mise en évidence des plasmides, Pemberton et Clarck cherchent à caractériser physiquement un plasmide de *Pseudomonas aeruginosa* et adaptent à l'étude de cette souche une méthode d'extraction plasmidique jusque là réservée aux entérobactéries. S'appuyant sur la différence de pouvoir intercalant du bromure d'éthidium entre les brins complémentaires d'ADN selon que celui-ci est présent ou non sous forme superenroulée, ils utilisent la différence de densité entre les deux types d'ADN en présence du bromure d'éthidium pour les séparer par centrifugation sur gradient de chlorure de césium. Cherchant à extraire des facteurs sexuels chez *P. aeruginosa*, ils réussissent également à isoler des plasmides cryptiques.

La même année, la parution des travaux de Guerry *et al.* (1973) met à la disposition des microbiologistes du sol une méthode qui présente plusieurs différences avec celles utilisées jusqu'alors pour isoler les plasmides des souches d'*E. coli*. Ces auteurs remarquent que l'ADN plasmidique est entraîné avec l'ADN chromosomique en présence du Brij[®]58, traditionnellement utilisé pour la lyse des cellules d'*E. coli*, (Humphreys *et al.*, 1975), lorsque celui-ci est utilisé pour la précipitation des composés cellulaires. Ce produit entraîne en effet la précipitation des molécules d'ADN qui sont alors attachées à la membrane (Guerry *et al.*, 1973; Morris *et al.*, 1973). Ce phénomène peut expliquer l'impossibilité d'extraire les grands plasmides tels que les plasmides de dégradation à l'aide de cette méthode. Plus longs à se répliquer, ils ne se trouvent pas de façon prépondérante sous forme superenroulée dans la cellule et semblent plutôt se comporter comme le chromosome bactérien et présenter un site de liaison au niveau du complexe membranaire (Palchaudhuri et Chakrabarty, 1976). La particularité de la technique d'extraction plasmidique proposée réside dans l'étape de précipitation des composés membranaires : l'utilisation du chlorure de sodium en forte concentration (5 M) en présence du lauryl sulfate utilisé pour la lyse bactérienne provoque la précipitation de l'ADN chromosomique en même temps que la précipitation des protéines. Au contraire, l'ADN plasmidique superenroulé reste en solution de même que l'ADN

plasmidique non circulaire présent de façon intermédiaire au moment de la réplication du plasmide et qui peut, chez certaines espèces, présenter un site d'attache à la membrane cellulaire. L'ADN plasmidique semble se détacher de la membrane en présence de fortes concentrations en sels. Guerry *et al.* (1973) utilisent alors les propriétés de sédimentation différentielles sur gradient de saccharose pour séparer l'ADN plasmidique de l'ADN chromosomique restant. Des entérobactéries autres qu'*E. coli* (*Proteus*, *Salmonella*, *Neisseria gonorrhoeae*. . .) sont testées par les auteurs et donnent des résultats concluants.

Cette méthode est alors reprise par Fisher *et al.* (1978) qui tentent l'extraction de plasmides à partir de bactéries capables de dégrader l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique.

1.4 Des plasmides sont également impliqués dans la dégradation des composés xénobiotiques

La rapide dégradation du 2,4-D dans les sols font alors de cet herbicide organo-chloré l'un des plus employés. D'après Pemberton et Fisher (1977) (la consommation mondiale en 1974 était de 27.10⁶ kg). Etudiant la biodégradabilité du 2,4-D, ces auteurs remarquent le caractère instable de la capacité dégradante de plusieurs isolats bactériens capables de métaboliser le pesticide et, s'appuyant sur les acquis des études jusqu'alors réalisées sur les composés aliphatiques et aromatiques naturels, cherchent à démontrer l'intervention d'un plasmide dans la dégradation du 2,4-D. Ainsi, différentes souches dégradant le 2,4-D sont isolées par ces auteurs (Pemberton et Fisher, 1977; Pemberton *et al.*, 1979). Parmi elles, JMP116, initialement identifiée comme étant un *Pseudomonas*, retient leur attention pour sa stabilité à dégrader cet herbicide, même après plusieurs repiquages successifs sur des milieux sans 2,4-D (Pemberton et Fisher, 1977). Ces auteurs utilisent alors les propriétés caractéristiques des gènes plasmidiques que sont la ségrégation et la guérison du caractère dégradant chez cette souche pour démontrer l'implication d'un plasmide dans la dégradation du 2,4-D. L'année suivante, le plasmide responsable est isolé de JMP116, reconnu alors comme étant un *Alcaligenes paradoxus* (Fisher *et al.*, 1978). La méthode d'extraction utilisée dérive de celle proposée en 1973 par Guerry *et al.* et diffère de cette dernière au niveau de l'étape de purification de l'ADN plasmidique. L'étape finale de centrifugation sur gradient de saccharose n'est pas utilisée par les auteurs. La fraction protéique restante après précipitation au chlorure de sodium 5M est extraite au phénol saturé en eau. En ce sens, la méthode de Fisher *et al.* (1978) se

rapproche d'une mini-préparation d'ADN plasmidique. La concentration de l'ADN plasmidique se fait par dialyse. On note également que le lauryl sulfate utilisé par Guerry *et al.* (1973) pour la lyse cellulaire après fragilisation des membranes au lysozyme est remplacé par un autre détergent, le sodium dodécyl sulfate (SDS).

En 1976, Palchaudry et Chakrabarty proposent une méthode pour l'extraction des plasmides de dégradation CAM et SAL impliqués respectivement dans la dégradation du camphre et des salicylates. Elle présente quelques particularités intéressantes : la méthode de lyse décrite utilise le sarcosyl après fragilisation des membranes au lysozyme. Aucune précipitation préalable des protéines n'est réalisée afin d'éviter l'entraînement de l'ADN plasmidique attaché au niveau des membranes cellulaires. La propriété de fixation de l'ADN à la nitrocellulose est utilisée pour la purification de celui-ci avant centrifugation. Mais cette méthode, qui permet aux auteurs d'isoler des plasmides impliqués dans la dégradation de composés aromatiques naturels, ne semble pas avoir été retenue pour la purification des plasmides codant pour la dégradation des composés xénobiotiques.

En 1978, Hansen et Olsen publient une méthode destinée à l'extraction de gros plasmides. Là encore, les méthodes disponibles de précipitation des composés membranaires s'avèrent inopérantes. Elles ne permettent d'isoler que des plasmides dont la taille n'excède pas la centaine de kilobases. La méthode proposée est en fait une synthèse des méthodes de Guerry *et al.* (1973), de Humphreys *et al.* (1975), et de Currier et Nester (1976). Elle reprend en particulier l'étape de précipitation des composés membranaires au chlorure de sodium proposée par Guerry *et al.* (1973). Elle permet la purification de l'ADN de plasmides de grande taille (jusqu'à 300 kb d'après les auteurs) à partir de nombreuses espèces bactériennes, dont les *Pseudomonas*, sans passer par une phase de concentration sur gradient de chlorure de césium. Dès sa parution cette méthode sert de référence pour l'isolement de plasmides de grande taille à partir des bactéries du sol. L'adjonction d'une étape de centrifugation sur gradient de chlorure de césium en fin de préparation permet d'obtenir des quantités importantes d'ADN plasmidique purifié.

Ainsi, Don et Pemberton (1981) parviennent à isoler six plasmides impliqués dans la dégradation du 2,4-D à partir de souches d'*Alcaligenes eutrophus* possédant la propriété de dégrader ce pesticide. Parmi les plasmides isolés, pJP3, pJP4, et pJP7 semblent être trois exemplaires d'un même plasmide. Leur taille est identique, 51 mégadaltons (80 kilobases). En plus des gènes de dégradation du 2,4-D, ces plasmides portent tous des gènes codant pour la

Espèce	Souche	Plasmide	Groupe d'incompatibilité	Taille (Md)
<i>A. paradoxus</i>	JMP116(a,b)	pJP1	P1	37 (a)
<i>A. eutrophus</i>	JMP130(b,c)	pJP2	P3(e)	36,9(e)
<i>A. eutrophus</i>	JMP133(b,c)	pJP3	P1	52,1(c)
<i>A. eutrophus</i>	JMP134(b,c)	pJP4	P1	52,1(e)
<i>A. eutrophus</i>	JMP135(b,c)	pJP5	P1	? (poids moléculaire élevé) ^(b) ; 52,1(e)
?	JMP141(b)	pJP6	?	? (poids moléculaire élevé) ^(b)
<i>A. eutrophus</i>	JMP142(c)	pJP7	P1	52,1(a)
<i>A. eutrophus</i>	JMP144(c)	pJP9	P3(e)	36,9(c)
<i>Alcaligenes</i> sp.	EML 159 ^(f)	pEML159	?	56
<i>Flavobacterium</i> sp.	50001 ^(g)	pRC10	?	45 kb (30 Md)

Figure 2.2 : Principales propriétés des plasmides pJP isolés de bactéries du genre *Alcaligenes* dégradant le 2,4-D (d'après Soulas, 1990).

- (a) Fisher et al. (1978)
- (b) Pemberton et al. (1979)
- (c) Don et Pemberton (1981)
- (e) Ghosal et al. (1985)
- (f) Amy et al. (1985)
- (g) Chaudry et Huang (1988)

résistance à l'acétate phénylmercurique et au mercure et pour la dégradation du méta-chlorobenzoate. Leur profil de restriction à l'égard de l'endonucléase de restriction *EcoRI* est identique. Ces plasmides sont conjugatifs, à large spectre d'hôte, et appartiennent au groupe d'incompatibilité incP1. Ces propriétés leur confèrent des potentialités de transfert entre micro-organismes du sol d'espèces différentes et donc de dissémination au sein des populations naturelles. Le transfert de ces plasmides est mis en évidence depuis les souches d'origine vers des espèces aussi différentes que *E. coli*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium sp.*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, et *Acinetobacter calcoaceticus*.

Le plasmide pJP5 possède également toutes ces propriétés mais son profil de restriction diffère légèrement de celui des plasmides pJP3, pJP4 et pJP7. Sa taille est plus importante et il est intéressant de remarquer qu'il n'est obtenu qu'après centrifugation sur chlorure de césium (Don et Pemberton, 1981), les tentatives d'isolement préalables par la méthode d'extraction seule de Hansen et Olsen, (1978) et celle de Guerry *et al.* (1973) ayant échoué (Pemberton *et al.*, 1979).

Les plasmides pJP1 et pJP2 présentent, quant à eux, une taille de 37 mégadaltons et n'appartiennent pas au même groupe d'incompatibilité plasmidique. Ces deux plasmides possèdent également un même profil de restriction et sont par conséquent indistinguables. (Figure 2.2).

L'implication de plasmides est également mise en évidence dans la dégradation de nombreux autres pesticides. Un plasmide de 65 mégadaltons, pAC21 portant des gènes codant pour la dégradation des p-chlorobiphényles a été décrit par Kamp et Chakrabarty (1979). Plus récemment, il a également été rapporté qu'un autre herbicide organo-chloré, la Pyramine ou pyrazone (5-amino, 4-chloro, 2-phényl, 3-pyridazinone) était dégradée par des souches bactériennes comportant entre deux et six plasmides (Kreis *et al.*, 1981 d'après Slater et Bull, 1982). Ces auteurs ont montré que la perte de l'activité dioxygénasique responsable d'une des étapes de la dégradation de cet herbicide était corrélée à la perte de l'un des plasmides. D'autres travaux ont démontré l'implication de plasmides dans la dégradation de composés halogénés qu'ils soient organochlorés tels que l'acide 2-monochloropropionique (Slater et Bull, 1982), ou organofluorés tels que le MFA (acide monofluoro acétique). Une souche de *Moraxella sp.* portant un plasmide pUO1 de 43,7 mégadaltons impliqué dans la dégradation de ce dernier composé a été isolée par Kawasaki *et al.* (1981a,b). Van der Meer *et al.* (1991 a et b) ont montré que les gènes impliqués dans le métabolisme des 1,2-dichlorobenzène, 1,4-dichlorobenzène et 1,2,4-

trichlorobenzène étaient portés par un plasmide chez *Pseudomonas* sp. P51. Ainsi, la localisation sur des plasmides des gènes impliqués dans la dégradation des pesticides semble couramment répandue.

1.5 Transferts et expression des gènes plasmidiques

Ainsi, la mise au point de techniques d'extraction applicables à l'isolement des plasmides de dégradation a permis un pas en avant dans l'étude de la biodégradation des pesticides. Ces résultats confirment la plupart du temps l'implication de plasmides transmissibles, à large spectre d'hôte, dans les phénomènes de biodégradation. Ils conduisent ainsi à une autre nouvelle interprétation possible du phénomène d'adaptation des sols aux traitements par des produits phytosanitaires. L'augmentation du taux de biodégradation du 24D au cours de traitements successifs d'un sol pourrait ne pas être exclusivement due à la survie dans ces sols d'une population dégradante qui se serait multipliée en présence du pesticide, et qui se maintiendrait, en l'absence de celui-ci, éventuellement en dégradant des analogues structuraux naturels. La prolifération de réplicons porteurs de gènes de dégradation au sein des populations naturelles pourrait être en partie responsable du phénomène observé d'adaptation des sols. Mais il reste à confirmer par des résultats expérimentaux l'hypothèse de Fisher *et al.*, (1978) suggérant l'existence d'une relation entre le maintien de l'activité dégradante et son support génétique, le plasmide. C'est au laboratoire, en condition standard de culture et entre des souches pures que l'on a commencé à évaluer les fréquences de transfert de plasmides codant pour la dégradation des pesticides. De nombreuses données ont été acquises avec pJP4 choisi par plusieurs auteurs en tant que modèle pour l'étude des transferts intra et interspécifiques.

Ainsi, les résultats de Pemberton *et al.* (1979) confirment, *in vitro*, l'existence de transfert de gènes plasmidiques codant pour la dégradation de composés xénobiotiques entre des souches d'une même espèce. La bactérie donneuse utilisée est une souche d'*Alcaligenes eutrophus* JMP134 dégradant le 24D et la bactérie receveuse est cette même souche guérie de son plasmide, non dégradante et rendue résistante à la streptomycine (JMP222). Une fréquence élevée, de l'ordre de $5 \cdot 10^{-2}$ transconjugants capables de dégrader le 2,4-D par cellule donneuse est alors observée. L'expérience est répétée avec d'autres souches dégradantes appartenant à l'espèce *A. eutrophus* selon le même principe (transferts isogéniques vers la souche guérie et rendue résistante à l'acide nalidixique ou la streptomycine). Des taux de transfert intraspécifiques de 10^{-2} à

Souche donneuse	Fréquence de transfert par souche donneuse						
	<i>P. putida</i>	<i>A. calco-aceticus</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>E. coli</i>	<i>R. sphaeroides</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>P. fluorescens</i>
JMP222(pJP3)	5.10 ⁻² [4.10 ⁻⁵]	2.10 ⁻³ [2.10 ⁻¹]	8.10 ⁻² [4.10 ⁻¹]	4.10 ⁻⁴ [3.10 ⁻¹]	1.10 ⁻⁷ [5.10 ⁻¹]	8.10 ⁻⁶ [3.10 ⁻¹]	7.10 ⁻⁴ [3.10 ⁻¹]
JMP222(pJP4)	2.10 ⁻² [1.10 ⁻⁵]	1.10 ⁻³ [4.10 ⁻²]	2.10 ⁻² [2.10 ⁻¹]	4.10 ⁻⁴ [4.10 ⁻¹]	5.10 ⁻⁶ [4.10 ⁻¹]	1.10 ⁻⁶ [3.10 ⁻¹]	7.10 ⁻⁴ [3.10 ⁻¹]
JMP222(pJP5)	1.10 ⁻² [9.10 ⁻⁶]	2.10 ⁻³ [2.10 ⁻¹]	2.10 ⁻² [6.10 ⁻¹]	3.10 ⁻⁴ [2.10 ⁻¹]	7.10 ⁻⁶ [2.10 ⁻¹]	2.10 ⁻⁶ [7.10 ⁻¹]	6.10 ⁻³ [9.10 ⁻²]
JMP222(pJP7)	2.10 ⁻² [3.10 ⁻⁵]	1.10 ⁻³ [4.10 ⁻¹]	4.10 ⁻² [3.10 ⁻¹]	1.10 ⁻⁴ [7.10 ⁻¹]	1.10 ⁻⁷ [3.10 ⁻¹]	2.10 ⁻⁶ [4.10 ⁻¹]	3.10 ⁻³ [5.10 ⁻¹]

[] fréquence de rétrotransfert vers la souche donneuse

Figure 2.3 : Fréquence de transfert interspécifique des plasmides pJP3, pJP4, pJP5 et pJP7 (d'après Don et Pemberton, 1981).

10^{-3} transconjugants par cellule donneuse sont obtenus, confirmant les résultats obtenus lors des premiers essais (Pemberton *et al.*, 1979).

D'autres travaux démontrent également l'existence *in vitro* de transferts interspécifiques de plasmides portant des gènes de dégradation. Ainsi, Friedrich *et al.* (1983) tentent d'évaluer les taux de transfert de gènes plasmidiques entre une souche d'*E. coli* JMP397 ayant reçu le plasmide pJP4 d'*A. eutrophus* JMP134 et différentes autres souches d'*A. eutrophus* lithotrophes non dégradantes provenant de collections ainsi qu'une souche non dégradante de *Pseudomonas oxalaticus*. Les fréquences de transfert observées s'échelonnent de 10^{-6} à 10^{-2} transconjugants par donneur. On remarque que les transconjugants appartenant à l'espèce *A. eutrophus* et *P. oxalaticus* expriment tous la résistance au mercure et la capacité à dégrader le 2,4-D. Cependant, tous n'expriment pas la capacité à dégrader le 3-chlorobenzoate et peu sont capables de pousser sur dalapon et sur MCPA (acide 2-méthyl, 4-chloro phénoxyacétique) lorsque ceux-ci représentent la seule source de carbone disponible (Friedrich *et al.*, 1983). Or ces facultés sont exprimées chez la souche mère *A. eutrophus* JMP134 alors qu'elles sont codées par son plasmide pJP4 (Don et Pemberton, 1981). De même, le transfert des plasmides pJP3, 4 et 7 vers des souches d'*E. coli*, *R. sphaeroides*, *A. tumefaciens*, *Rhizobium* sp., *P. putida*, *P. fluorescens*, et *A. calcoaceticus* ne s'accompagne de l'expression du caractère dégradant que chez *Pseudomonas* et *Alcaligenes* (Don et Pemberton, 1981) (figure 2.3). Cherchant à expliquer ces résultats, Friedrich *et al.* (1983) observent des remaniements au niveau de la structure du plasmide pJP4 lorsque celui-ci est transféré à différentes souches d'*A. eutrophus*. Ainsi ils remarquent que chez certaines souches receveuses, la taille du plasmide peut être réduite suite à des délétions, ou au contraire augmentée suite à la formation de multimères.

Mais, malgré des protocoles de conjugaison formulés de façon à augmenter la probabilité de contact et la formation de *pili* entre souches donneuses et souches receveuses, les fréquences de transferts hétérospécifiques observées restent relativement faibles. Il reste donc à évaluer les fréquences de tels phénomènes dans les sols.

Ces premières conclusions encouragent donc la poursuite de travaux à l'échelle des populations naturelles et la recherche de transferts d'informations génétiques par voie plasmidique au sein de populations microbiennes dégradantes. Compte tenu de la complexité de l'environnement naturel, le sol, au sein duquel peuvent s'établir et évoluer les communautés microbiennes dégradant les xénobiotiques, des systèmes modèles ont été développés pour de telles études.

1.6 Tentatives de mise en évidence des transferts d'information génétique en culture continue

Derrière ces préoccupations existe depuis le début une question importante : comprendre le phénomène d'adaptation. Comment la microflore d'un sol s'adapte-t-elle à un produit phytosanitaire, comment un micro-organisme acquiert-il la capacité à dégrader un pesticide, en d'autres termes, quelles sont les origines des gènes de dégradation ? Dès 1979, Farrel et Chakrabarty s'appuyant encore sur les résultats de la recherche médicale, proposent l'explication suivante. Les différents gènes nécessaires à l'acquisition par un micro-organisme d'une voie métabolique nouvelle apparaîtraient séparément chez des micro-organismes isolés, à la suite d'une mutation ponctuelle qui pourrait être sélectionnée dans le cas où elle apporte au micro-organisme en question des avantages nutritifs. La capacité dégradante serait donc initialement le fait d'une association de micro-organismes dont les différents membres réunis seraient capables de réaliser la dégradation d'un xénobiotique. La formation d'opérons de dégradation se ferait donc au hasard de conjugaisons et de recombinaisons de l'information génétique. L'idée est également reprise par Bull (1980). Plusieurs équipes ont cherché à vérifier cette hypothèse.

Pour cela, il était nécessaire de développer des systèmes modèles qui, tout en restant simples afin de permettre une interprétation aisée des résultats, devaient peu à peu permettre d'extrapoler les résultats obtenus aux conditions naturelles. La première étape a donc consisté à cultiver sur une même source carbonée, le pesticide, un ensemble de souches capables de le dégrader et à observer d'éventuelles évolutions au niveau de ces souches. Les dispositifs de culture continue ont été utilisés pour de telles études.

Senior *et al.* (1976) les premiers, s'intéressent à une communauté microbienne de sept espèces de micro-organismes dégradant le dalapon (acide 2,2-dichloropropionique). Ses membres se répartissent en utilisateurs primaires (souches dégradant le dalapon) et utilisateurs secondaires (souches subsistant aux dépens d'excrétats ou de produits de lyse des utilisateurs primaires). Ces auteurs remarquent après 2900 heures de culture continue, l'apparition, au sein de la communauté, d'un mutant de l'un des utilisateurs secondaires (un *Pseudomonas* sp.) ayant acquis la capacité à dégrader le dalapon. Ils cherchent alors à vérifier laquelle des deux hypothèses, le transfert de gènes entre les souches composant la communauté microbienne ou l'apparition d'un mutant

spontané capable de dégrader le dalapon est à l'origine du phénomène observé. Pour cela, les auteurs inoculent un chémostat alimenté par un mélange de dalapon et de propionate à l'aide de la souche de *Pseudomonas* initiale seule et mettent en évidence l'apparition de mutants capables de dégrader le dalapon. Ils concluent donc en faveur de la mutation spontanée.

Les travaux menés par l'équipe de Chakrabarty peuvent être considérés comme une autre tentative de mise en évidence de transferts de gènes au sein d'une communauté microbienne. Ainsi, Kellog *et al.* (1981) cherchant à obtenir une souche microbienne dégradant le 2,4,5-T proposent une nouvelle technique de sélection microbienne sous le nom de "Plasmid-assisted molecular breeding" (formation d'hybride moléculaire par transfert de plasmide). Ces auteurs partent de l'hypothèse que, dans la nature, l'évolution des plasmides se fait par annexion de gènes issus de plasmides différents de façon à ce que, sous une pression de sélection donnée exercée par des substrats nouveaux, des capacités métaboliques nouvelles soient acquises. Il doit donc être possible, au laboratoire, en appliquant de fortes pressions de sélection, d'obtenir le phénotype recherché chez une souche microbienne unique à partir d'un mélange de souches présentant, de façon séparée, les capacités métaboliques requises pour les différentes étapes de la dégradation d'un nouveau substrat. Ainsi inoculent-ils un chémostat avec différents isolats bactériens provenant d'eaux résiduaires auxquels ils ajoutent des bactéries porteuses des plasmides CAM, TOL, SAL ainsi qu'une souche de *Pseudomonas* porteuse du plasmide pAC25 codant pour la dégradation du 3-chlorobenzoate. L'alimentation du chémostat en continu à l'aide d'un milieu ne contenant que du 2,4,5-T comme source de carbone pendant 10 mois leur permet d'obtenir une augmentation de la vitesse de croissance de la communauté maintenue dans le chémostat. Par ailleurs la communauté microbienne s'avère capable de dégrader des concentrations croissantes d'herbicide (jusqu'à 2 mg l⁻¹) alors que le nombre des souches diminue. Cependant, cette expérience n'a pas permis d'obtenir une souche unique dégradant le 2,4,5-T ni de mettre en évidence un quelconque transfert d'information génétique entre les souches.

Slater et Bull (1982) étudient une communauté de micro-organismes capables de dégrader le 2-chloropropionamide (2-CPA). Cette communauté est composée d'un *Mycoplana* sp. dégradant le 2-CPA en 2-monochloropropionate (2-MCPA) qui est à son tour utilisé par trois micro-organismes en situation de compétition, un *Pseudomonas* sp., un *Pseudomonas maltophilia* et un *A. calcoaceticus*. Ils observent qu'après co-culture, le *Pseudomonas* sp. acquiert la capacité de croître aussi bien sur 2-CPA que sur 2-MCPA, utilisant le premier substrat comme source de carbone, d'énergie mais aussi d'azote. Ceci se traduit au niveau

biochimique par l'acquisition d'une activité amidasique. Aussi Slater et Bull (1982) suggèrent que le gène codant pour l'amidase a pu être transféré depuis la souche de *Mycoplana* vers celle de *Pseudomonas* sp. Cependant aucune étude d'homologie entre les gènes des deux espèces n'est alors réalisée et les auteurs n'excluent pas l'éventualité d'une mutation qui conférerait à *Pseudomonas* sp. la nouvelle activité enzymatique et de ce fait, la capacité à dégrader, seul, l'acide 2-chlorophénoxyacétique.

Ces mêmes auteurs étudient en culture continue la croissance sur acide 2-monochlorobutanoïque (2-MCBA) d'une communauté de deux micro-organismes, une souche de *P. putida* PP3 munie d'un plasmide conjugatif R68.45 et une souche indéterminée HB2001. Après avoir établi la voie métabolique de ce substrat au sein de cette communauté, ces auteurs attribuent à *P. putida* PP3, la première étape de la dégradation du 2-MCBA, la déshalogénation en acide 2-hydroxybutanoïque. La souche HB2001 est initialement responsable de la dégradation ultérieure de ce dernier composé. Ces auteurs rapportent qu'après 30 générations en chémostat, la souche HB2001 acquiert l'aptitude à dégrader le 2-MCBA, caractère dont elle était initialement dépourvue et surtout que l'équilibre a complètement été déplacé dans le chémostat en faveur de ce mutant, les souches HB2001 dépourvues de cette capacité métabolique ayant été exclues du chémostat. Ces auteurs remarquent que cette sélection n'affecte pas la présence au sein de la communauté, de *P. putida* PP3 avec qui la nouvelle souche entre pourtant en compétition vis à vis du 2-MCBA. Réitérant l'expérience en présence d'une souche de *P. putida* PP3 dépourvue de plasmide, Slater et Bull (1982) constatent l'impossibilité de parvenir au même résultat. Comme le remarquent les auteurs, il est fortement improbable qu'une mutation spontanée ait été responsable de la succession des événements observés dans la première expérience. Ils considèrent l'apparition du nouveau phénotype de HB2001 comme la conséquence d'un transfert plasmidique entre les deux espèces bactériennes du chémostat, d'autant plus que Slater et Bull (1982) remarquent que les gènes codant pour la déshalogénase sont, chez *P. putida* PP3, portés par un élément transposable. Le rôle de R68.45 serait celui d'un vecteur permettant le passage de ce transposon depuis *P. putida* vers HB2001. En l'absence de plasmide conjugatif, le saut direct du transposon entre les deux souches est impossible. Si ces résultats ne permettent pas d'évaluer l'ordre de grandeur des fréquences de transfert plasmidique entre des souches cultivées en chémostat, ils laissent cependant envisager l'importance des vecteurs à large spectre d'hôte mais également celle des éléments transposables dans l'évolution des gènes de dégradation.

Enfin, Focht (1988) étudie dans un système de multi-chémostat, une communauté formée d'une souche de *P. putida* et d'une souche de *P. alcaligenes* possédant des voies métaboliques complémentaires à l'égard du chlorobenzène mais incapable de métaboliser cette molécule lorsqu'elles sont cultivées séparément. Cet auteur remarque au bout d'une semaine de co-culture, l'apparition d'une souche possédant l'intégralité des gènes cataboliques et attribue le phénomène à un transfert plasmidique. L'ensemble de ces exemples laisse donc supposer l'existence de transfert d'information génétique *in vivo*.

2- CONSIDÉRATIONS EVOLUTIONISTES SUR L'ORIGINE ET LE DEVENIR DES GENES DE DEGRADATION

La présence de gènes de dégradation sur des plasmides à large spectre d'hôte apporte, par le biais de nouvelles possibilités métaboliques, un avantage évolutif et sélectif évident aux souches et populations microbiennes au sein desquelles ces plasmides sont présents. De tels plasmides peuvent être les vecteurs de capacités d'adaptation de communautés ou de souches microbiennes face à des modifications des sources carbonées pouvant apparaître dans l'environnement. Au hasard des conjugaisons, le rassemblement des capacités dégradantes de chaque souche peut conduire l'une d'entre-elles à métaboliser des substrats nouveaux. Ainsi, des capacités métaboliques nouvelles peuvent-elles apparaître et se fixer au sein des populations naturelles suite à la sélection de gènes complémentaires et à l'avantage qu'ils apportent aux souches qui en héritent. De tels phénomènes ont déjà été observés à l'échelle expérimentale. Ainsi, le rassemblement de deux plasmides, pKF1 et pAC27, dans une même souche microbienne conduit celle-ci à dégrader complètement les mono- et dichlorobiphényles alors que la présence d'un seul plasmide s'avère insuffisante (Chakrabarty *et al.*, 1983). Ces événements doivent obéir à certaines règles qu'imposent, entre autres, les relations d'incompatibilité entre plasmides. En effet, deux unités extrachromosomiques ne peuvent se maintenir ensemble au sein d'une même cellule bactérienne si elles appartiennent au même groupe d'incompatibilité (Novick, 1987). Mais là encore, des processus d'adaptation se sont mis en place pour permettre le "recrutement" de gènes portés par des plasmides incompatibles. Ainsi, les travaux de Chakrabarty *et al.* (1983) décrivent des réarrangements génétiques au niveau d'un plasmide portant les gènes de dégradation du 3,5-dichlorobenzoate s'accompagnant de l'intégration des gènes

de répllication et d'incompatibilité du plasmide TOL. Ces gènes lui permettent de se maintenir en présence de ce dernier.

L'intervention d'éléments génétiques transposables, vecteurs de gènes de dégradation a également été rapportée. Il n'est pas exclu que ce type de support génétique, connu également comme étant responsable de la prolifération, parmi les entérobactéries, d'opérons comprenant de un à 10 gènes de résistance à des antibiotiques, puisse également être impliqué dans la prolifération de la capacité à dégrader des substrats xénobiotiques et donc dans le phénomène d'adaptation des sols. Les travaux de Chakrabarty *et al.* (1978), Chakrabarty *et al.* (1983), Slater et Bull (1982), Slater *et al.* (1985) contribuent à apporter à ce phénomène une réalité expérimentale.

Cherchant à construire une souche microbienne capable de métaboliser un autre composé phénoxyacétique chloré peu biodégradable, le 2,4,5-T, également connu sous l'appellation d'agent orange et utilisé massivement en temps que défoliant, Chakrabarty *et al.* (1978) mettent en évidence la présence de gènes codant pour une benzoate oxygénase à faible spécificité de substrat au sein d'un élément transposable. Cette enzyme dont le substrat "naturel" se trouve être le benzoate, est capable de transformer également certains des dérivés chlorés de cette molécule. Ainsi accepte-t-elle comme substrat le 4-chlorobenzoate et le 3,5-dichlorobenzoate qu'elle transforme en catéchols correspondants.

Ghosal *et al.* (1985b) remarquent que l'expression des gènes codant pour la dégradation du 3-chlorobenzoate portés par le plasmide pJP4 n'a lieu, lorsque ce plasmide est transféré chez *P. putida*, qu'après un réarrangement du plasmide qui doit se faire au niveau des séquences répétées présentes sur ce plasmide et existant à la fois sous forme de séquences inversées répétées et de séquences répétées directes.

Plus récemment, Tomasek *et al.* (1989) puis Haugland *et al.* (1990), montrent qu'une séquence répétée (IS 931) encadrant un gène intervenant dans la dégradation du 2,4,5-T par la souche *Pseudomonas cepacia* AC1100 fonctionne comme une séquence d'insertion pouvant activer l'expression de certains gènes. Celle-ci aurait pu contribuer selon ces auteurs, à l'acquisition de voies métaboliques nouvelles chez *P. cepacia* AC1100.

Enfin les travaux de Slater et Bull (1982) que nous avons décrits lors du précédent chapitre apportent un exemple intéressant de combinaison d'événements complexes où la transposition et la conjugaison participent simultanément à l'évolution des capacités dégradantes d'une souche. Ces auteurs nous permettent d'appréhender la succession d'événements pouvant aboutir à partir d'un plasmide conjugatif à large spectre d'hôte, à la naissance d'un

plasmide de dégradation. Il suffit à ce plasmide de se trouver à un instant donné en présence d'un environnement chromosomique pouvant lui transmettre une certaine information génétique complémentaire située par exemple au niveau d'un élément transposable. La conjugaison hétérospécifique, accompagnée d'éventuels réarrangements, de recombinaisons ou de nouvelles transpositions lui permettrait alors de transmettre cette information vers des espèces bactériennes pouvant être phylogéniquement très éloignées. L'accumulation de gènes de dégradation sur des plasmides conjugatifs pourrait ainsi donner naissance à des plasmides portant des gènes parfois complémentaires qui seraient maintenus dans les souches sous l'effet de pressions de sélection que représenterait la présence de tel ou tel composé xénobiotique. On peut au contraire imaginer que des combinaisons "défavorables" seraient perdues.

Des homologies ont été observées entre des plasmides d'origine très éloignée. Deux groupes de chercheurs s'intéressant parallèlement à la dégradation du 3-chlorobenzoate (3-CB), isolent des souches capables de métaboliser cette molécule. Ainsi l'équipe de Knackmuss isole une souche de *Pseudomonas* sp. B13 capable de croître sur ce substrat comme seule source de carbone (Dorn *et al.*, 1974) tandis que l'équipe de Chakrabarty va chercher à caractériser génétiquement une souche de *P. putida* isolée des eaux d'égout de Niskayuna (N.Y., U.S.A.), elle aussi capable de dégrader ce dérivé aromatique chloré (Chatterjee *et al.*, 1981). Ces auteurs montrent que cette souche porte un plasmide conjugatif (pAC25) responsable de la dégradation du 3-CB par une rupture "ortho" du cycle aromatique chloré sous l'action d'une pyrocatéchase spécifique des catéchols chlorés codée par le plasmide. Des homologies sont mises en évidence entre les plasmides pAC25 et pWR1 (pB13) portés par ces deux souches (Chatterjee et Chakrabarty, 1983). Ghosal *et al.* (1985b) cherchent alors à mettre en évidence de telles analogies de structure entre pAC25 et pJP4 qui code aussi pour la dégradation du 3-CB. Ils mettent en évidence deux zones homologues entre ces deux plasmides.

L'existence de fortes homologies a été également observée entre les plasmides pouvant avoir des rôles extrêmement divers tels que les plasmides TOL, SAL impliqués respectivement dans la dégradation des toluates et des salicylates et les plasmides pAC25 et pAC30 codant respectivement pour la dégradation du 3-CB et la résistance à la tétracycline, la carbénicilline et la streptomycine. Kellog *et al.* (1981) remarquent après digestion de ces quatre plasmides par l'enzyme de restriction *EcoRI*, l'existence d'un fragment homologue qui indiquerait, d'après ces auteurs, une origine ancestrale commune de ces plasmides. Ces zones de forte homologie pourraient également, d'après

Karns *et al.* (1984) jouer un rôle actif dans l'évolution de ces différents plasmides autorisant à leur niveau des événements de recombinaison et donc l'échange d'informations génétiques pouvant conduire à la naissance de nouvelles voies métaboliques.

Ainsi peut-on avancer dans la compréhension des mécanismes d'évolution qui donnent naissance, à partir de gènes impliqués dans le métabolisme de composés naturels, à de véritables opérons codant pour des protéines capables d'accepter comme substrats des composés xénobiotiques. Grâce au clonage et au séquençage des gènes impliqués dans la dégradation des composés xénobiotiques, la comparaison de leur séquence avec celle des gènes impliqués dans la dégradation de composés aromatiques naturels peut être réalisée. L'étude de ces relations phylogénétiques pourrait permettre d'avancer dans la connaissance de l'origine et de l'évolution des gènes impliqués dans la dégradation des substances xénobiotiques ainsi que de leur support génétique.

La localisation précise des gènes sur les plasmides s'avère alors une étape indispensable à la justification des hypothèses émises. Là encore, la souche JMP 134 d'*A. eutrophus* et son plasmide pJP4 ont servi de référence.

3- ÉLABORATION DE LA CARTE PHYSIQUE D'UN PLASMIDE CODANT POUR LA DEGRADATION DE L'ACIDE 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIQUE

3.1 La mutagénèse transpositionnelle - une méthode autorisant l'élaboration de cartes physiques et la localisation de gènes intervenant dans une voie métabolique.

Déjà de nombreux travaux utilisent la mutagénèse transpositionnelle pour l'établissement de cartes génétiques chez *E. coli* (Kleckner *et al.*, 1975; Kleckner, 1977). Le principe de cette méthode est simple. Il consiste à introduire un transposon porteur d'un gène de résistance à un antibiotique (Tn1, Tn3, Tn5, Tn7, Tn10,...) ou à un métal lourd (Tn501) dans le génôme d'une souche bactérienne. L'insertion d'un élément transposable au niveau d'un gène modifie la transcription de celui-ci générant des protéines non fonctionnelles. La voie métabolique est ainsi bloquée et l'on peut détecter, dans le milieu de culture, l'accumulation d'un intermédiaire au moins lorsque celui-ci est stable. La détection de la mutation du gène touché par le transposon peut donc se faire par

des mesures d'activités. Elle peut aussi être mise en évidence par complémentation. Le caractère phénotypique obtenu peut être relié à la présence du transposon en une position particulière du génôme. Initialement, c'est l'introduction de nouveaux sites de restriction portés par le transposon qui est utilisée pour localiser l'insertion. Cette technique, mise au point pour l'établissement de cartes génétiques chez *E. coli* s'est longtemps limitée à cette souche. Cette limitation était due à l'absence de moyen d'introduction du transposon chez des non-entérobactéries. Aussi les premières mutagenèses de réplicons originaires de souches autres que *E. coli* n'ont pu être réalisées que parce que les réplicons étudiés ou leurs dérivés étaient transmissibles à *E. coli* et les gènes étudiés exprimables chez cet organisme. La mutagenèse était alors réalisée chez la souche d'*E. coli* ayant reçu le réplicon.

C'est ainsi que Franklin *et al.* (1981) parviennent à localiser les gènes codant pour la dégradation du toluène chez *P. putida*. Mais l'intérêt de la méthode reste limité à quelques situations particulières, celles de plasmides conjugatifs dont les gènes peuvent être traduits par le système enzymatique d'*E. coli*. Des adaptations sont entreprises pour l'étude des non-entérobactéries. Cependant, certaines d'entre elles restent spécifiques de l'espèce bactérienne particulière pour laquelle elles ont été développées et présentent peu d'intérêt pour les équipes s'intéressant aux plasmides de dégradation. Il faut donc attendre l'apparition de nouveaux vecteurs, réplicons ou phages porteurs d'un transposon, pouvant être utilisés pour la mutagenèse d'un large éventail d'espèces bactériennes, pour voir paraître les premiers résultats de caractérisations génétiques de plasmides impliqués dans la dégradation des composés xénobiotiques. Ces vecteurs utilisés pour la mutagenèse transpositionnelle des non-entérobactéries vérifient trois points essentiels. Tout d'abord, ils permettent au transposon de s'introduire à l'intérieur de la cellule hôte. Ils doivent ensuite autoriser la réplication du transposon et son saut vers le génôme de la cellule hôte; enfin, il est nécessaire qu'une ségrégation entre le vecteur portant le transposon et le génôme-cible puisse avoir lieu afin de permettre la sélection, sur un milieu comprenant un métal lourd ou un antibiotique, de la mutation par l'acquisition du gène de résistance porté par le transposon. On trouvera dans Weightman *et al.* (1984) une description des différents vecteurs disponibles alors.

En 1985, Boulnois *et al.* publient les résultats de travaux amorcés depuis 1981 aboutissant à l'obtention de pLG221, un dérivé du plasmide ColIb d'*E. coli* porteur d'un transposon Tn5 et qui exprime les fonctions de conjugaison de façon constitutive (Boulnois, 1981). Ce plasmide se comporte comme un vecteur

suicide à l'intérieur de nombreuses bactéries Gram négatives. Un vecteur suicide muni d'un transposon est soit un réplicon spécifique d'une souche (généralement *E. coli*) porteur des fonctions de transfert (mais non de réplication) de vecteurs à large spectre d'hôte, soit lui-même un vecteur à large spectre d'hôte conjugatif au niveau duquel les fonctions de réplication ont été affectées par des insertions du bactériophage μ . Il peut donc être transmis à la bactérie receveuse mais il est incapable de s'y répliquer. Le seul événement, hormis la mutation spontanée aboutissant à l'expression du gène de résistance est donc la transposition, et cette dernière peut être sélectionnée sur un milieu contenant l'antibiotique approprié.

L'intérêt d'un tel outil est tout de suite compris par une équipe genevoise qui cherche à localiser sur pJP4 les gènes de dégradation du 2,4-D.

3.2 Mise en évidence de la localisation plasmidique des gènes impliqués dans la dégradation du 2,4-D chez *A. eutrophus* JMP134.

Cette technique permet peu à peu de construire la carte physique de pJP4 et de localiser avec précision l'emplacement des gènes impliqués dans la dégradation du 2,4-D. C'est à l'aide des transposons Tn5 seul (Weightman *et al.*, 1984), Tn5 et Tn1771 que Don et Pemberton (1985) puis Don *et al.* (1985) réussissent à localiser sur pJP4, les gènes de résistance au mercure d'une part et surtout, pour ce qui nous intéresse ici, certains des gènes impliqués dans la dégradation du 2,4-D et du 3-chlorobenzoate (3-CB). Weightman *et al.* (1984) réalisent un premier croisement entre une souche d'*E. coli* porteuse du vecteur suicide pLG221::Tn5 (Boulnois *et al.*, 1985), et la souche sauvage *A. eutrophus* JMP134. Trois classes de mutants sont obtenues. La première classe comprend ceux qui sont incapables de dégrader le 2,4-D mais poussent sur 3-CB. La deuxième classe comprend les souches incapables de dégrader le 2,4-D et le 3-CB. Pour ces deux classes, il est démontré que la mutation est consécutive à une insertion du transposon sur le plasmide. La comparaison des profils de restriction à l'aide de 3 enzymes (*Bam*HI, *Eco*RI et *Hind*III) permet de positionner les insertions du transposon respectivement à l'intérieur du fragment *Bam*HI "C" de pJP4 pour les mutants du premier groupe, et à l'intérieur du fragment *Hind*III "G" de 1,6 kb pour les mutants du deuxième groupe. Enfin une troisième classe de mutants comporte les souches capables de dégrader le 2,4-D mais non le 3-CB. Weightman *et al.* (1984) montrent que cette classe correspond à une insertion chromosomique du transposon Tn5 suggérant ainsi l'intervention d'enzymes codées par le chromosome dans la dégradation du 3-CB. Ces travaux sont les

souche	phénotype	origine
JMP134 (pJP4)	2,4-D ⁺ 3CB ⁺	souche sauvage
JMP221	2,4-D ⁻ 3CB ⁻	souche curée de son plasmide
JMP222	2,4-D ⁻ 3CB ⁻ Sm ^R	mutant spontané de JMP221 résistant à la streptomycine
JMP298	2,4-D ⁻ 3CB ⁻ rif ^R	mutant spontané de JMP221 résistant à la rifampicine
RD520::Tn5	2,4-D ⁻ 3CB ⁻ Sm ^R rif ^R	JMP221 ayant reçu le transposon Tn5 sur son chromosome
RD521::Tn1771	2,4-D ⁻ 3CB ⁻ Sm ^R Tc ^R	JMP221 ayant reçu le transposon Tn1771 sur son chromosome
RD530::Tn5(pJP4)	2,4-D ⁺ 3CB ⁺ Sm ^R Km ^R	RD520 ayant reçu le plasmide pJP4
RD531::Tn1771(pJP4)	2,4-D ⁺ 3CB ⁺ Sm ^R Tc ^R	RD521 ayant reçu le plasmide pJP4

Figure 2.4 : Souches dérivées d'*Alcaligenes eutrophus* JMP134 (d'après Weightman *et al.*, 1984 ; Don et Pemberton, 1985 ; Don *et al.*, 1985)

classe de mutant	croissance sur :		métabolite accumulé
	2,4-D	3CB	
A	-	+	2,4-D
B	-	+	2,4-dichlorophénol
C	-	-	3,5-dichlorocatéchol
D	-	-	chloromuconate
E	-	-	chlorolactone
F	±	-	non déterminé

± : croissance retardée par rapport au phénotype sauvage

Figure 2.5 : Classes phénotypiques des mutants d'*A. eutrophus* JMP134 présentant une insertion transpositionnelle au niveau de leur plasmide pJP4 (d'après Don *et al.*, 1985)

premiers d'une série qui va peu à peu aboutir à l'élaboration de la carte physique de pJP4.

Don et Pemberton (1985) réalisent des croisements entre d'une part, une souche d'*A. eutrophus* portant pJP4 et les transposons Tn5 ou Tn1771 insérés dans son génôme, et d'autre part la souche guérie d'*A. eutrophus* (JMP222) résistant à la streptomycine (le mode d'obtention de la souche donneuse JMP222::Tn5 (pJP4) ou JMP222::Tn1771(pJP4) n'est pas décrite par les auteurs). Ainsi, 5 transconjugants incapables de dégrader le 2,4-D et 5 transconjugants incapables de dégrader simultanément le 2,4-D et le 3-chlorobenzoate sont obtenus. La localisation des insertions permet de replacer sur le plasmide pJP4, les positions de gènes impliqués dans la dégradation du 2,4-D, ainsi que le gène codant pour la résistance au mercure, l'origine de réplication de pJP4, et les gènes d'incompatibilité.

L'article de Don *et al.* (1985) fait référence à cette même série d'expériences destinées à obtenir des insertions de transposons sur le plasmide pJP4 et à tester l'expression des gènes de dégradation ainsi mutés artificiellement. La méthode utilisée pour l'obtention de ces insertions de transposons sur le plasmide pJP4 est cette fois décrite. Elle présente des caractéristiques intéressantes.

Dans le cas d'une souche disposant de deux réplicons de nature distincte (un chromosome et un plasmide), l'introduction d'un transposon dans le génôme ne peut être ciblée. La probabilité de transposition sur un plasmide dépend du rapport de sa taille à celle du chromosome bactérien. L'insertion du transposon sur le chromosome est donc plus probable compte-tenu de sa taille beaucoup plus importante et il est nécessaire de tester de nombreux transconjugants ayant reçu l'insert avant de sélectionner un mutant portant le transposon sur le plasmide. Don *et al.* (1985) utilisent un protocole leur évitant cette phase laborieuse de criblage. Ils utilisent comme souche donneuse *A. eutrophus* guéri de son plasmide (JMP222) modifiée par insertion d'un transposon dans son chromosome puis réintroduction du plasmide pJP4. Ils utilisent alors la faculté de conjugaison de pJP4 pour sélectionner le saut du transposon sur le plasmide et le transfert de celui-ci chez la souche receveuse, un mutant de JMP222 (JMP298). Les transconjugants ayant reçu le plasmide pJP4 porteur du transposon sont sélectionnés sur un milieu contenant de la rifampicine et respectivement de la kanamycine ou de la tétracycline. (L'ensemble des souches employées est présenté sur la figure 2.4).

17 mutants présentant le phénotype [2,4-D⁻] et portant une insertion du transposon Tn5 sur pJP4 ainsi que 12 mutants présentant le même phénotype sous l'effet d'une insertion sur pJP4 du transposon Tn1771 sont sélectionnés dans

cette étude. Don *et al.* (1985) les classent alors en 5 sous-groupes (B, C, D, E et F) en fonction des intermédiaires métaboliques du 2,4-D accumulés dans un milieu de culture contenant du 2,4-D et du pyruvate (figure 2.5). La dernière classe, F, est celle des mutants portant une insertion d'un transposon mais pour lesquels aucune accumulation d'un quelconque intermédiaire n'est détectée. Les mutants de cette classe présentent cependant des retards de croissance par rapport à la souche sauvage sur un milieu où le 2,4-D est la seule source de carbone disponible. Ainsi distinguent-ils 5 gènes intervenant dans la dégradation du 2,4-D (*tfd B,C,D,E,F*) dont trois sont également impliqués dans la dégradation du 3-chlorobenzoate (*tfdC, D* et *E*). Ces cinq gènes codent respectivement pour une 2,4-dichlorophénolhydroxylase, une dichlorocatéchol 1,2-dioxygénase, une chloromuconate cycloisomérase et une chlorodiènelactone hydrolase. Enfin l'enzyme codée par *tfdF* est supposée être une trans-chlorodiène lactone isomérase. Ces auteurs n'arrivent donc pas à localiser le gène *tfdA* codant pour la première enzyme intervenant dans la voie de dégradation de cet herbicide qui doit accepter comme substrat le 2,4-D en générant le 2,4-dichlorophénol.

3.3 A la recherche du gène codant pour la monooxygénase.

A l'aide de profils de restriction, Don *et al.* (1985) parviennent à localiser l'ensemble des insertions des transposons Tn5 et Tn1771 générant des phénotypes [2,4-D⁻] à l'intérieur d'un fragment *EcoRI* du plasmide pJP4 de 14 kilobases. Les gènes adjacents portés par ce fragment sont clonés à l'intérieur du vecteur mobilisable à large spectre d'hôte pKT231 et réintroduits ainsi dans JMP298. Don *et al.* (1985) observent alors que JMP 298 ayant reçu le fragment *EcoRI* de 14 kb cloné dans pKT231 est capable de dégrader le 2,4-D ainsi que le 3-chlorobenzoate. Cette même souche, lorsqu'elle reçoit un sous-fragment *Sst I* de 8 kb issu du fragment *EcoRI* de 14 kb et cloné dans le vecteur pKT231 est capable de croître sur 3-chlorobenzoate mais pas sur 2,4-D. Malgré ces derniers résultats qui suggèrent que toutes les enzymes nécessaires à la dégradation du 2,4-D (et donc en particulier la monooxygénase) sont codées par ce fragment *EcoRI* de 14 kb, Don *et al.* (1985) n'excluent pas une localisation chromosomique de *tfdA* tout en avançant l'hypothèse d'insertions préférentielles des transposons sur certaines séquences dont *tfdA* serait dépourvu (insertions non aléatoires).

Aussi, lorsque quelques années plus tard, utilisant les mêmes techniques, Streber *et al.* (1987) localisent le gène *tfdA* codant pour la monooxygénase à 13 kb de "l'opéron 2,4-D" sur le plasmide pJP4, le résultat surprend. S'appuyant sur les

observations d'Amy *et al.* (1985) signalant que la capacité à couper la chaîne latérale de la molécule de 2,4-D, autrement dit, l'activité monooxygénase, peut être transmise à *E. coli* sous la forme du fragment *Hind*III "B" de 21 kb du plasmide pJP4, Streber *et al.* (1987) cherchent le gène *tfdA* au niveau de ce fragment. Ils réussissent à obtenir des mutants déficients pour la monooxygénase et bien qu'ils localisent le gène *tfdA* dans le fragment *Hind*III "B" ils ne peuvent en établir la position précise compte-tenu de remaniements et de délétions observés sur les plasmides pJP4 de ces mutants.

Repartant des observations de Don *et al.* (1985), Perkins et Lurquin (1988) recherchent une autre copie du gène *tfdA* à l'intérieur du fragment *Eco*RI de 14 kb de pJP4. Ainsi découvrent-ils *tfdAII* qu'ils trouvent faiblement homologue à *tfdAI*, montrant que le gène de la monooxygénase est dupliqué chez *A. eutrophus* JMP134. Ainsi, comprend on les difficultés rencontrées par Don *et al.* (1985) lors de leur tentative de localisation du gène *tfdA* par mutagenèse transpositionnelle. La duplication du gène *tfdA* conditionne l'impossibilité d'isoler un mutant présentant une monooxygénase déficiente par simple mutation insertionnelle, les deux gènes pouvant se compléter mutuellement. Les délétions et remaniements au sein des plasmides pJP4::Tn5 observés par Streber *et al.* (1987), expliquent alors la production d'une monooxygénase inactive, encore que leur origine reste inexplicquée. De tels événements semblent cependant fréquents. Des réarrangements du plasmide pJP4 sont également observés par Weightman *et al.* (1984) et Ghosal *et al.* (1985b) lorsque les cellules d'*A. eutrophus* JMP134 sont cultivées sur 3-CB comme seule source de carbone ou lorsque ce plasmide est transféré à des souches de *P. putida* initialement non-dégradantes et que la sélection des transconjugants se fait sur du milieu contenant du mercure ou du 3-CB (absence de pression de sélection pour la dégradation du 2,4-D).

La relation gène-protéine est alors établie avec les premiers séquençages. Streber *et al.* (1987) publient la séquence de *tfdA* avec sa traduction probable en acides-aminés. Ainsi la région codante comporte 861 paires de bases, taille qui s'accorde au poids moléculaire connu de la monooxygénase purifiée déterminé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 32000 daltons par ces auteurs.

3.4 "Recrutement" d'une maléylacétate réductase chromosomique pour la voie de dégradation du 2,4-D chez *A. eutrophus* JMP134.

Etudiant l'expression des gènes de dégradation du 2,4-D portés par pRO103, (plasmide dérivé de pJP4 par délétion des gènes de régulation permettant une expression constitutive des gènes de dégradation du 2,4-D) chez différentes souches réceptrices de *Pseudomonas aeruginosa* ayant reçu le plasmide par conjugaison, Kukor *et al.* (1989) remarquent que toutes ne sont pas capables de croître en présence de 2,4-D comme seule source de carbone. Chez certaines d'entre elles, la dégradation du 2,4-D aboutit à l'accumulation de chloromaléylacétate. Introduisant chez les souches munies de pJP4 et accumulant cet intermédiaire métabolique un autre plasmide dans lequel a été clonée une maléylacétate réductase issue du chromosome d'un *Pseudomonas fluorescens*, ces auteurs obtiennent des souches capables de croître sur 2,4-D comme seule source de carbone. Ces auteurs concluent donc que toutes les enzymes nécessaires à la dégradation du 2,4-D ne sont pas codées, chez *A. eutrophus* JMP134 par son plasmide pJP4 mais que le gène nécessaire à la dernière étape de la dégradation du pesticide, avant que ces dérivés ne puissent être pris en charge par les voies métaboliques traditionnelles (cycle des acides tricarboxyliques), est porté par le chromosome. Ces conclusions s'accordent avec les résultats de Weightman *et al.* (1984) qui obtenaient un phénotype [2,4-D⁻] sous l'effet d'une insertion chromosomique du transposon Tn5.

3.5 Mise en évidence de *tfdCII* chez *Alcaligenes eutrophus* JMP134.

Reprenant les résultats des travaux de Chatterjee et Chakrabarty (1983), qui avaient mis en évidence l'existence d'homologies entre les plasmides pAC25 et pWR1 impliqués dans la dégradation du 3-chlorobenzoate, Ghosal *et al.* (1985b) cherchent à vérifier la présence d'homologies entre pAC25 et pJP4 qui, nous le savons, codent également pour la dégradation de ce composé. Ces auteurs confirment qu'un fragment de 4,2 kb de pAC25 portant les gènes de dégradation du 3-CB (gènes *clc*) chez *P. putida* est homologue à un sous-fragment de 10 kb environ du fragment *EcoRI* "B" du plasmide pJP4 portant, d'après Don *et al.* (1985) les gènes impliqués dans la dégradation des chlorocatéchols (*tfdC, D, E*). La zone d'homologie n'inclut pas le fragment codant

pour *tfdA*, enzyme spécifique de la voie de dégradation du 2,4-D. De plus une homologie est observée entre ce fragment de pAC25 et le fragment *EcoRI* "E" de pJP4 qui n'est pas alors connu comme portant des gènes impliqués dans la dégradation du 2,4 D.

Ghosal et You (1988) analysent ultérieurement ces résultats à la lumière des travaux de Streber *et al.* (1987) qui localisent sur *EcoRI* "E" le gène codant pour la monooxygénase. Celui-ci ne pouvant expliquer l'homologie observée par Ghosal *et al.* (1985b) puisque cette enzyme est impliquée dans la première étape de la dégradation du 2,4-D (rupture de la chaîne latérale de la molécule), ils cherchent un autre gène commun aux voies de dégradation du 2,4-D et du 3-CB dans cette zone. Ainsi mettent-ils en évidence *tfdCII*.

En 1988 également, Pieper *et al.* purifient deux catéchol 1,2-dioxygénases distinctes et montrent que leur affinité pour les deux substrats, le 3-chlorocatéchol et le 3,5-dichlorocatéchol, sont différentes. L'une d'entre elles dégrade beaucoup plus vite le 3,5-dichlorocatéchol que le 3-chlorocatéchol ou le catéchol.

Par ailleurs, Pieper *et al.* (1988) étudiant la croissance d'*A. eutrophus* JMP134 sur différents dérivés de composés aromatiques chlorés et méthylés montrent que si la même enzyme intervient dans la rupture de la liaison éther reliant le cycle à la chaîne latérale au sein des molécules de 2,4-D, de MCPA et de 2-MPA, les phénol hydroxylases acceptant comme substrats les phénols issus de cette première étape sont différentes. Compte-tenu de nos connaissances actuelles, aucune duplication du gène *tfdB* n'a été rapportée. Mais il n'est pas impossible que ces voies de dégradation fassent intervenir également d'autres gènes chromosomiques.

3.6 Régulation des gènes de dégradation

Ghosal *et al.* (1985b) réalisent des expériences de transfection de fragments de pJP4 clonés dans un cosmide. Cette technique permet d'obtenir des souches d'*E. coli* ayant reçu, dans leur génôme de façon aléatoire, un ou plusieurs fragments du plasmide pJP4 clonés dans pLAFR1, un cosmide à large spectre d'hôte conjugatif pouvant se maintenir dans de nombreuses bactéries gram-négatives. Après conjugaison des cellules d'*E. coli* transfectées utilisées comme donneuses, avec une souche réceptrice de *P. putida*, et sélection des transconjugants sur un milieu contenant du 3-CB et de la tétracycline (le cosmide pLAFR1 utilisé porte un gène de résistance à cet antibiotique), ces auteurs

obtiennent entre autres, deux souches de *P. putida* capables de croître sur un milieu contenant du 3-CB comme seule source de carbone. La première souche contient le fragment *EcoRI* "B" seul cloné dans le cosmide pLAFR1, la deuxième contient les trois fragments *EcoRI* "B", "E" et "F" de pJP4. Ces auteurs remarquent alors que c'est la souche contenant les trois fragments "B" (portant les gènes impliqués dans la dégradation du 3-CB), et "E" et "F" (dont le rôle n'est pas alors connu) qui pousse le plus vite. Ces auteurs suggèrent que ces fragments portent un ou des gènes de contrôle positif de l'expression des gènes de catabolisme du 3-CB.

Les autres preuves de l'existence d'un système de régulation de l'expression des gènes de biodégradation du 2,4-D et du 3-CB nous viennent des résultats des travaux de Pieper *et al.* (1985), Rojo *et al.* (1987), Pieper *et al.* (1988) et Pieper *et al.* (1989). Ces auteurs s'intéressent à la capacité simultanée de JMP134 de dégrader les dérivés aromatiques méthylés (tels que l'acide 4-méthylphénoxyacétique (Pieper *et al.*, 1985) et l'acide 2-méthylphénoxyacétique (Pieper *et al.*, 1989), des composés tels que le phénol ou certains phénoxyacétates, enfin des dérivés chlorés (3-CB et 2,4-D) ou méthylchlorés (MCPA). Alors que les premiers composés subissent une attaque du cycle en *méta*, les autres subissent une attaque du cycle en *ortho*. Puisque ces deux voies de dégradation sont juxtaposées chez *A. eutrophus*, ces auteurs remarquent à juste titre qu'un système de régulation doit exister au niveau de la transcription des gènes impliqués dans ces voies de dégradation, empêchant l'induction des enzymes non appropriées et évitant ainsi aux substrats d'emprunter une voie métabolique inadéquate qui aboutirait à l'accumulation de composés toxiques pour la cellule. Pieper *et al.* (1989) isolent un mutant de JMP134 exprimant, de façon constitutive les six enzymes impliquées dans la voie de dégradation du 2,4-D et supposent par conséquent que cette mutation affecte une région de pJP4 portant un gène responsable de la régulation simultanée de ces six enzymes.

De plus, Streber *et al.* (1987) remarquent que lorsque l'on réintroduit le gène *tfdA* seul cloné dans un vecteur à large spectre d'hôte dans la souche JMP222 d'*A. eutrophus* dépourvue de son plasmide pJP4, celle-ci devient capable de pousser sur acide phénoxyacétique de manière constitutive. Pieper *et al.* (1989), rapprochent ce résultat de ceux obtenus par Pemberton *et al.* (1979). Ces auteurs avaient en effet remarqué que la fréquence d'apparition de mutants d'*A. eutrophus* JMP134 capables de croître sur l'acide phénoxyacétique non substitué était assez élevée. Pieper *et al.* (1989) relie alors l'acquisition de cette nouvelle capacité métabolique à une mutation sur pJP4 et suggèrent qu'une telle mutation doit affecter le schéma de régulation existant chez cette souche. Harker *et al.*, en

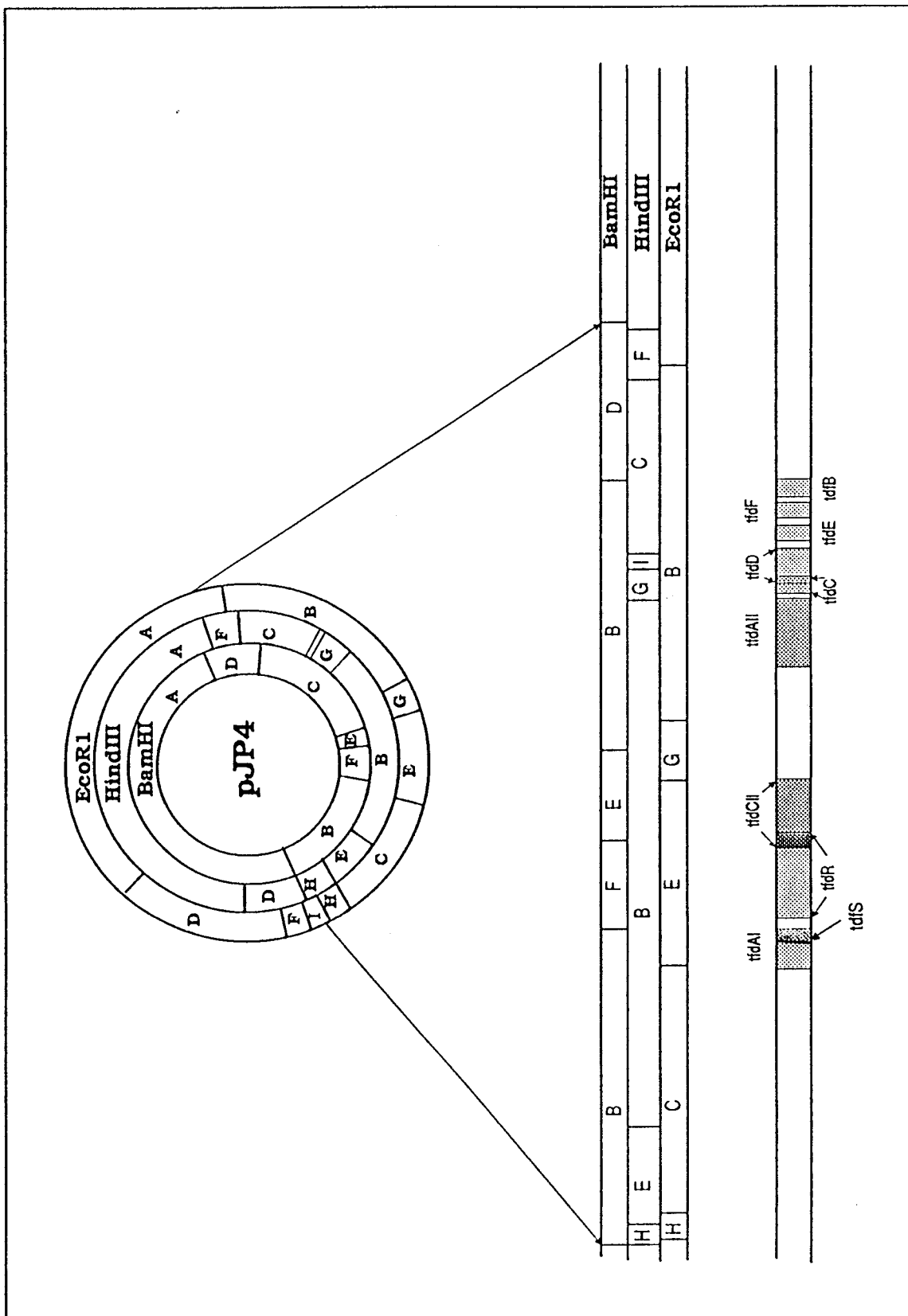


Figure 2.6 : Carte physique du plasmide pJP4 (d'après Soulas, 1990).

1989, mettent à jour sur pJP4 un premier élément de ce système de régulation à l'aide de la mutagenèse transpositionnelle et des techniques de clonage. Ces auteurs confirment en effet l'intervention d'un gène *tfdR* porté par le fragment *EcoRI* "E" dans la régulation de la voie de dégradation du 2,4-D observée par Ghosal *et al.* (1985a,b). Leurs conclusions sont cependant légèrement différentes. Travaillant avec des souches de *P. putida* pourvues ou non d'une phénol-hydroxylase chromosomique, ils étudient chez ces souches l'expression des gènes de la dégradation du 2,4-D et de la phénol-hydroxylase en présence de différents substrats (2,4-D, 3-CB, phénoxyacétate) dont ils testent le pouvoir inducteur. Les souches reçoivent par conjugaison le plasmide pJP4 muté à l'aide du transposon Tn1721 dans des zones ne comportant pas de gènes cartographiés et à ce titre considérées comme non-essentiels (plasmide pRO101) facilitant la sélection des transconjugants. Ces auteurs remarquent que seul le 2,4-D induit l'expression de la monooxygénase. Le phénoxyacétate, qui est pourtant un substrat de l'enzyme ne possède pas ce rôle inducteur. La consommation de phénoxyacétate en l'absence de 2,4-D, nécessite par conséquent une expression constitutive du gène *tfdA*. Un seul transconjugant est capable de dégrader l'acide phénoxyacétique de façon constitutive. Contrairement à Ghosal *et al.* (1985b), qui avaient observé une amplification du fragment *EcoRI* "B" au sein du vecteur où il avait été cloné et qui était présent à raison de plusieurs copies par plasmide chez les mutants à croissance rapide sur 3-CB, Harker *et al.* (1989) remarquent que ce mutant (à croissance rapide) présente une délétion au niveau des fragments *BamHI* "F" et "E" (équivalents du fragment *EcoRI* "E") de leur plasmide. Aussi, l'amplification des fragments portant les gènes structuraux de la dégradation du 3-CB n'est plus invoquée pour expliquer l'expression constitutive de ces gènes. Harker *et al.* (1989) attribuent l'expression constitutive à l'absence, chez ces mutants, d'un gène de régulation négative de l'expression des gènes de dégradation (*tfdR*) et qui serait porté par le fragment *BamHI* "E" délété.

L'année suivante, Kaphammer *et al.* (1990) montrent que *tfdR* est également responsable de la régulation de l'opéron *tfdCDEF* dont le promoteur commun serait sensible au produit de ce gène. Par contre, *tfdB* ne semble pas être sous le contrôle de *tfdR*.

Aussi, Kaphammer et Olsen (1990) recherchent un système de régulation de l'expression de *tfdB*. Ils mettent en évidence un gène, *tfdS*, porté par le fragment *EcoRI* "E" de pJP4, dont le produit agit en tant que répresseur de la transcription de *tfdB* en l'absence d'un effecteur et au contraire en tant qu'activateur lorsque cet effecteur est présent. Kaphammer et Olsen (1990) suggèrent que l'effecteur est soit l'acide chloromaléylacétique, soit la 2-*cis*-

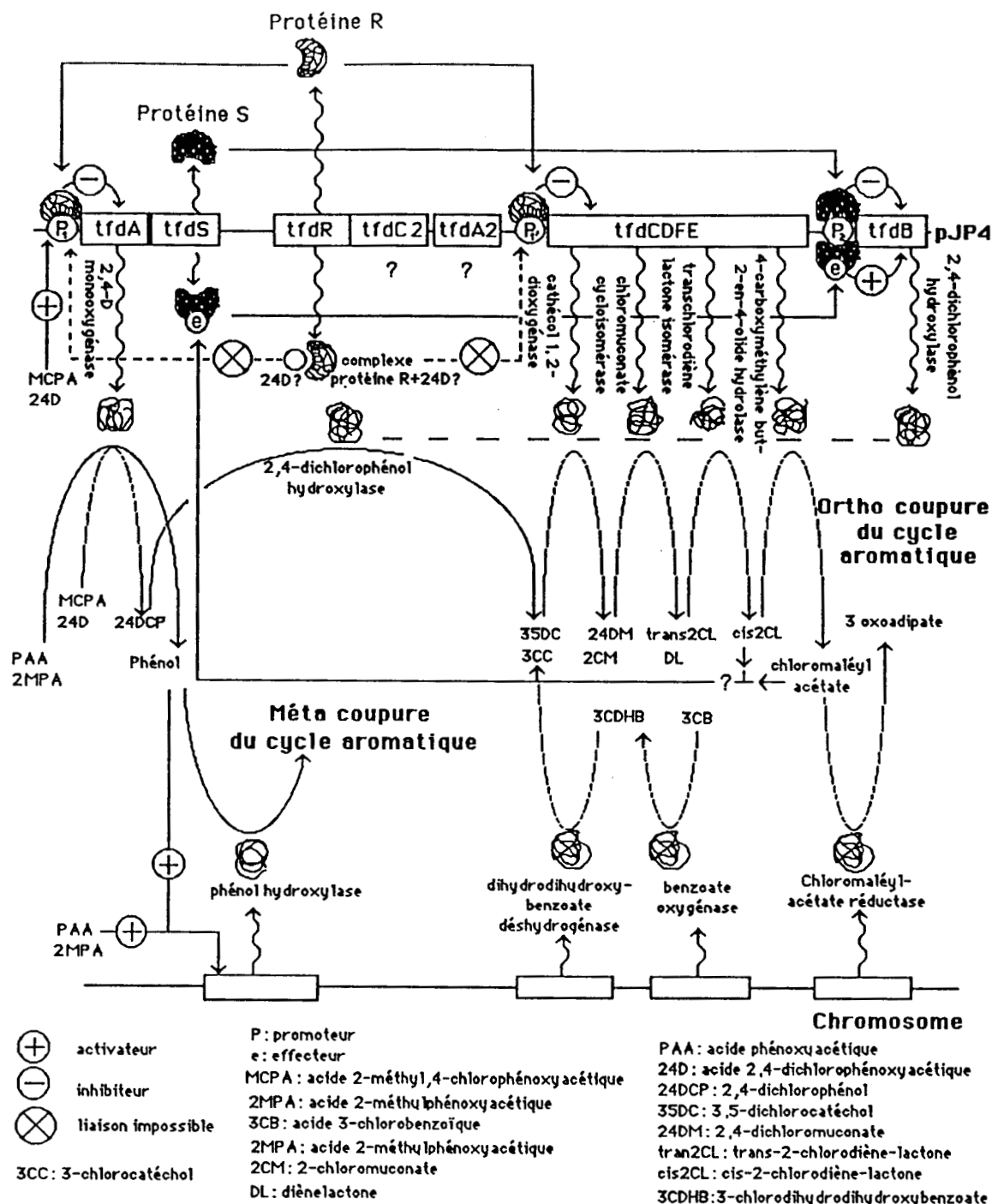


Figure 2.7 : Schéma synthétique du système de régulation des gènes de dégradation du 2,4-D chez *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (d'après Pemberton *et al.*, 1979 ; Weightman *et al.*, 1984 ; Amy *et al.*, 1985 ; Don et Pemberton, 1985 ; Don *et al.*, 1985 ; Ghosal *et al.*, 1985 ; Pieper *et al.*, 1985, 1988, 1989 ; Steber *et al.*, 1987 ; Ghosal et You, 1988 ; Perkins et Lurquin, 1988 ; Perkins *et al.*, 1988 ; Harker *et al.*, 1989 ; Kukor *et al.*, 1989 ; Kaphammer *et al.*, 1990 ; Kaphammer et Olsen, 1990).

chlorodiène lactone. La proximité des deux gènes de régulation *tfdR* et *tfdS* sur pJP4 explique alors les résultats de Pieper *et al.* (1989) qui suggéraient qu'un même gène de régulation inhibait l'expression des six enzymes impliquées dans la voie métabolique du 2,4-D. La délétion simultanée du fragment *EcoRI* "F" portant *tfdS* et de la partie adjacente de *EcoRI* "E" portant *tfdR* peut en effet expliquer l'expression constitutive des six gènes de dégradation, même si les schémas de régulation des trois opérons ne sont pas identiques. Les observations de Ghosal *et al.* (1985b) peuvent être vues alors comme une confirmation des schémas de régulation mis à jour : les fragments *EcoRI* "E" et "F" de pJP4 contiennent les deux gènes de dégradation *tfdR* et *tfdS* régulant l'ensemble des gènes de dégradation de la voie métabolique (figure 2.6). La souche JMP222 munie de l'ensemble des fragments *EcoRI* "B", "C", et "D" de pJP4 est alors, compte-tenu des connaissances actuelles, capable de présenter le même comportement que la souche JMP134 sauvage

Nous avons représenté la synthèse de toutes ces données dans le schéma de fonctionnement de la voie de dégradation du 2,4-D sur pJP4 avec ses systèmes de régulation (figure 2.7). Le mode d'action de la protéine issue du répresseur n'étant pas discuté, nous avons arbitrairement choisi de représenter un schéma de régulation du type de celui de l'opéron lactose sachant que le produit de *tfdR* est une protéine active en *trans*. Les résultats de Perkins *et al.* (1988) démontrent l'existence d'une forte homologie entre les séquences du promoteur de *tfdA* et celle du promoteur de l'opéron *tfdCDEF*. Ils appuieraient l'hypothèse d'une reconnaissance de cette séquence par le produit de *tfdR* et une fixation de cette protéine au niveau des deux promoteurs, empêchant le positionnement de l'ADN polymérase et donc le démarrage de transcription des deux opérons.

L'ensemble de ces données nous a donc conduit à rechercher la présence d'un plasmide chez TV1. Deux questions étaient alors posées. Existait-il un plasmide chez *A. paradoxus* TV1 qui, à l'image de pJP4, porterait les gènes de dégradation de cette souche? Si un tel plasmide était présent, était-il conjugatif et pouvait-il être transmis aux autres membres composant la communauté dégradant le 2,4-D dans le chémostat?

<i>Espèce - Souche</i>	<i>Phénotype</i>	<i>Plasmide (voir tab. 2.9)</i>	<i>Références</i>
<i>Pseudomonas putida</i>			
PAW340	trp ⁻ , Sm ^R	-	Jeenes et Williams, 1982
UWC1	Rif ^R	pD10	Mc Clure <i>et al.</i> , 1989 et 1990
UWC3	ilv ⁻ , Rif ^R	-	Hill <i>et al.</i> , 1992
<i>Alcaligenes eutrophus</i>			
JMP 134	2,4-D ⁺ , Hg ^R	pJP4	Don et Pemberton, 1981
JPM 222	2,4-D ⁻ , 3-CB ⁻ , Sm ^R	-	Don et Pemberton, 1981
<i>Alcaligenes paradoxus</i>			
TV1	2,4-D ⁺	pTV1	ce travail
TVM6	2,4-D ⁺ , auxotrophe	pTV1	ce travail
<i>Escherichia coli</i>			
ED2196	his, trp, nal	pLG221::Tn5	Willetts et Johnson, 1981
ED8654	met ⁻	p1701::Tn5-mobsac	Murray <i>et al.</i> , 1977
S17-1	Sm ^R	pSUP2021::Tn5	Hynes <i>et al.</i> , 1989
SM10	Δlac-pro, thi, strA, supE, endA, proAB, F ['] traD36, lacI ^{qtss}	pSUP5011::Tn5-mob	Genilloud <i>et al.</i> , 1984
JM107		pHG327	Simon <i>et al.</i> , 1983
		pKT231	Yanisch-Perron <i>et al.</i>
		pTV2 (pHG327-tfd)	Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981
		pTV3 (pLAFR3-tfd)	ce travail
		pHG327-HindIII GA10	ce travail
		pGSS8-tfdA	Mc Clure, communication personnelle
C600		pRK2013	Streber <i>et al.</i> , 1987
		pKT231-tfdR	Figurski et Helinski, 1979
		pLAFR3	Kaphammer <i>et al.</i> , 1990
803	pro ⁻ , met ⁻ , Km ^R , Tc ^R ,	pLAFR3	Staskawicz <i>et al.</i> , 1987
J53	Am ^R	RP4-5	Sayler <i>et al.</i> , 1985

Tableau 2.8 : Caractéristiques et provenance des souches utilisées.

II. APPROCHE EXPERIMENTALE

A MATÉRIEL ET MÉTHODES

1- SOUCHES UTILISÉES ET PLASMIDES

L'ensemble des souches utilisées ainsi que leurs plasmides ont été présentés respectivement dans les tableaux 2.1 et 2.2.

2- MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

Le détail de la composition des milieux utilisés a été présenté en annexe (fiche technique 1 "milieux de cultures").

Pour toutes les préparations d'ADN, les souches d'*E. coli* sont cultivées sur milieu LB, contenant éventuellement l'antibiotique approprié au maintien du plasmide, et incubées une nuit à 37°C sur table d'agitation (200 rpm). Les souches de *Pseudomonas* sp. et d'*Alcaligenes* sp. sont, selon les cas, cultivées sur milieu LB ou milieu 2,4-D liquide et incubées à 28°C sur table d'agitation (200 rpm). Les temps d'incubation nécessaires à l'obtention d'une phase stationnaire sur les milieux liquides utilisés sont présentés dans le tableau 2.3.

3- MÉTHODES MOLÉCULAIRES

L'ensemble des méthodes utilisées au cours de ce travail étant détaillé en annexe, nous n'en reprendrons ici que les principes généraux.

3.1 Préparations d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique des souches d'*E. coli* utilisées a été extrait par lyse alcaline des cellules à l'aide d'un détergent (Brij®58 Aldrich-chemie) suivie d'une ultracentrifugation sur chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium (Humphrey *et al.*, 1975). Ce colorant a la propriété de s'intercaler différemment entre les brins d'ADN circulaire ou linéaire (chromosomique) et

Plasmide	Marqueurs	Propriétés	Dérivé de	Références
pKT231	Sm ^R , Km ^R , <i>mob</i> ⁺	mobilisable, non auto-transférable, à large spectre d'hôte	RSF1010	Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981
pHG327	Amp ^R , <i>lacad</i> ⁺ , <i>rop</i> ⁺	propre à <i>E. coli</i> ; expression du gène cloné régulée par une copie du gène <i>lacI</i> ^q	pBR322	Stewart <i>et al.</i> , 1986
pRK2013	Km ^R , <i>tra</i> ⁺ , <i>mob</i> ⁺ , <i>colEI</i>	plasmide "helper"		Figurski et Helinski, 1979
pLAFR3	IncP, <i>mob</i> ⁺ , Tc ^R , <i>cos</i>	cosmide, vecteur à large spectre d'hôte, mobilisable, non autotransférable	pLAFR1 contenant le polylinker de pUC8	Staskawicz <i>et al.</i> , 1987
pLG221::Tn5	<i>colb</i>	vecteur suicide pour les non-entérobactéries		Boulnois <i>et al.</i> , 1985
pMH1701::Tn5- <i>mobsac</i>	Km ^R	"		Hynes <i>et al.</i> , 1989
pSUP2021::Tn5	Km ^R	"		Reznikoff, 1982
pSUP5011::Tn5- <i>mob</i>	Km ^R	"		Simon <i>et al.</i> , 1983
pJP4	Hg ^R , <i>tfdA-F</i> ⁺ , <i>tfdR</i> ⁺ , <i>tfdS</i> ⁺	conjugatif, porteur de gènes de dégradation du 2,4-D		Don et Pemberton, 1981
pTV1	<i>tfd</i>	porteur des gènes de dégradation du 2,4-D		ce travail
pTV2	<i>tfd</i> , Amp ^R	"	pHG327	ce travail
pTV3	<i>tfd</i> , <i>mob</i> ⁺ , Tc ^R , <i>cos</i>	"	pLAFR3	ce travail
RP4-5	Tc ^R , Amp ^S , Km ^S		RP4	Burkardt <i>et al.</i> , 1979

Tableau 2.9 : Caractéristiques et provenance des plasmides utilisés.

ceux de l'ADN plasmidique superenroulé à qui il confère une densité apparente plus élevée (fiche technique 5).

Les plasmides des souches de *P. putida* UWC1 (Jeenes et Williams, 1982) et d'*A. eutrophus* JMP134 (Don et Pemberton, 1981), ont été isolés selon le même principe mais suivant le protocole décrit par Hansen et Olsen (1978), qui diffère du précédent par le détergent employé (dodécyl sulfate de sodium) et surtout par la méthode de précipitation des protéines, réalisée en solution saline, et celle de l'ADN qui est faite par action du polyéthylène glycol. Ce composé possède la propriété d'agglutiner les macromolécules dont les molécules d'ADN. Celles-ci précipitent alors en formant des agrégats (fiche technique 6).

Enfin l'ADN plasmidique de la souche d'*A. paradoxus* TV1 a été isolé sur gradient de saccharose (Wheatcroft et Williams, 1981). Contrairement aux méthodes précédentes, le lysat non déprotéinisé est directement déposé sur un gradient de concentration en saccharose préformé par congélation d'une solution à 20% de saccharose suivie d'une décongélation. Tous les composés cellulaires sont séparés par ultracentrifugation en jouant sur leur vitesse différentielle de sédimentation (gradient de densité "dynamique"). Cette méthode offre l'avantage d'être beaucoup plus rapide et applicable à de très nombreuses espèces bactériennes. Elle donne également la possibilité de séparer des plasmides de taille différente. Son rendement reste cependant inférieur par rapport aux méthodes de purification plasmidique sur gradient de densité à l'équilibre (chlorure de césium) (fiche technique 7).

La vérification de la présence de plasmides dans les souches a été effectuée selon les protocoles décrits par Kado et Liu (1981) pour les plasmides à large poids moléculaire. Un pH très élevé (12,6) suivi d'un traitement à la chaleur sont à l'origine d'une dénaturation des protéines, de l'ARN ainsi que de l'ADN chromosomique se trouvant sous forme linéaire dans les cellules. L'ADN plasmidique, sous forme superenroulé, est moins sensible à la dénaturation dans de telles conditions (fiche technique 8).

Dans le cas de souches d'*E. coli*, la méthode décrite par Holmes et Quigley (1981) (fiche technique 9), et la méthode modifiée de Birnboim et Doly (1979), (Maniatis *et al.*, 1982) (fiche technique 10), ont été respectivement utilisées pour la mise en évidence rapide de plasmide de moins de 20 kb et plus de 20 kb. La première méthode s'appuie sur une dénaturation des protéines par ébullition : les composants membranaires, en précipitant, entraînent avec eux l'ADN chromosomique qui leur est généralement attaché. Le lysat clarifié contient l'ADN plasmidique. La deuxième méthode est une lyse alcaline des cellules suivie d'une extraction des protéines au phénol chloroforme.

3.2 Profils de restriction

L'ADN extrait a été digéré à l'aide d'enzymes de restriction (Boehringer Mannheim France) en présence du tampon préconisé par le fournisseur. Des profils de restriction ont été réalisés après digestion des plasmides par les enzymes *EcoRI*, *HindIII*, *SstI* (*SacI*), *BamHI* et *HpaI*. Les échantillons à digérer étaient incubés 1 heure à 37°C à l'exception des digestions à l'aide de l'enzyme *HpaI* qui étaient incubées 3 heures à 37°C, (fiche technique 3). La taille des fragments a été déterminée par référence aux fragments libérés par l'enzyme de restriction *HindIII* à partir de l'ADN du phage *lambda*.

3.3 Electrophorèse en gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN après digestion ainsi que la vérification de la pureté des fractions obtenues après centrifugation sur gradient de saccharose ou de chlorure de césium ont été réalisées par dépôt sur gel d'agarose 0,7% en tampon Tris-Borate-EDTA (fiche technique 3) et migration en cuve ou minicuve "Horizon 58" (Gibco-BRL) alimentées en courant continu à l'aide d'un générateur Consort E400. Les profils de digestion du plasmide d'*A. paradoxus* TV1 ont été réalisés sur gel à 0,5% d'agarose afin de séparer les fragments de taille importante.

3.4 Transfert d'ADN sur membrane

L'ADN a été transféré depuis les gels sur des membranes Nylon (Hybond N-Amersham ou Genebind 45-Pharmacia) à l'aide d'une unité de transfert sous vide Vacugene 2016 (Pharmacia LKB Biotechnologie, France), selon la méthode de Southern (1975) modifiée par le fabricant (fiche technique 16). Dans le cas où deux sondes différentes étaient à tester sur la même membrane et afin d'éviter la déshybridation de celle-ci, la méthode de transfert par capillarité bilatérale a été utilisée en plaçant de chaque côté du gel portant l'ADN à transférer une membrane nylon, deux épaisseurs de papier Whatman "3MM chr" et des couches bébé en ouate de cellulose. Un poids de 1 kg était placé sur l'ensemble pendant une nuit.

L'ADN était fixé sur les membranes par exposition aux rayonnements ultra-violet pendant trois minutes.

3.5 Purification des sondes

Dans le but de localiser l'emplacement des gènes de dégradation chez *A. paradoxus* TV1, l'ADN du plasmide pJP4 de la souche d'*A. eutrophus* JMP134 (Don et Pemberton, 1981) ainsi que des fragments de ce plasmide portant les gènes de dégradation clonés dans des vecteurs d'*E. coli* ont été utilisés comme sonde. Ainsi le gène *tfdA* (Streber *et al.*, 1987) a été préparé à partir de la souche *E. coli* JM107 (Yannisch-Perron *et al.*, 1985) porteuse du plasmide pGSS8 dans lequel ce gène avait été inséré au site *SstI* (*SacI*). Le gène *tfdR* (Kaphammer *et al.*, 1990) porté par le fragment *SstI* "D" de pJP4 a été purifié à partir de la souche *E. coli* C600 porteuse du plasmide pKT231 dans lequel ce fragment avait été cloné au site *SstI*. Enfin, le fragment "C" issu de la digestion de pJP4 par l'enzyme de restriction *SstI* porteur des gènes de dégradation *tfdBCDE* et cloné dans le vecteur pKT231 pour former le plasmide pD10 (Mc Clure *et al.*, 1990) a été isolé selon le même principe à partir de la souche *P. putida* UWC1 (Jeenes et Williams, 1982).

Les fragments portant les gènes de dégradation d'*A. eutrophus* JMP134 ont été purifiés à partir des vecteurs où ils avaient été clonés par digestion à l'aide de l'enzyme de restriction appropriée puis migration sur gel d'agarose à 0.7% et électroélution.

Le fragment d'ADN issu de la souche d'*A. paradoxus* TV1 dégradant le 2,4-D ultérieurement utilisé comme sonde a été obtenu par les mêmes méthodes.

3.5 Marquage des sondes et hybridations

Trois méthodes ont été utilisées au cours de ce travail. Le marquage au ³²P de l'ADN utilisé comme sonde a initialement été réalisé par translation de césure à l'aide du kit de "Nick translation Boehringer-Mannheim" (Maniatis *et al.*, 1982) (fiche technique 17). Il a ensuite été remplacé par des méthodes de marquage non radioactif ("Non radioactive DNA labeling and detection kit", Boehringer-Mannheim France (fiche technique 18), et kit ECL "gene detection e

RPN 2101 version 2", Amersham (fiche technique 19)) selon les protocoles décrits par les fournisseurs.

Les hybridations ont été réalisées à l'aide de la méthode proposée par Southern pour les sondes radioactives. Dans les autres cas, les protocoles conseillés par les fournisseurs ont été suivis.

3.6 Ligations et transformations

La préparation de cellules compétentes à partir de la souche *E. coli* JM107 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) a été réalisée selon le protocole décrit par Maniatis *et al.* (1982) (fiche technique 13). Les cellules compétentes ont été aliquotées puis congelées à -80°C dans du glycérol (fiche technique 2) puis décongelées au moment des expériences de transformation. Les protocoles proposés par Maniatis *et al.* (1982), ont également été utilisés pour les ligations (fiche technique 12) et les transformations. Pour les expériences de clonage deux vecteurs d'*E. coli* ont été utilisés: pHG327 (Stewart *et al.*, 1986), plasmide propre à *E. coli* et pLAFR3 (Staskawicz *et al.*, 1987), vecteur à large spectre d'hôte. Ces deux vecteurs possèdent un site de clonage multiple au niveau d'un gène *lacZ*. Ils ont été isolés respectivement à partir des souches *E. coli* 803 et JM107 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) par la méthode d'Humphreys *et al.* (1975) et utilisés pour le clonage après digestion par l'enzyme de restriction *EcoRI* et déphosphorylation. Cette dernière étape empêche la recircularisation du vecteur lors du clonage ainsi que la formation de dimères du vecteur qui dans certains cas présentent les mêmes propriétés à l'égard des critères de sélection que les vecteurs ayant reçu l'insert. Des souches *E. coli* JM107 [*lac*⁻] ont été utilisées comme cellules receveuses pour la transformation par les plasmides obtenus après ligation. Les milieux Mac Conkey agar (Difco laboratoires, Detroit, U.S.A.) contenant 50 mg l⁻¹ d'ampicilline et LB agar-Xgal-IPTG (composition en annexe: fiche technique 1) contenant 10 mg l⁻¹ de tétracycline ont été respectivement utilisés pour la sélection des transconjuguants.

3.7 Conjugaisons

Pour le transfert de plasmides entre souches par conjugaison, la méthode décrite par Simon *et al.* (1983), modifiée par Chaudhry et Huang (1988), a été utilisée (fiche technique 14).

B EXPÉRIMENTATIONS

1- CARACTÉRISTIQUES MÉTABOLIQUES D'*ALCALIGENES PARADOXUS* TV1

1.1 Objectifs

La caractérisation génétique de la souche TV1 d'*A. paradoxus* nécessitait certaines études préliminaires. Cette souche ayant été sélectionnée sur milieu à base d'extrait de sol auquel avait été ajouté du 2,4-D, il était tout d'abord nécessaire, pour les études génétiques ultérieures, de mettre au point un milieu capable de supporter la croissance de la souche tout en étant de préparation plus aisée. La connaissance des propriétés particulières d'auxotrophie et de résistance à divers antibiotiques était nécessaire pour la réalisation d'éventuelles conjugaisons.

D'autre part, les voies biochimiques de dégradation du 2,4-D étant connues chez plusieurs souches bactériennes, il s'avérait intéressant de tester les capacités d'*A. paradoxus* TV1 à croître sur différentes substances intervenant en tant qu'intermédiaires métaboliques dans les voies de dégradation du 2,4-D chez ces souches. Une telle démarche constituait une étape préliminaire à l'étude des voies métaboliques empruntées par le 2,4-D chez *A. paradoxus* TV1. De même, la tolérance au 2,4-D de notre souche devait être déterminée ainsi que la concentration en 2,4-D optimale pour sa croissance. Enfin, une telle démarche devait nécessairement commencer par l'étude de la stabilité des capacités d'*A. paradoxus* TV1 à dégrader le 2,4-D, une instabilité trop importante des caractères étudiés pouvant rapidement conduire à des conclusions erronées.

1.2 Matériels et méthodes

La croissance de la souche *A. paradoxus* TV1 a été testée sur un ensemble de sources carbonées dont la liste est exposée en annexe 2. Certains de ces composés pouvaient constituer d'éventuels intermédiaires métaboliques de la voie de dégradation du 2,4-D, d'autres, des analogues différemment substitués de cette molécule (2,4,5-T, MCPA). Nous avons observé le comportement d'*A. paradoxus* TV1 vis à vis d'un dérivé fluoré de l'acide benzoïque (acide m-

antibiotique	concentration	résultat
tétracycline	20 mg μl^{-1}	résistant
ampicilline	50 mg μl^{-1}	résistant
kanamycine	100 mg μl^{-1}	sensible
streptomycine	100 mg μl^{-1}	sensible
acide nalidixique	50 mg μl^{-1}	sensible
rifampicine	30 mg μl^{-1}	sensible

Figure 2. 10 : spectre de résistance de la souche *A. paradoxus* TV1

fluorobenzoïque) afin de déterminer la sensibilité de cette souche à différents radicaux halogénés. La souche *A. paradoxus* TV1 a également été ensemencée sur un milieu comprenant du 3-chlorobenzoate, composé dont la dégradation fait intervenir chez plusieurs bactéries, les enzymes également impliquées dans la voie métabolique du 2,4-D.

La souche *A. paradoxus* TV1 a également été cultivée sur Nutrient Agar (Difco laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.) en présence d'antibiotiques (tétracycline, kanamycine, acide nalidixique, streptomycine, rifampicine et ampicilline) ainsi que sur milieu minimal contenant des concentrations croissantes en 2,4-D (1, 2, 3, 5 et 10 mM). Afin de vérifier la stabilité de la capacité dégradante sur milieu complet, toutes les incubations ont été réalisées à 28°C, température optimale de croissance de la souche par rapport aux températures testées (10, 20, 25, 28, 30 et 40 °C, voir annexe II) à l'exception des mesures de dégradation réalisées à 20°C, ceci afin de travailler dans les conditions voisines de celles du chémostat.

Pour tester la stabilité des capacités dégradantes, des fioles de 200 ml de L-broth ont été ensemencées à l'aide d'*A. paradoxus* TV1 et placées sur des agitateurs à 28°C. Après deux jours de culture, 10 µl de suspension bactérienne étaient prélevés afin de réensemencer une nouvelle fiole du même milieu, maintenue dans les mêmes conditions que précédemment. Lors de chaque repiquage, des comptages de la flore bactérienne totale étaient réalisés sur Nutrient Agar, des comptages de la flore dégradante sur milieu gélosé minimal (BI^{tek} agar, Difco laboratories, Michigan, U.S.A.) contenant 3 mM de 2,4-D. Dix repiquages successifs ont été ainsi réalisés.

1.3-Résultats -Discussion

1.3.1 Spectres d'utilisation de substrats et spectres de résistance

Ainsi il s'est avéré que les milieux Nutrient Agar, LB agar et Loos (1975) modifié (fiche technique 1) pouvaient indifféremment supporter la croissance d'*A. paradoxus* TV1. Les sources de carbone testées pouvant supporter la croissance d'*A. paradoxus* TV1 sont présentées en annexe II et l'antibiogramme déterminé pour plusieurs antibiotiques est présenté sur la figure 2.10.

Les résultats des tests de croissance d' *A. paradoxus* TV1 sur des composés constituant d'éventuels intermédiaires métaboliques de la voie de dégradation du 2,4-D ou des analogues différemment substitués de cette molécule (2,4,5-T,

milieux à base des substrats carbonés 3mM	<i>Alcaligenes paradoxus</i> TV1		<i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134
	milieux liquides	milieux solides	
milieu minimum	-	-	-
Acétate	+	+	+
Malate	+	+	?
Succinate	+	+	+
Phénol	+	+	?
2,4-dichlorophénol	+-	+-	+
Benzoate	+	+	+
Acide 3-chlorobenzoïque	-	-	+
Acide 2,4-dichlorobenzoïque	-	-	+
2,4-D	+	+	+
2,4,5-T	+-	+-	?
MCPA	+	+	+
Acide m-fluorobenzoïque	-	-	?

+ Croissance observée
+- Croissance faible
- Pas de croissance

Figure 2.11 : Caractéristiques métaboliques de la souche *Alcaligenes paradoxus* TV1.

MCPA) sont présentés sur la figure 2.11. A titre indicatif, plusieurs résultats concernant la bactérie *A. eutrophus* JMP134 (Don et Pemberton, 1981) ont été ajoutés à cette figure. Des divergences apparaissent entre les deux souches. La croissance d'*A. paradoxus* TV1 sur 2,4-dichlorophénol est extrêmement faible, un trouble très léger apparaissant au bout de 10 jours suggérant soit une forte toxicité du 2,4-dichlorophénol, soit une dégradation "fortuite" faisant intervenir des enzymes pour lesquelles ce composé constitue un substrat inhabituel et pour lequel elles présentent une faible affinité. Compte-tenu de ce résultat, nous ne pouvons pas conclure en faveur de l'appartenance du 2,4-dichlorophénol à la voie de dégradation du 2,4-D chez *A. paradoxus* TV1. Il aurait été intéressant de poursuivre ce type d'études avec d'autres composés.

1.3.2 Concentration en 2,4-D inhibitrice pour la croissance

La croissance optimale a été observée sur le milieu contenant 3 mM de 2,4-D comme seule source de carbone. Une croissance était encore visible sur le milieu contenant 5 mM de 2,4-D. Aucune colonie n'est apparue sur les boîtes contenant 10 mM de ce substrat. Le phénomène de toxicité observé avec le 2,4-dichlorophénol se retrouve donc également avec le 2,4-D. Nous avons donc ultérieurement travaillé avec des milieux contenant 3 mM de 2,4-D. L'adjonction d'extrait de levure à raison de 0,005 g par litre ne modifiait pas les capacités dégradantes de la souche vis à vis des substrats testés en milieu liquide. Elle diminuait cependant le temps d'incubation nécessaire à l'obtention d'un trouble. Aussi avons nous choisi d'inclure l'extrait de levure à cette concentration dans la composition du milieu minimal dont on trouvera le détail en annexes (fiche technique 1).

1.3.3 Stabilité de la capacité dégradante

Le milieu Nutrient Agar a été choisi comme milieu solide complet de croissance, l'apparition des colonies pouvant y être observée au bout de 2 jours, le L-broth, comme milieu complet liquide, la densité maximale de bactéries y étant observée au bout de 2 à 3 jours à 28°C. Il était alors nécessaire de vérifier que la croissance sur ces milieux n'altérait pas les capacités dégradantes de la souche étudiée. Aucune différence statistiquement significative n'a pu être détectée entre les deux comptages. La capacité d'*A. paradoxus* TV1 n'était donc pas affectée par plusieurs passages successifs sur milieu dépourvu de 2,4-D. Les

milieux complets choisis pouvaient donc être utilisés lors des études génétiques ultérieures.

2-PRÉSENCE D'UN PLASMIDE DANS LA BACTÉRIE

2.1 Objectifs

La recherche d'un plasmide chez *A. paradoxus* TV1 a été motivée par les nombreuses données de la bibliographie décrivant l'intervention de plasmides dans la dégradation de composés aromatiques naturels ou xénobiotiques (Chakrabarty, 1976; Chaudhry et Chapalamadugu, 1991). Comme nous venons de l'exposer, de nombreux résultats sont disponibles concernant la souche *Alcaligenes eutrophus* JMP134 dégradant le 2,4-D. Les voies métaboliques de la dégradation du pesticide ont été déterminées chez *A. eutrophus* JMP134 et l'emplacement des gènes de dégradation a été localisé précisément sur le plasmide pJP4 (Weightman *et al.*, 1984; Don *et al.*, 1985; Streber *et al.*, 1987; Perquins et Lurquin, 1988; Harker *et al.*, 1989; Kaphammer *et al.*, 1990 a,b). Compte-tenu de l'appartenance de TV1 au genre *Alcaligenes*, nous avons supposé a priori qu'un plasmide était présent chez *A. paradoxus* TV1 et nous avons cherché à le mettre en évidence chez cette bactérie.

2.2 Matériel et méthodes

Parmi les quelques méthodes que nous avons utilisées (Kado et Liu, 1981; Birnboim et Doly, 1979; Hansen et Olsen, 1978; Eckhardt, 1978) pour tenter d'isoler un plasmide à partir d'*A. paradoxus* TV1, seule l'extraction sur gradient de saccharose (Wheatcroft et Williams, 1981) nous a permis de mettre en évidence une unité d'ADN extrachromosomique. Compte-tenu de l'absence de techniques rapides de préparation plasmidique pouvant être appliquées à notre souche, cette méthode a été utilisée en routine sur *A. paradoxus* TV1 tout au long de ce travail.

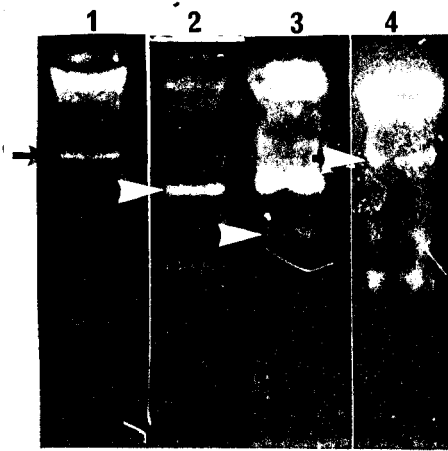


Figure 2.12 : Mise en évidence du plasmide pTV1 chez *Alcaligenes paradoxus* TV1 par extraction sur gradient de saccharose.

canaux 1 : pTV1 (? kb)
 2 : TOL (117 kb)
 3 : V517 (55.1 kb)
 4 : TP116 (221 kb)

2.3 Résultats



Nous avons pu obtenir des quantités de plasmide suffisantes et suffisamment pures pour la réalisation de profils de restriction et d'hybridation.

La taille du plasmide pTV1 a pu être estimée à environ 200 kb par référence à des plasmides de taille moléculaire connue. Compte-tenu de cette valeur et du grand nombre de sites de restriction présents sur le plasmide pour les enzymes testées (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *SstI*, *XhoI*), la carte de restriction n'a pas été établie (figure 2.12).

La vérification de la présence d'un plasmide chez *A. paradoxus* TV1 nous a conduits alors à émettre l'hypothèse d'une localisation plasmidique des gènes impliqués dans la dégradation du 2,4-D chez cette bactérie.

3- LOCALISATION DES GENES CODANT POUR LA DÉGRADATION DU 2,4-D

3.1 Objectifs généraux et techniques envisageables

Deux approches pouvaient alors être utilisées pour permettre la localisation des gènes de dégradation du 2,4-D :

- La mutagenèse transpositionnelle suivie d'une sélection de mutants ne dégradant pas le 2,4-D avec une localisation ultérieure de l'insertion du transposon chez ces mutants par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde marquée correspondant au transposon utilisé pour repérer les gènes (Weightman *et al.*, 1984; Don *et al.*, 1985).

- Il était possible de développer une autre approche à partir de la constatation faite par plusieurs auteurs, de la conservation des voies de dégradation du 2,4-D chez les souches concernées et ceci, particulièrement au niveau de la première étape de la dégradation (hydrolyse de la liaison éther entre le cycle et la chaîne latérale de la molécule générant le 2,4-dichlorophénol). S'appuyant de plus sur l'existence d'homologies mises en évidence entre différents plasmides impliqués dans la dégradation du 2,4-D, on pouvait espérer qu'une hybridation moléculaire entre pTV1 et des sondes formées par les fragments du plasmide pJP4 portant les gènes de dégradation du 2,4-D de la bactérie *A. eutrophus* JMP134 nous conduirait à la localisation de ces gènes sur pTV1. Le clonage d'une éventuelle zone d'homologie présente entre les deux plasmides, et son introduction chez une bactérie initialement dépourvue des capacités dégradantes pouvaient alors constituer une preuve de

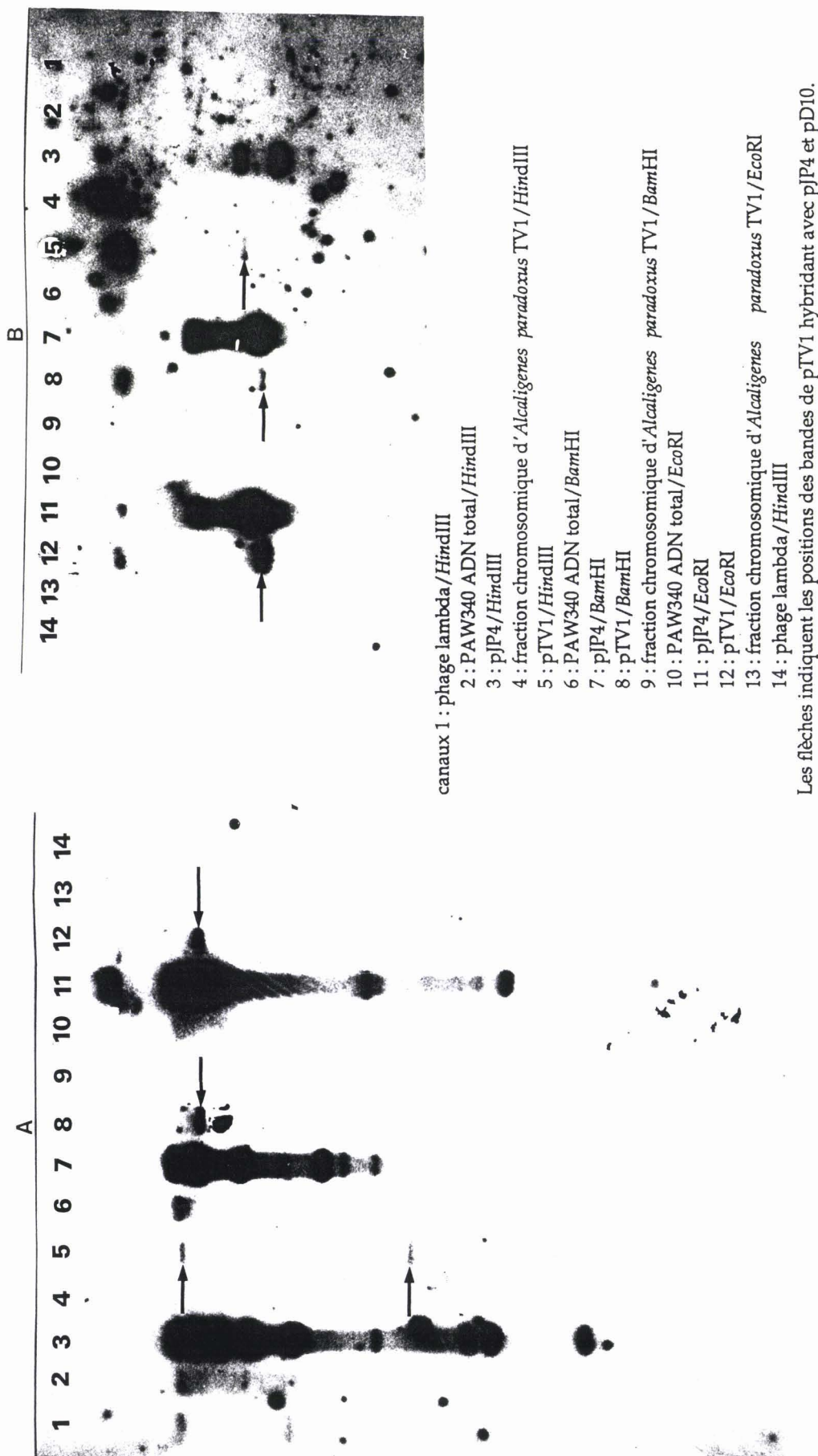
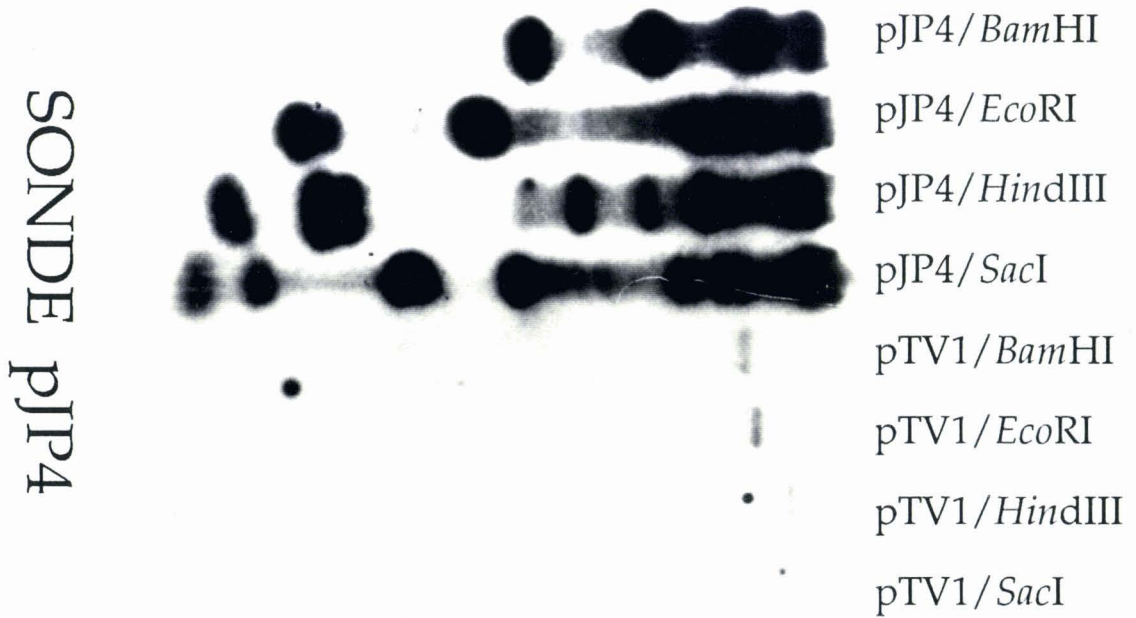
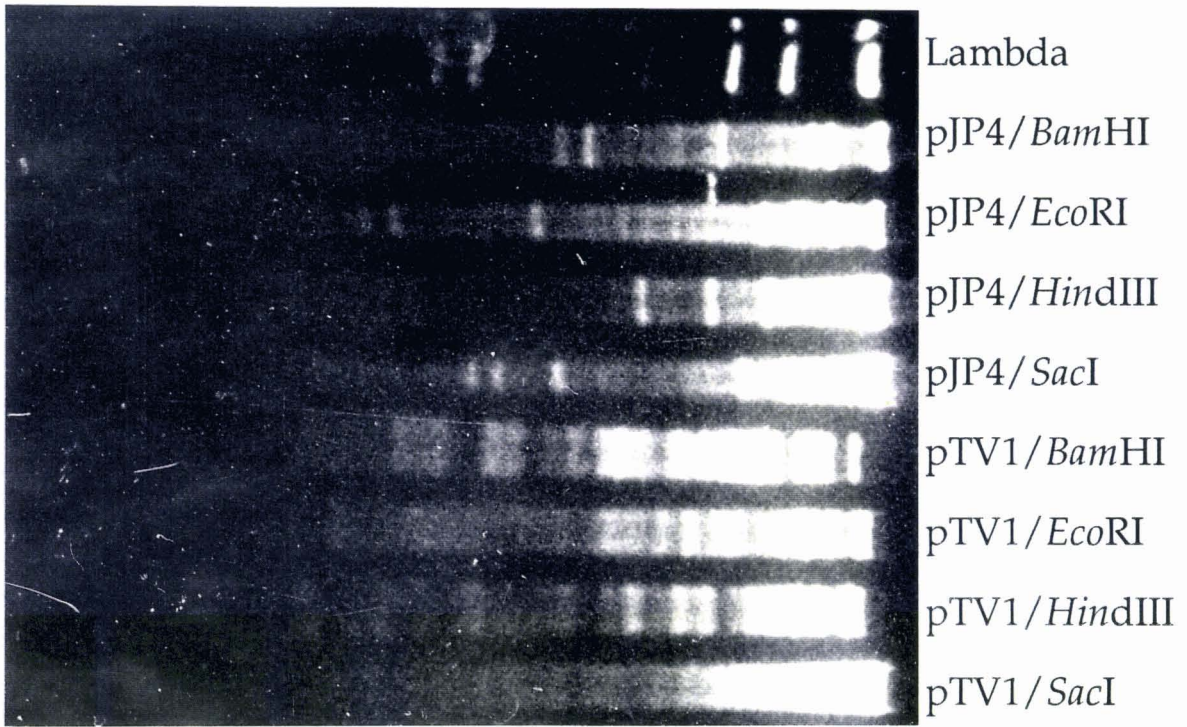


Figure 2.13 : Localisation des gènes de dégradation du 2,4-D d'*Alcaligenes paradoxus* TV1. Les fractions chromosomiques et plasmidiques d'*Alcaligenes paradoxus* TV1, le plasmide pJP4 d'*Alcaligenes eutrophus* et l'ADN total de *Pseudomonas putida* PAW340 [2,4D-] ont été coupés par les enzymes de restriction HindIII, BamHI et EcoRI puis soumis à l'hybridation avec :
 A : pJP4.
 B : pD10



la localisation plasmidique des gènes de dégradation du 2,4-D à la condition toutefois que celle-ci s'accompagne de l'acquisition, par la souche receveuse, de la capacité à dégrader le 2,4-D.

Ces deux démarches ont été tentées simultanément.

3.2. Hybridations

3.2.1. Matériel et méthodes

Les expériences d'hybridation moléculaire ont été réalisées à l'aide du plasmide pJP4 entier d'*A. eutrophus* JMP134 utilisé comme sonde sur les profils de restriction par les enzymes *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III et *Sst*I d'une fraction chromosomique et plasmidique de TV1. La souche PAW340 de *P. putida* (Jeenes et Williams, 1982) a été utilisée comme contrôle négatif. Les témoins positifs étaient constitués des fragments générés à partir du plasmide pJP4 par ces mêmes enzymes de restriction.

Dans un second temps, des hybridations ont également été réalisées à l'aide de sondes correspondant aux fragments de pJP4 portant les gènes codant pour les différentes enzymes intervenant dans la voie de dégradation du 2,4-D, *tfdR* (Kaphammer *et al.*, 1990) et pD10 équivalent au fragment *Sac*I "C" de pJP4 (Mc Clure *et al.*, 1990).

Enfin, nous avons cherché à mettre en évidence de façon précise, le fragment de pTV1 homologue à pJP4 sur son profil de restriction par l'enzyme *Eco*RI. Aussi avons nous réitéré l'expérience en utilisant comme sonde, le fragment *Sst*I "D" de pJP4 portant le gène *tfdR*. Nous avons réalisé une hybridation à l'aide de cette sonde, sur une membrane portant les plasmides pTV1 et pJP4 digérés par l'enzyme de restriction *Eco*RI.

3.2.2 Résultats

La première hybridation a montré l'existence d'homologies entre les plasmides pJP4 et pTV1 au niveau de deux fragments de restriction *Hind*III/*Hind*III du plasmide pTV1 (de taille 3 kb et 30 kb approximativement) lorsque celui-ci était digéré par l'enzyme de restriction *Hind*III. Une seule zone d'hybridation apparaissait sur les profils de pTV1 digérés par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Eco*RI. La taille des fragments homologues a respectivement été estimée à environ 10 et 11,5 kb. (figure 2.13 A)

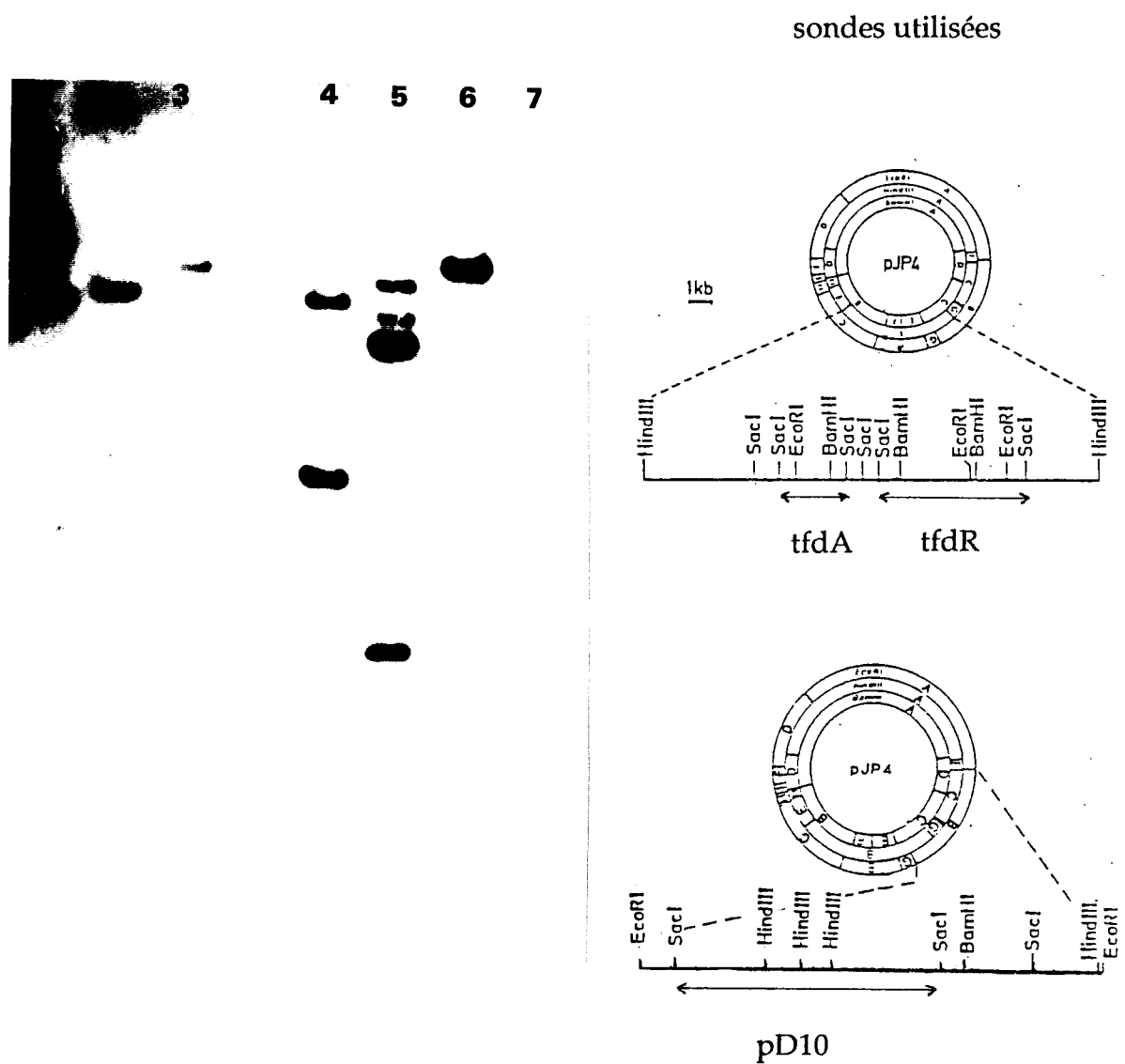


Figure 2.13 C : Localisation des gènes de dégradation du 2,4-D d'*Alcaligenes paradoxus* TV1. Les fractions chromosomiques et plasmidiques d'*Alcaligenes paradoxus* TV1, le plasmide pJP4 d'*Alcaligenes eutrophus* et l'ADN total de *Pseudomonas putida* PAW340 [2,4D⁻] ont été coupés par les enzymes de restriction *Hind*III, *Bam*HI et *Eco*RI puis soumis à l'hybridation avec *tfdR*.

- canaux 1 : pTV1/*Bam*HI
 2 : pTV1/*Eco*RI
 3 : pTV1/*Hind*III
 4 : pJP4/*Bam*HI
 5 : pJP4/*Eco*RI
 6 : pJP4/*Hind*III
 7 : phage lambda/*Hind*III

Ce résultat était cependant insuffisant pour attribuer cette homologie à d'éventuels gènes de dégradation présents sur pTV1. Entre autres, une telle homologie pouvait être la conséquence de la présence sur pTV1 d'un gène de résistance au chlorure mercurique, *A. paradoxus* TV1 étant résistant à des concentrations relativement importantes en HgNO₃ (50mg l⁻¹). La présence d'un tel gène avait en effet été montrée par Weightman *et al.* (1984) sur pJP4. La deuxième série d'hybridations nous a donc permis de vérifier nos suppositions. Il a été montré que la même zone de pTV1 était responsable d'une hybridation avec les fragments pD10 portant les gènes *tfdAII*, *tfdB* et l'opéron *tfdCDEF* ainsi que *SstI* "D" de pJP4 portant *tfdR* (figure 2.13 B et C). Ce résultat confirmait l'hypothèse que l'analogie existant entre les deux plasmides se limitait, pour pJP4, à la région portant les gènes de dégradation. Il laissait entrevoir la forte probabilité de la présence de gènes de dégradation du 2,4-D sur le plasmide pTV1 d'*A. paradoxus* TV1. Nous avons également localisé le fragment *EcoRI* de pTV1 responsable de l'hybridation avec les gènes de dégradation du plasmide pJP4 (figure 2.14). Ainsi, il a été montré que le huitième fragment "*EcoRI* H" de 11,3 kb (classé par ordre de taille décroissant) généré par digestion de pTV1 à l'aide de l'enzyme de restriction *EcoRI* était responsable de l'hybridation entre les deux plasmides. Plusieurs types d'approche pouvaient alors nous permettre de confirmer la présence, sur pTV1, des gènes de dégradation du 2,4-D:

- La mutagenèse transpositionnelle
- Le clonage des fragments de pTV1 homologues à pJP4 suivi de leur expression chez des bactéries dépourvues initialement de la capacité à dégrader le 2,4-D.

3.3 Mutagenèse transpositionnelle

3.3.1 Objectifs

Le transposon Tn5 a été choisi d'une part, pour ses propriétés d'insertion aléatoire et d'autre part parce que, portant un gène de résistance à la kanamycine, des milieux sélectifs pouvaient être utilisés en accord avec le spectre de résistance aux antibiotiques d'*A. paradoxus* TV1. La fréquence de mutation spontanée d'*A. paradoxus* TV1 donnant des bactéries résistantes à la kanamycine étant extrêmement faible, la quasi totalité des bactéries [Km^R] obtenues sont celles qui, ayant reçu le transposon par l'intermédiaire du plasmide vecteur d'*E. coli*, ont intégré celui-ci soit au niveau de leur

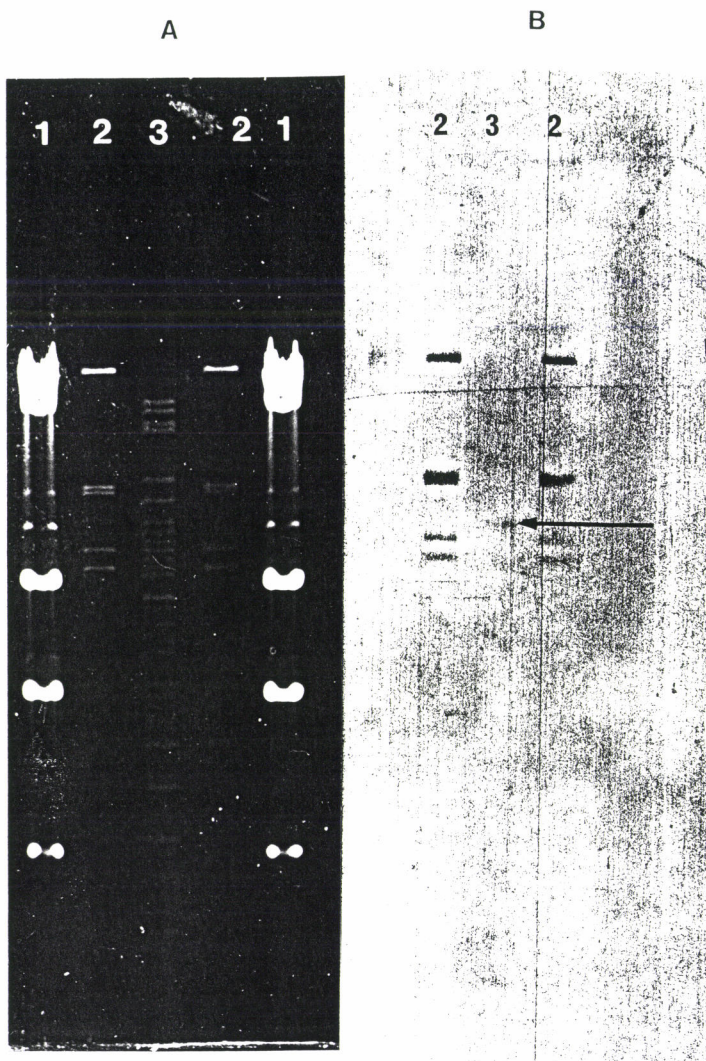


Figure 2.14 : Localisation précise du fragment *EcoRI* du plasmide pTV1 d'*Alcaligenes paradoxus* homologue à pJP4.

A : Profils de restriction après digestion par *EcoRI* des plasmides pJP4 et pTV1.

B : Hybridation à l'aide de la sonde *tfdR*
canaux 1 : phage lambda/*HindIII*
2 : pJP4/*EcoRI*
3 : pTV1/*EcoRI*

chromosome, soit au niveau du plasmide pTV1. Compte-tenu des résultats précédents, nous partions de l'hypothèse d'une localisation plasmidique des gènes de dégradation d'*A. paradoxus* TV1. Pour cela, nous avons adapté à notre souche le protocole de mutagénèse qui avait permis à Weightman *et al.* (1984), puis Don *et al.* (1985), de localiser, chez *A. eutrophus* JMP134, des gènes de dégradation du 2,4-D sur le plasmide pJP4. Il nous était alors nécessaire :

-1- d'obtenir un dérivé de la souche d'*A. paradoxus* TV1 guérie de son plasmide et résistante à un antibiotique (*A. paradoxus* [antibiotique^R])

-2- de disposer d'une souche d'*A. paradoxus* TV1 marquée à l'aide d'un transposon, sur le chromosome ou directement sur pTV1. De telles souches ont été obtenues par croisement d'une souche d'*E. coli* porteuse d'un vecteur suicide muni du transposon Tn5 avec la souche *A. paradoxus* TV1. Nous avons alors cherché à sélectionner directement des mutants [2,4-D⁻] incapables de pousser sur un milieu minimum comprenant du 2,4-D comme seule source de carbone. Il était nécessaire de vérifier si ce phénotype n'était pas dû à une insertion chromosomique du transposon à l'origine d'une auxotrophie de la souche et donc de l'incapacité à pousser sur milieu minimum quelle que soit la source carbonée présente. L'auxotrophie a été testée sur un milieu minimum comprenant une source carbonée normalement utilisée par *A. paradoxus* TV1, le succinate (12 mM).

- 3 - de vérifier la transmissibilité de pTV1, au moins entre différents dérivés d'*A. paradoxus* TV1. Le protocole utilisé demandait que pTV1 soit un plasmide conjugatif, quelque soit son spectre d'hôte.

- 4 - de réaliser la conjugaison entre *A. paradoxus* pTV1::Tn5 (présentant une insertion chromosomique ou plasmidique du transposon) utilisée comme souche donneuse et la souche guérie de *A. paradoxus* TV1 résistante à un antibiotique, afin de sélectionner un grand nombre d'insertions plasmidiques du transposon dans le but de sélectionner les transconjugants porteurs du plasmide muni du transposon et incapables de dégrader le 2,4-D. La localisation de l'insertion du transposon sur le plasmide pTV1 chez de tels transconjugants peut alors être réalisée par hybridation du profil plasmidique avec une sonde constituée par le transposon marqué.

Le transposon Tn5 "sauvage" a été utilisé dans un double but. Celui tout d'abord de localiser l'emplacement précis des gènes de dégradation d'*A. paradoxus* sur le plasmide pTV1. Le second objectif était d'obtenir un plasmide pTV1 marqué à l'aide d'un gène de résistance à un antibiotique afin d'étudier ses facultés de transfert (Ce point sera traité dans le paragraphe suivant). En effet, lors de l'insertion du transposon, l'un des points cibles du génôme de cette

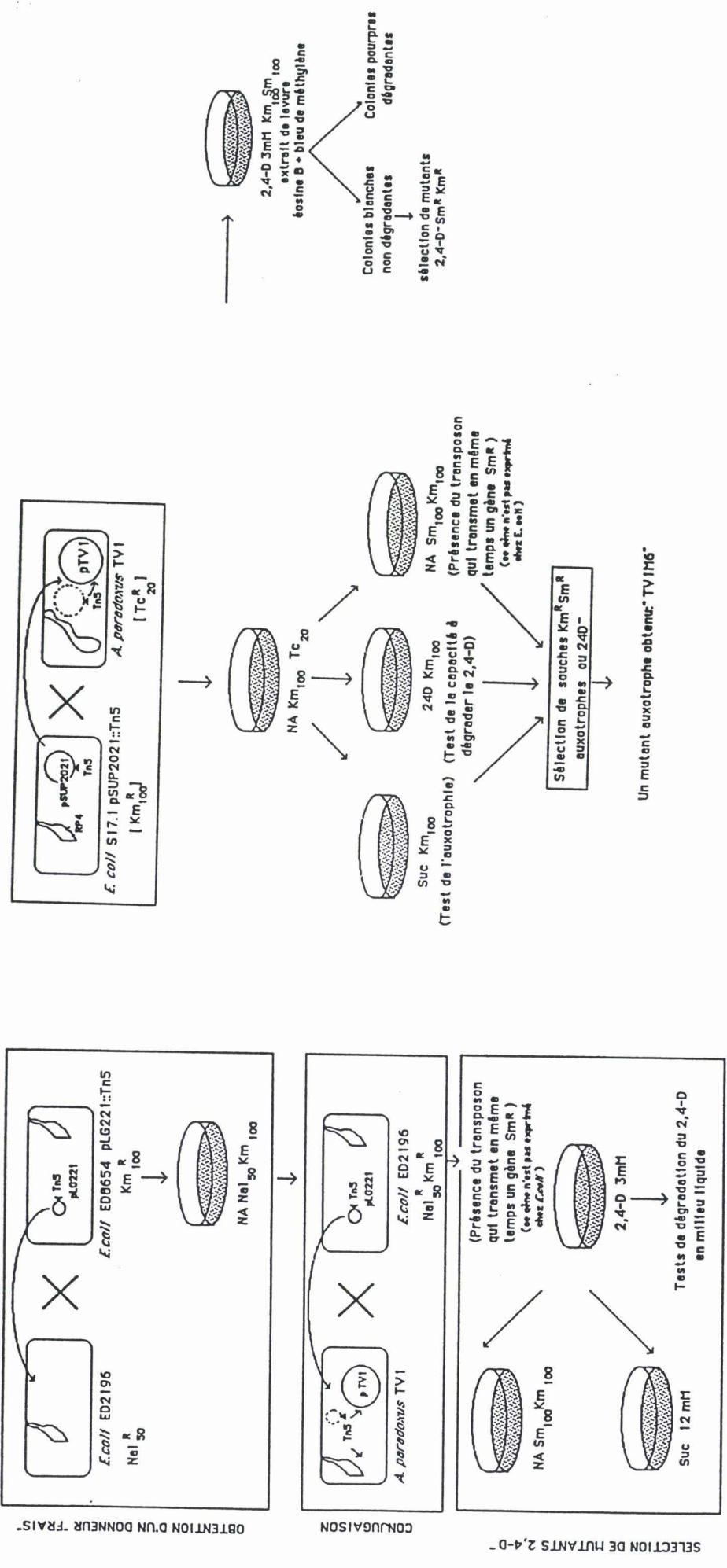


Figure 2.15 : Mutagenèse à l'aide du transposon Tn5 portant un gène de résistance à la kanamycine et sélection de transconjugants d' *Alcaligenes paradoxus* TV1 portant une insertion du transposon Tn5.

souche peut être un gène impliqué dans la dégradation de l'herbicide. Le transposon bloquant la transcription normale du gène, la souche receveuse perd alors l'aptitude à dégrader le 2,4-D.

3.3.2 Matériel et méthodes

Pour réaliser cette suite d'expérimentations, plusieurs souches d' *E. coli* ont été utilisées comme donneuses du transposon Tn5 :

-*Escherichia coli* ED 2196 (Willetts et Johnson, 1981) pLG221::Tn5 (Boulnois *et al.*, 1985) (figure 2.15a).

-*Escherichia coli* S17-1 p SUP 2021::Tn5 (Simon *et al.*, 1983) (figure 2.15b).

La fréquence de conjugaison s'étant révélée plus élevée avec la souche S17-1 d'*E. coli* qu'avec la souche ED2196, le premier croisement a été réitéré plusieurs fois. La sélection de transconjugants d'*A. paradoxus* TV1 résistants à la kanamycine et ayant perdu la capacité à pousser sur le 2,4-D comme seule source de carbone a initialement été faite par étalement des mélanges de conjugaison sur milieu Nutrient Agar contenant de la kanamycine et de la tétracycline, puis repiquage de ces bactéries sur milieu minimal contenant 3 mM de 2,4-D. Les transconjugants ont été également repiqués sur milieu minimal contenant 12 mM de succinate afin de détecter les éventuels mutants présentant le phénotype [2,4-D⁻] qui seraient en fait des mutants auxotrophes ayant subi une insertion chromosomique du transposon. Un transconjugant ne poussant pas sur les milieux minimums à base de succinate ou de 2,4-D a été ainsi obtenu. Compte-tenu des tailles relatives du chromosome et du plasmide, il était plus aisé de sélectionner un saut du transposon sur le plasmide à partir du chromosome d'un tel mutant par croisement de cette souche avec une receveuse sensible à la kanamycine et sélection des transconjugants que de l'obtenir par mutagenèse (croisement *E. coli* S17.1 pSUP2021::Tn5 x *A. paradoxus* pTV1).

Parallèlement nous avons cherché à mettre au point un milieu dérivé du milieu de Loos (1975) afin d'éviter la phase laborieuse de criblage des transconjugants non dégradants lors de conjugaisons du type *E. coli* pSUP2021::Tn5 x *A. paradoxus* pTV1 (figure 2.15c). Toutes choses égales par ailleurs, la concentration en 2,4-D du milieu de Loos (1975) avait été portée à 3 mM et la concentration en extrait de levure à 250 mg l⁻¹ de façon à autoriser la croissance des bactéries ne dégradant pas le 2,4-D. Des sels minéraux ont également été rajoutés (fiche technique 1). Les bactéries ne dégradant pas le

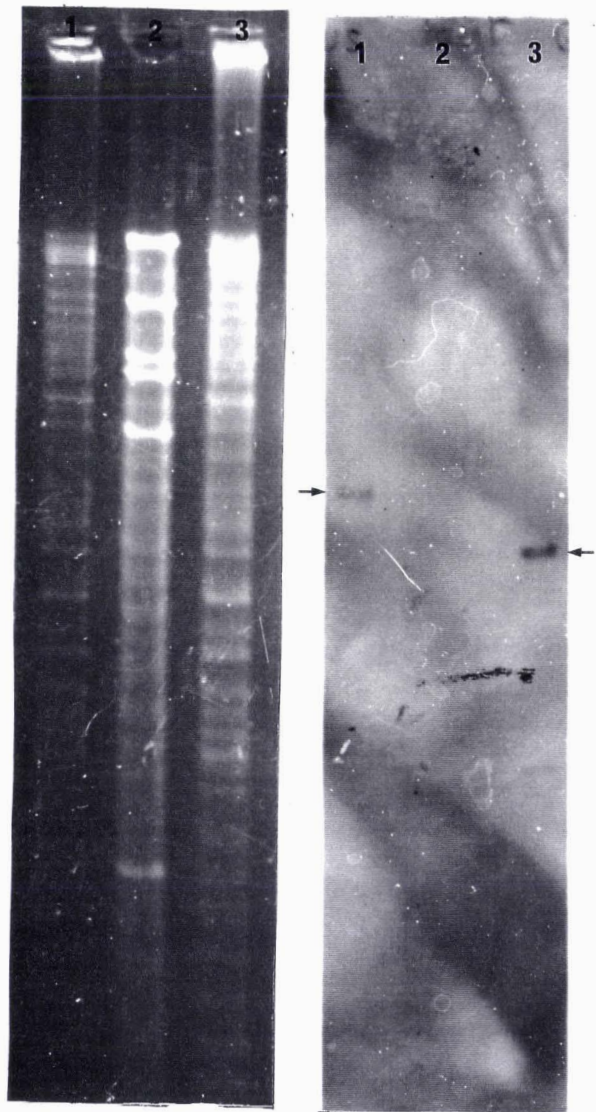


Figure 2.16 : A : Profils de restriction d'ADN plasmidique des mutants d'*Alcaligenes paradoxus* [2,4-D⁻] présentant une insertion du transposon Tn5.

B : Hybridation à l'aide d'une sonde Tn5.

canaux 1 : pTV1::Tn5/*Eco*RI (mutant 1)
 2 : pJP4/*Eco*RI
 3 : pTV1::Tn5/*Eco*RI (mutant 2)

2,4-D apparaissent alors sur ce milieu sous forme de colonies blanches contrairement aux bactéries dégradantes qui forment sur la gélose des colonies de couleur pourpre. Le résultat de la conjugaison de *E. coli* S17.1 pSUP 2021::Tn5 X *A. paradoxus* TV1 était alors directement étalé sur des boîtes de milieu de Loos modifié contenant de la kanamycine et de la streptomycine. Le gène conférant la résistance à ce dernier antibiotique est porté sur le transposon Tn5 mais n'est pas exprimé chez *E. coli* (Mazodier *et al.*, 1986). Elle s'exprime cependant chez plusieurs bactéries gram négatives (Selvaraj et Iyer, 1984).

3.3.3 Résultats

Plusieurs souches présentant le phénotype [Km^R, 2,4-D⁻] ont ainsi été sélectionnées. L'hybridation à l'aide de la sonde Tn5 sur leurs profils de restriction plasmidique obtenus après digestion à l'aide de l'enzyme de restriction *EcoRI* a révélé l'existence chez deux d'entre-elles d'un fragment hybridant avec Tn5. Celui-ci était cependant différent et plus petit que le fragment hybridant avec les gènes de dégradation du 2,4-D portés par pJP4 (figure 2.16). Compte-tenu de l'absence de sites de restriction *EcoRI* à l'intérieur du transposon Tn5, il était probable qu'un autre gène impliqué dans la dégradation du 2,4-D était porté par ce fragment de pTV1. Cette hypothèse demande que des vérifications ultérieures soient effectuées.

3.4 Clonage du fragment *EcoRI* de pTV1 hybridant avec pJP4 dans un vecteur d'*E. coli*.

3.4.1 objectifs

L'autre façon de démontrer la présence des gènes de dégradation d'*A. paradoxus* sur son plasmide pTV1 était de cloner le fragment de pTV1 homologue à pJP4 dans un plasmide vecteur, d'introduire alors celui-ci dans une souche bactérienne par transformation et de relier la présence de l'insert à l'acquisition de la capacité à dégrader le 2,4-D par la souche transformée. Nous nous sommes donc efforcés de développer cette approche. La démarche la plus simple consistait à purifier le fragment *EcoRI* de 11,3 kb de pTV1 homologue à pJP4, de l'amplifier dans *E. coli*, et d'en étudier éventuellement l'expression chez

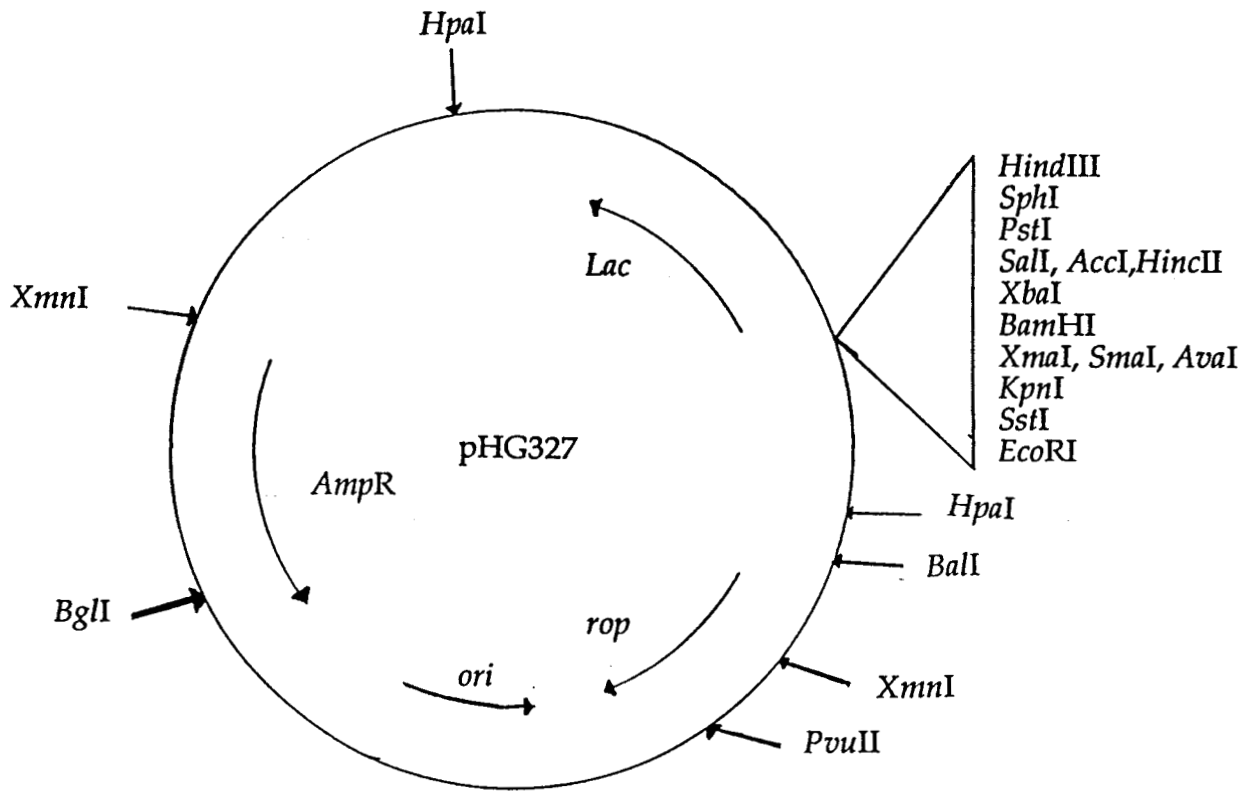


Figure 2.17 : Carte du vecteur pHG327 (d'après Stewart *et al.*, 1986).

cette souche. Chaudhry et Huang (1986) ont en effet rapporté que des fragments de plasmide isolés d'une souche de *Flavobacterium* portant des gènes de dégradation du 2,4-D pouvaient être exprimés chez *E. coli*. Nous avons donc tenté de suivre la démarche de ces auteurs.

Nous devons prendre en considération la diminution de l'efficacité de transformation des cellules d'*E. coli* avec la taille croissante des plasmides ainsi que la possibilité d'un effet toxique des produits des gènes clonés. Aussi, malgré l'éventualité de la non-expression du fragment cloné chez *E. coli* et celle de la nécessité d'une deuxième étape de clonage dans un plasmide à large spectre d'hôte, le vecteur pHG327 (Stewart *et al.*, 1986, figure 2.17) a été choisi pour cette expérience, de par sa taille restreinte (3,4 kb) et de par son système de régulation de l'expression des gènes clonés. Le plasmide pHG327 nous offrait en effet l'avantage d'une taille peu importante par comparaison à celle de la plupart des plasmides à large spectre d'hôte et de la présence d'un système de régulation en amont du promoteur *lac* permettant d'exprimer ou non les gènes clonés en ajoutant ou pas de l'IPTG au milieu de culture.

3.4.2 Matériel et méthodes

Le fragment *EcoRI* de pTV1 responsable de l'hybridation avec pJP4 a été isolé par électroélution puis introduit selon le protocole de ligation exposé en annexes (fiche technique 3), au niveau du site *EcoRI* du plasmide pHG327 d'*E. coli* (Steward, 1986) portant un gène de résistance à l'ampicilline. Le site *EcoRI* de ce plasmide étant situé au milieu d'un gène *lac* α , des cellules compétentes de la souche [*lac*⁻] d'*E. coli* JM107 (Yanish-Perron *et al.*, 1985) ont été transformées par le plasmide recombiné portant l'insert. Le milieu LB XGal + ampicilline puis le milieu de Mc Conkey (Difco) + ampicilline (fiche technique 1) ont été utilisés pour la sélection des cellules transformées (figure 2.18). Les transformants [*lac*⁻ Amp^R] ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose et une hybridation sur colonie a été réalisée avec la sonde marquée portant les gènes de dégradation de pJP4 (pD10). Compte-tenu de l'absence de résultats concluants par cette méthode de criblage, des extractions d'ADN plasmidique par la technique de Holmes et Quigley (1981) (fiche technique 9) ont été réalisées sur l'ensemble des transformants obtenus. Les plasmides extraits ont subi une digestion par l'enzyme de restriction *EcoRI*. Une migration sur gel d'agarose des plasmides digérés a alors été effectuée.

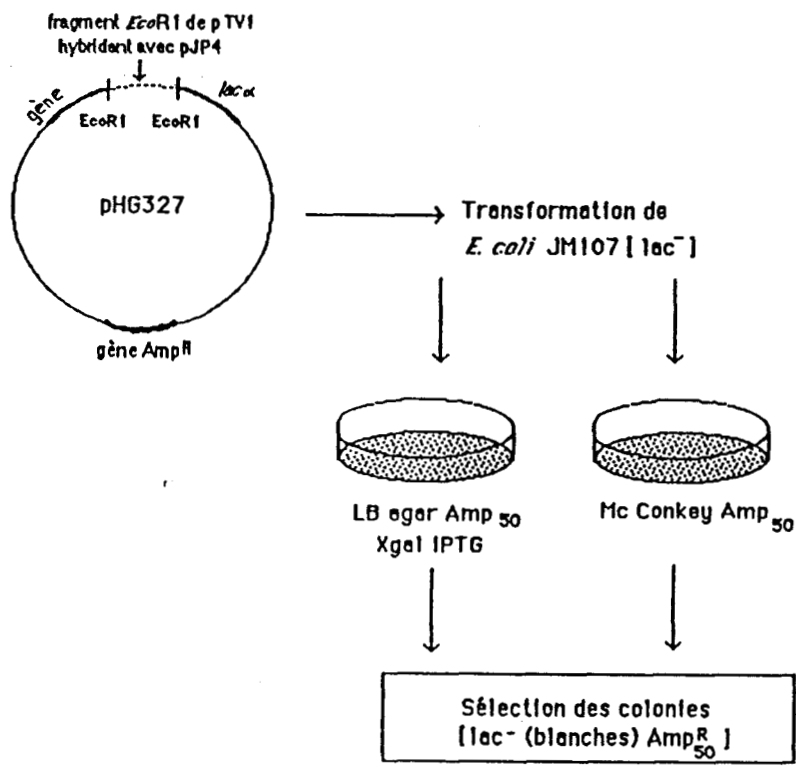


Figure 2.18 : Principe du clonage du fragment de pTV1 homologue à pJP4 dans le vecteur pHG327 et milieux de sélection des transformants.

L'étude de l'expression des gènes clonés a été réalisée en ensemençant deux fioles contenant respectivement 50 ml de milieu 2,4-D liquide et 50 ml de ce même milieu (fiche technique 1) auquel avait été ajouté 20 μ l d'une solution d'IPTG à 24 mg ml⁻¹ et en suivant l'évolution de la densité optique. D'autre part, les résultats étaient confirmés en utilisant le dispositif de culture de micro-organismes en présence de 2,4-D marqué au ¹⁴C décrit dans le premier chapitre de cette thèse, et en suivant les cinétiques de dégagement de ¹⁴CO₂

3.4.3 Résultats-Discussion

L'ensemble des étapes décrites nous a permis de mettre en évidence un clone bactérien portant le fragment *Eco*RI de pTV1 hybridant avec pJP4 (sur 396 bactéries présentant le phénotype [Amp^R, lac⁻] (figure 2.19). Nous avons cherché à expliquer ces résultats

La présence d'IPTG dans le milieu initialement choisi pour la sélection des transconjugants annihilait l'effet du gène de régulation situé en amont du promoteur du gène *lac*. L'expression des gènes clonés devenait alors constitutive en présence de cet inducteur au même titre que l'expression de *lac* α . Ainsi, si le produit des gènes d'*A. paradoxus* TV1 clonés s'avérait toxique pour *E. coli*, les seules colonies possédant le phénotype [lac⁻ Amp^R] isolées sur milieu Xgal IPTG + Ampicilline seraient celles formées par des cellules de *E. coli* ayant été transformées par des multimères du plasmide pHG327 obtenus en dépit de la déphosphorylation du vecteur destinée normalement à empêcher la recircularisation et la formation de multimères. Le seul transformant positif obtenu présentant sur son profil plasmidique, obtenu après digestion par l'enzyme de restriction *Eco*RI, deux bandes distinctes correspondant respectivement à l'insert et au vecteur (figure 2.20), formait des colonies de taille réduite sur milieu Xgal IPTG + Ampicilline. Cette petite taille des colonies du clone transformant suggérait l'existence d'un phénomène de toxicité liée aux gènes clonés.

Le nouveau plasmide ainsi obtenu a été nommé pTV2.

L'étude de l'expression chez *E. coli* des gènes clonés a conduit à des résultats négatifs, aussi bien en présence qu'en absence d'IPTG. Le comportement d'*E. coli* sur les milieux minimaux à base de 2,4-D ne signifiait cependant pas que les gènes de dégradation du 2,4-D étaient absents du fragment cloné. Les résultats observés pouvaient aussi bien être la conséquence d'une toxicité des gènes clonés pour *E. coli* que d'une non-reconnaissance des

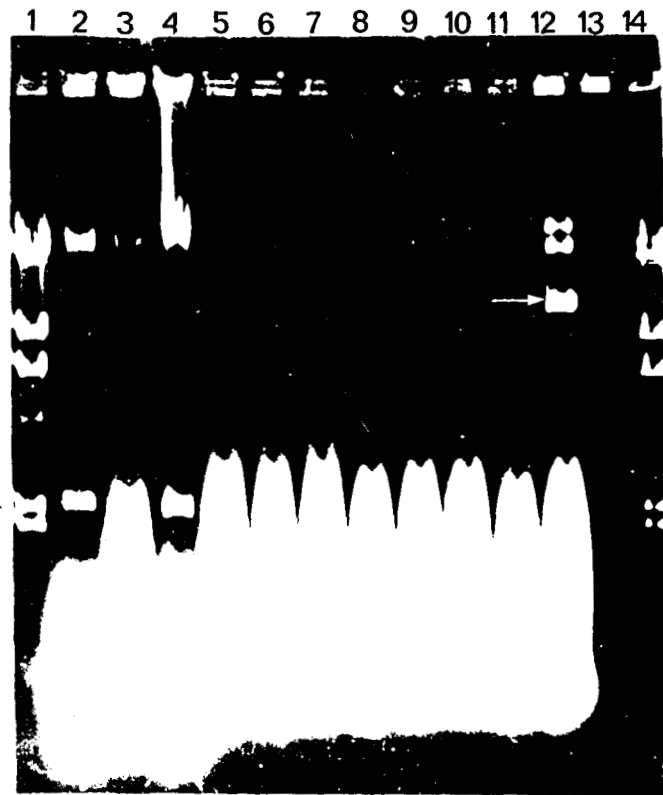


Figure 2.19 : Plasmides issus des clones transformants *E. coli* JMP107 [Amp^R, Lac⁻]. La flèche indique la présence du plasmide pTV2 (canal 12).

signaux de transcription ou de traduction. Ils pouvaient également être dûs à l'absence d'une partie des gènes nécessaires à la dégradation de la molécule de pesticide sur le fragment cloné, ou d'une instabilité de celui-ci dans le vecteur utilisé. En particulier, l'éventualité de la présence, sur le chromosome d'*A. paradoxus* TV1, de gènes impliqués dans la dégradation du 2,4-D ne pouvait être exclue. Afin de tester ces différentes hypothèses, il nous était nécessaire de cloner le fragment *EcoRI* de pTV1 supposé porter tout ou une partie des gènes de dégradation du 2,4-D d'*A. paradoxus* TV1 dans un vecteur à large spectre d'hôte et d'étudier son expression chez une non-entérobactérie.

Compte-tenu du rendement moyen de l'étape d'extraction plasmidique sur gradient de saccharose (par rapport à un gradient de césium), de la taille importante du plasmide pTV1 et du grand nombre de bandes générées par une digestion à l'aide de l'enzyme de restriction *EcoRI*, l'étape limitante d'un clonage se trouvait être la purification d'une quantité suffisante du fragment *EcoRI* "H" de pTV1 recherché. Aussi, même en l'absence d'expression des fragments clonés chez *E. coli* ces premières expérimentations nous ont permis d'amplifier le fragment recherché avant son clonage dans un vecteur à large spectre d'hôte pour lequel un bon rendement de transformation, compte-tenu de leur taille plus importante, demandait la présence d'une quantité plus importante de matériel.

3.5 Clonage du fragment *EcoRI* de pTV1 hybridant avec pJP4 dans un vecteur à large spectre d'hôte.

3.5.1 objectifs et possibilités de réalisation

Il était donc nécessaire de cloner le fragment de pTV1 hybridant avec pJP4 dans un vecteur à large spectre d'hôte avant de l'introduire chez une non-entérobactérie afin d'y étudier son expression. Le cosmide pLAFR3 a été choisi pour cette étape. Celui-ci comportait un site pour l'enzyme de restriction *EcoRI* à l'intérieur d'un gène *lac* α ainsi qu'un gène de résistance à la tétracycline permettant la sélection des clones transformés par ce vecteur.

En l'absence d'une souche d'*A. paradoxus* TV1 guérie de son plasmide, la souche receveuse la plus adéquate nous a semblé être la souche d'*A. eutrophus* JMP222, tout d'abord parce qu'elle possède un contexte chromosomique favorable à la dégradation du 2,4-D et que d'autre part, elle appartenait à une espèce voisine. Plusieurs possibilités d'introduction du fragment cloné nous

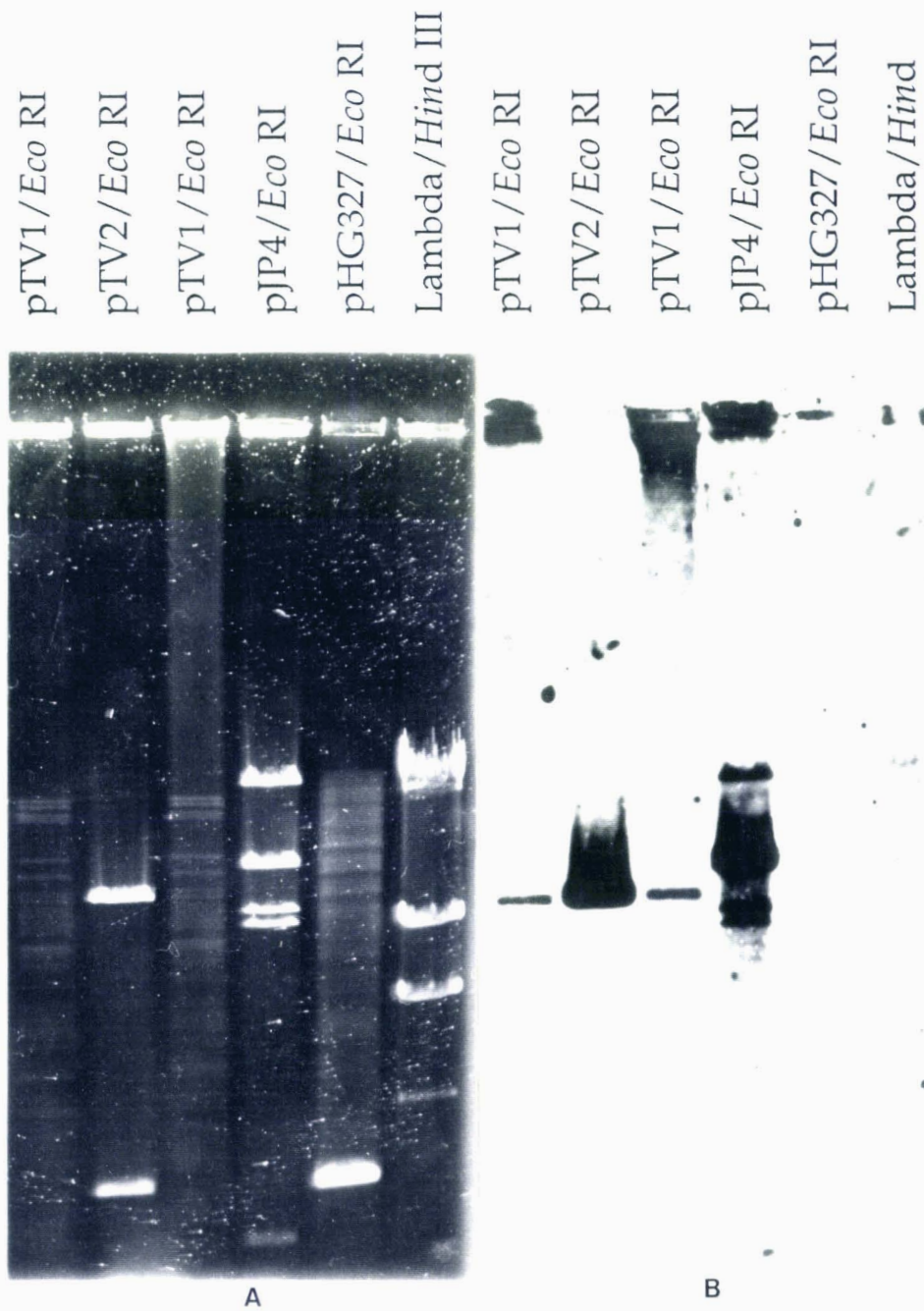


Figure 2.20 : Clonage du fragment *Eco*RI du plasmide pTV1 d'*Alcaligenes paradoxus* homologue à pJP4 dans le vecteur d'*E. coli* pHG327 pour former le plasmide pTV2.
 A : profils de restriction après digestion par l'enzyme *Eco*RI de pTV1 (canaux 1, 3), de pTV2 (canal 2), de pJP4 (canal 4), de pHG327 (canal 5). en canal 6 nous avons déposé le marqueur de migration (phage lambda/HindIII).
 B : Hybridation du profil précédent à l'aide de la sonde *tfdA*.

étaient offertes. Il nous était possible de tenter une transformation directe d'*A. eutrophus* JMP222 ou d'introduire le nouveau plasmide par conjugaison à partir d'une souche d'*E. coli* transformée. De nombreuses données bibliographiques étaient disponibles concernant la transformation de souches d'*E. coli* mais aussi de souches de *Pseudomonas*. Cependant, aucune tentative de transformation de cellules compétentes d'*Alcaligenes* ne semblait encore avoir été effectuée. Les difficultés rencontrées au cours du premier clonage semblaient résulter d'une toxicité liée aux gènes clonés à l'intérieur de la souche réceptrice d'*E. coli*. Nous avons, dans un premier temps, choisi la transformation directe de cellules d'*Alcaligenes eutrophus* JMP222.

Une autre solution consistait à purifier, à partir du plasmide pHG327, l'ensemble du gène *lac* α et des gènes de régulation de son expression, encadrés sur ce plasmide par deux sites de restriction pour l'enzyme *Hpa*I puis à transporter la cassette dans un autre vecteur à large spectre d'hôte dépourvu de gène *lac*, mais possédant un site de restriction pour *Hpa*I. Le fragment de pTV1 isolé pouvait alors être cloné au site *Eco*RI de la cassette. Il était théoriquement possible, dans la mesure où le fragment cloné à partir de pTV1 était dépourvu de sites de restriction pour l'enzyme *Hpa*I, de réaliser ce clonage en une seule étape. Le plasmide pKT231 vérifiait les propriétés requises. Des cellules d'*E. coli* pouvaient alors être utilisées pour la transformation en utilisant un milieu de type Mac Conkey pour la sélection des clones transformants. Le nouveau vecteur pouvait alors être transféré dans des cellules d'*Alcaligenes eutrophus* JMP222 par conjugaison. Ce protocole nécessitait une étape de ligation de bouts francs d'ADN et un mauvais rendement de ligation était prévisible.

Une troisième possibilité consistait à transformer directement des souches compétentes d'*E. coli* par le cosmide pLAFR3 dans lequel le fragment isolé de pTV1 avait été cloné et de vérifier ainsi que les résultats obtenus lors du premier clonage étaient bien dus à une toxicité des gènes clonés pour *E. coli* et non à un problème lié au vecteur ou à la stratégie expérimentale initialement choisie.

Ces trois démarches ont été abordées simultanément.

3.5.2 Matériel et méthodes

Deux vecteurs à large spectre d'hôte ont été utilisés, le cosmide pLAFR3 et le plasmide pKT231 (figure 2.21). Ces vecteurs ont été extraits par lyse

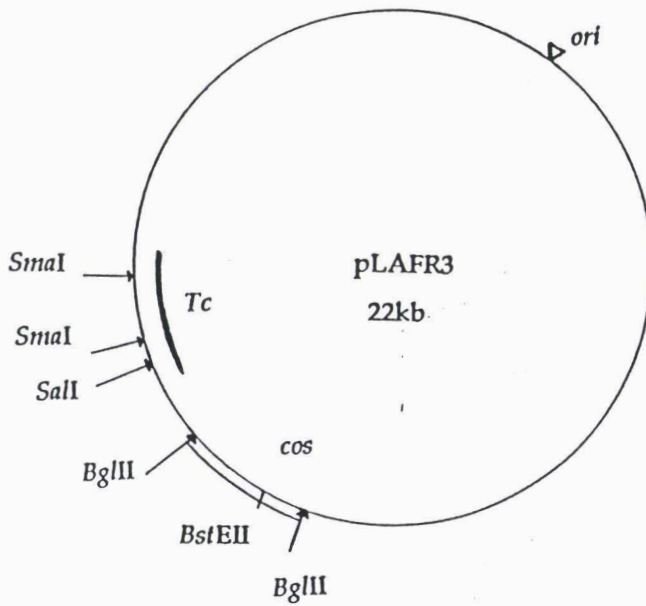
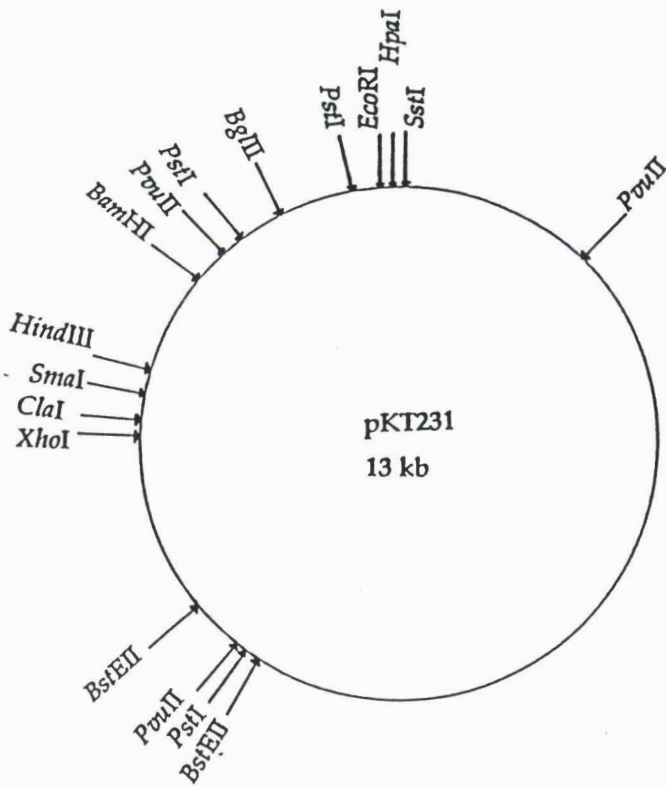


Figure 2.21 : Carte des vecteurs à large spectre d'hôte pKT231 (d'après Bagdasarian et al., 1981) et pLAFR3 (d'après Staskawicz et al., 1987).

alcaline et purifiés sur gradient en chlorure de césium (fiche technique 5) à partir respectivement des souches 803 et JM107 d'*E. coli*.

-Transformation directe de *A. eutrophus*. JMP222

Des cellules d'*A. eutrophus* JMP222 rendues compétentes par la méthode de Dagert et Ehrlich (1979, fiche technique 13), ont été utilisées pour la transformation par le vecteur pLAFR3 seul afin de tester l'efficacité de la transformation directe. Les clones transformants ont été sélectionnés sur milieu LB + Tétracycline.

-Obtention de transformants *E. coli* JM107 pLAFR3::I et *E. coli* JM107 pKT231 : I.

Dans un premier temps, le segment de pTV1 homologue à pJP4 a été purifié après digestion à l'aide de l'enzyme de restriction *EcoRI* du plasmide pTV2 purifié sur gradient de chlorure de césium à partir du transformant *E. coli* JM107, pTV2. Nous avons alors réalisé une ligation entre ce fragment purifié et le cosmide pLAFR3 digéré par *EcoRI* et déphosphorylé à ses extrémités.

Des cellules compétentes de la souche JM107 d'*E. coli* ont été transformées par le mélange de post-ligation obtenu. La sélection des clones transformants a été réalisée sur milieu LB-agar Xgal IPTG (fiche technique 1) + tétracycline.

Dans un second temps, le plasmide pTV2 a été soumis à une digestion par l'enzyme de restriction *Hpa* I. Des deux fragments libérés par l'enzyme, celui correspondant à la cassette portant le gène *lac* α (incluant les gènes clonés à partir de pTV1), ainsi que le gène de régulation a été inséré au site *Hpa* I du vecteur à large spectre d'hôte pKT231 préalablement déphosphorylé. Nous avons utilisé pour cette ligation le protocole décrit par Sambrook *et al.* (1987) pour la ligation d'ADN présentant des bouts francs (fiche technique 12). Des cellules d'*E. coli* JM107 rendues compétentes par la méthode précédemment citée ont été transformées par le mélange de post ligation obtenu. Les clones transformés ont alors été sélectionnés sur milieu LB + kanamycine + streptomycine.

L'ensemble des clones transformants obtenus à partir des deux mélanges de post ligation ont été repiqués sur des membranes de nitrocellulose. Ces dernières étaient alors soumises à une hybridation. Le fragment de pTV1 homologue à pJP4 purifié à partir de pTV2 a été utilisé comme sonde. Le marquage a été réalisé à l'aide du kit Boehringer (fiche technique 18). Des cellules de témoins négatifs appartenant aux deux clones (*E. coli* JM107, pLAFR3 et *E. coli* JM107, pKT231 respectivement) ainsi que des cellules d' *E. coli* JM107, pTV2 choisi comme témoin positif étaient également déposées sur les

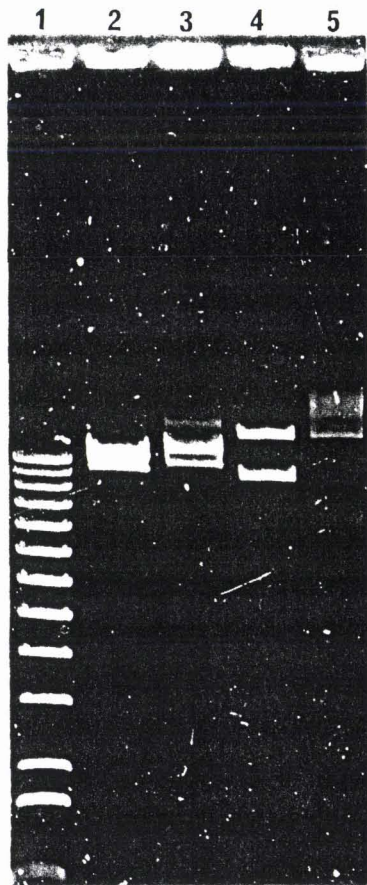


Figure 2.22 : Clonage du fragment *EcoRI* du plasmide pTV1 d'*Alcaligenes paradoxus* homologue à pJP4 dans le vecteur pLAFR3 pour former le plasmide pTV3 et dans le vecteur pKT231 pour former le plasmide pTV4.

- canaux
- 1 : marqueur de migration 1 kb.
 - 2 : mélange de pré-ligation (pKT231/*HpaI* + fragment *HpaI* de pHG327 contenant le fragment de pTV1 homologue à pJP4).
 - 3 : mélange de post-ligation correspondant.
 - 4 : mélange de pré-ligation (pLAFR3/*EcoRI* + fragment *EcoRI* de pHG327 contenant le fragment de pTV1 homologue à pJP4).
 - 5 : mélange de post-ligation correspondant.

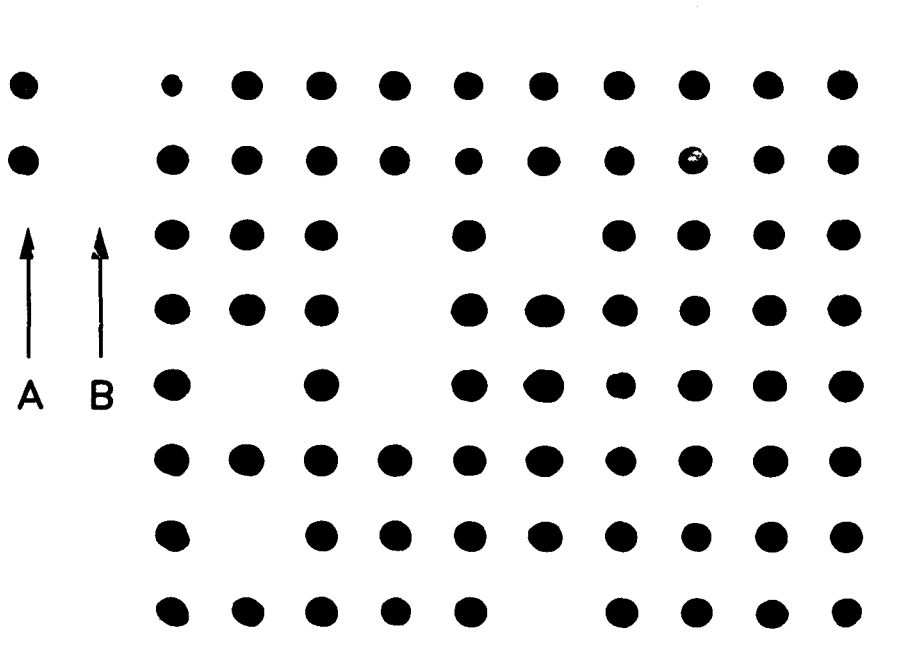


Figure 2.23 : Hybridation sur colonies des clones d'*E. coli* JMP107 [Tc^R , Lac⁻] transformés par le plasmide pTV3 (sonde fragment *Eco*RI de pTV1 homologue à pJP4). Les témoins négatif (B) et positif (A) respectivement utilisés, sont formés des souches *E. coli* JMP107 pLAFR3 et *E. coli* JMP107 pTV1.

membranes. Les clones recherchés étaient alors ceux qui portaient le fragment homologue à la sonde. Les ADN plasmidiques de ces clones ont été extraits par la méthode de Holmes et Quigley (1981). Une hybridation était alors réalisée à l'aide de la même sonde sur les profils de restriction de ces plasmides par l'enzyme de restriction *EcoRI*.

3.5.3 Résultats

La transformation directe des cellules d'*A. eutrophus* JMP222 n'a pas fourni de résultats concluants. Les méthodes utilisées pour l'obtention de cellules compétentes et la transformation avaient été adaptées à partir de méthodes de transformation propres à *E. coli*. Une électroporation aurait pu être tentée. Cependant, compte-tenu de l'absence de données bibliographiques sur la transformation des souches d'*Alcaligenes*, cette démarche a été abandonnée.

Les deux nouveaux plasmides obtenus par ligation de l'insert de pTV1 supposé porter les gènes de dégradation d'*A. paradoxus* aux deux vecteurs à large spectre d'hôte pLAFR3 et pKT231 ont respectivement reçu les dénominations pTV3 et pTV4 (figure 2.22).

L'obtention, à partir de la transformation par le second mélange de ligation, d'un grand nombre de clones transformants d'*E. coli* JM107 hybridant avec le fragment de pTV1 isolé lors de l'étape précédente et utilisé ici comme sonde (figure 2.23) suggérait que les difficultés rencontrées lors du précédent clonage ne provenaient pas de la cause invoquée (toxicité du fragment cloné). Les profils de restriction par l'enzyme *EcoRI* des plasmides isolés à partir de quelques uns de ces clones ont confirmé la présence du fragment recherché (figure 2.24). Ainsi, nous avons rejeté l'hypothèse de la toxicité des gènes clonés pour la souche réceptrice d'*E. coli*. Bien que le clonage de gènes provenant d'espèces bactériennes très éloignées de la souche réceptrice peut, dans certains cas conduire à la mort des cellules transformées (Stewart *et al.*, 1986), cette interprétation ne peut être appliquée aux résultats de notre premier clonage. Les résultats observés pourraient être la conséquence d'une instabilité du fragment isolé de pTV1 lorsque celui-ci est cloné dans le plasmide pHG327. L'explication du phénomène demanderait cependant des études plus approfondies sortant du cadre de cette étude.

Compte-tenu de ces résultats, nous avons poursuivi notre travail à partir du matériel biologique constitué par l'un des transformants *E. coli* JM107 pTV3. Notre but était alors d'étudier l'expression des gènes portés par le fragment

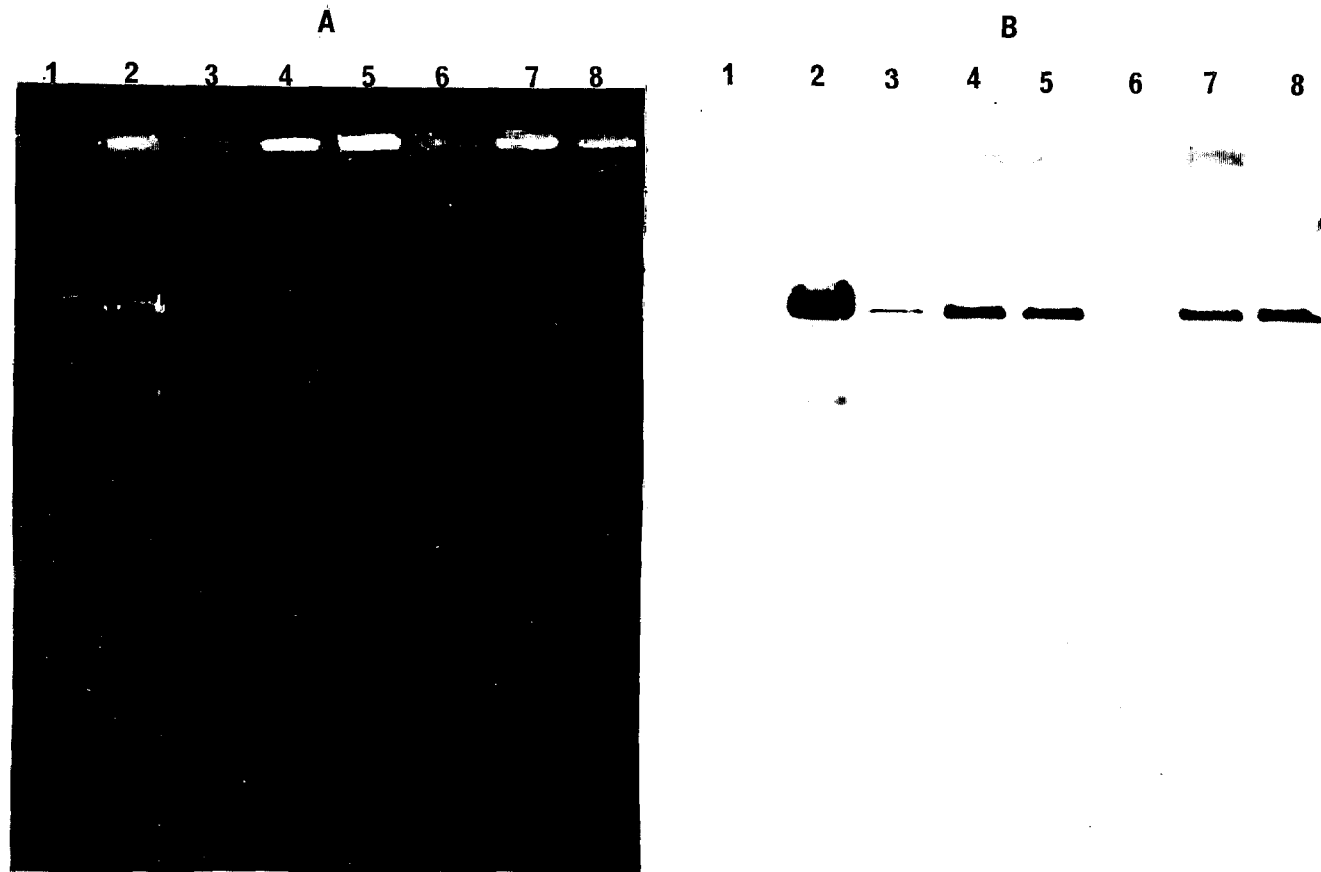


Figure 2.24 :

A : Profils de restriction après digestion à l'aide de l'enzyme *EcoRI* des plasmides isolés des clones d'*E. coli* JMP107 [Tc^R , Lac^-].

B : Profils d'hybridation à l'aide de la sonde formée par le fragment de pTV1 homologue à pJP4

a : vecteur (pLAFR3)

b : insert

c : pHG327

canaux 1 : pLAFR3

2 : pTV1/*EcoRI*

3 à 8 : pTV3/*EcoRI*

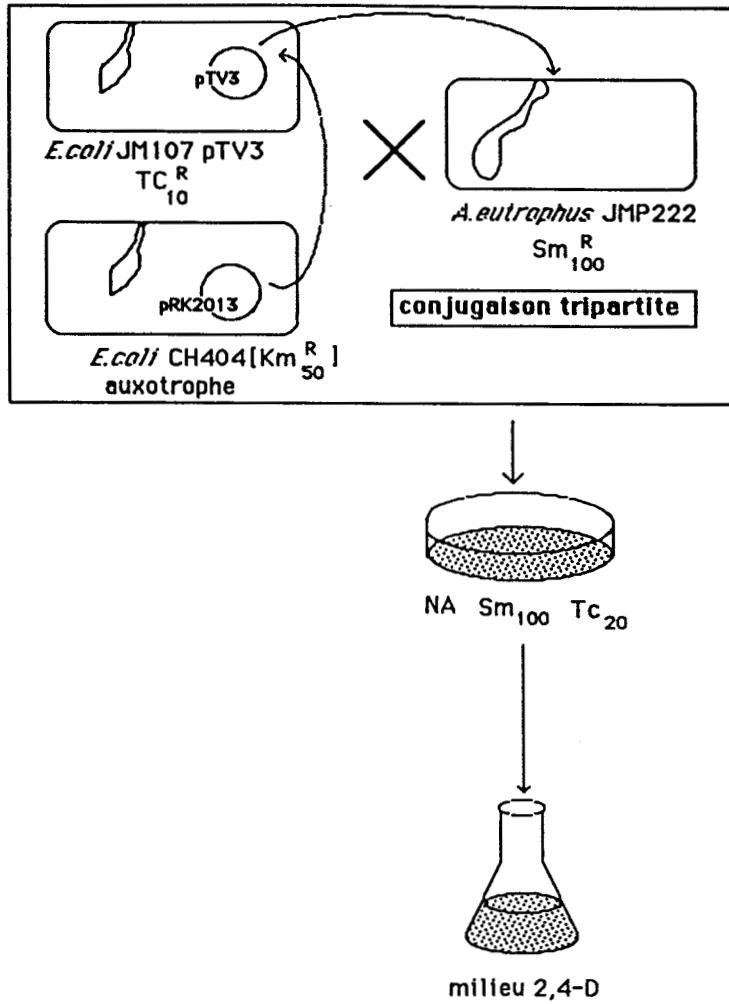


Figure 2.25 : Principe utilisé pour l'obtention d'*Alcaligenes eutrophus* JMP222 pTV3.

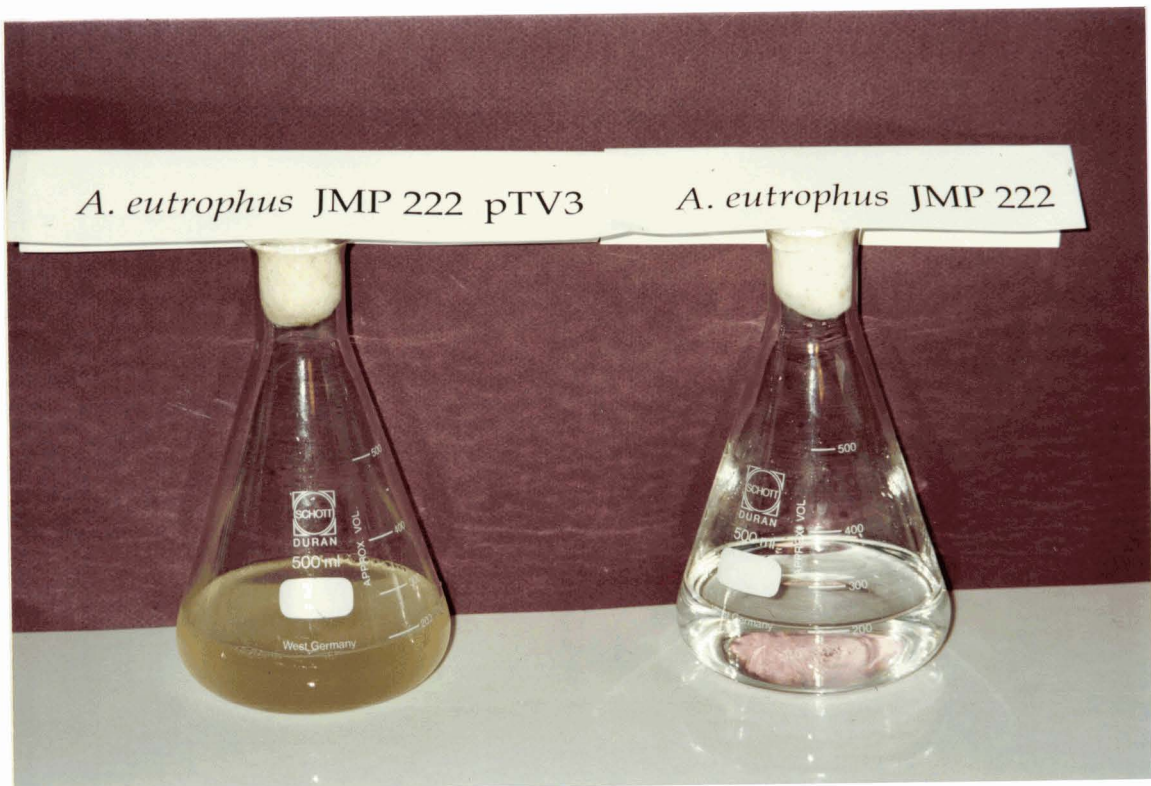


Figure 2.27C : Ensemencement des souches *A. eutrophus* JMP222 et *A. eutrophus* JMP222 pTV3 sur un milieu où le 2,4-D constitue la seule source de carbone.

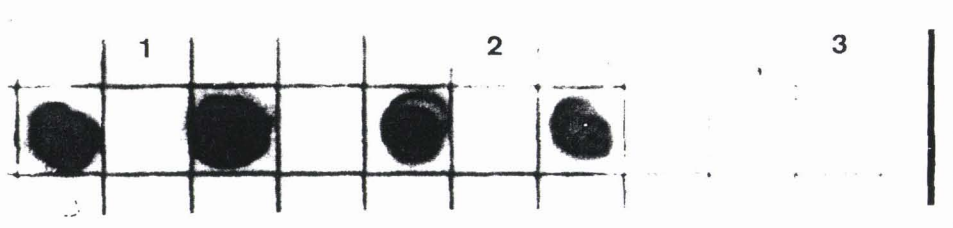


Figure 2.26 : Mise en évidence d'un transconjugant *Alcaligenes eutrophus* JMP222 pTV3 par hybridation de colonies sur membrane (sonde fragment de pTV1 homologue à pJP4).

- canaux 1 : *Alcaligenes paradoxus* TV1
2 : *Alcaligenes eutrophus* JMP222 pTV3
3 : *Alcaligenes eutrophus* JMP222 (témoin négatif)

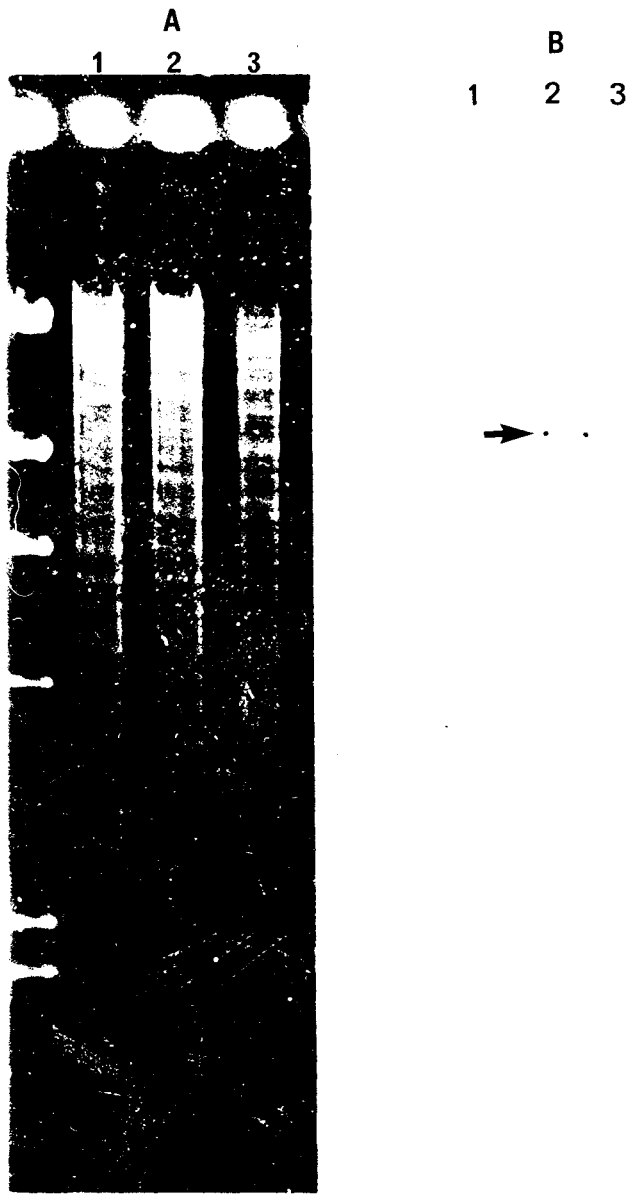


Figure 2.27 : A : Profils de restriction de l'ADN total isolé des souches d'*Alcaligenes eutrophus* JMP222 [2,4-D⁻] (canal 1) et JMP222 [2,4-D⁺] ayant reçu le plasmide pTV3 par conjugaison (canal 2), *Pseudomonas aureofaciens* [2,4-D⁻] utilisée comme souche témoin (canal 3).

B : Profils d'hybridation à l'aide de la sonde formée par le fragment de pTV1 homologue à pJP4. La flèche indique la présence de pTV3.

cloné du plasmide pTV1 afin de vérifier la présence des gènes de dégradation du 2,4-D sur ce fragment.

3.6 Transfert de pTV3 (vecteur à large spectre d'hôte pLAFR3 portant le fragment cloné de pTV1 homologue à pJP4) chez *A. eutrophus* JMP222 et étude de l'expression des gènes clonés

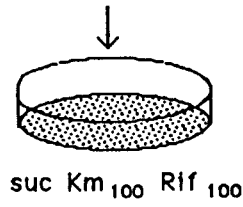
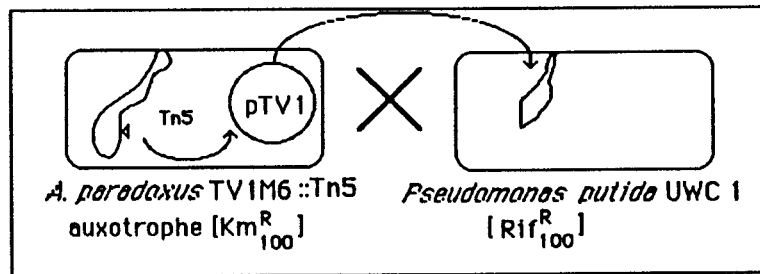
3.6.1 matériel et méthodes

Une conjugaison triparentale a été réalisée entre l'un des clones transformants de la souche JM107 d'*E. coli* portant pTV3 utilisée comme donneuse, la souche CH404 d'*E. coli* porteuse du plasmide helper pRK2013 et la souche d'*Alcaligenes eutrophus* JMP222 utilisée comme receveuse selon la méthode de Chaudhry et Huang (1988, fiche technique 14) (figure 2.25). La sélection des transconjugants a été réalisée sur milieu Nutrient Agar + streptomycine + tétracycline. La vérification de la présence de pTV3 chez les clones transformants a été réalisée par hybridation de colonies sur membrane (fiche technique 15) en utilisant comme sonde, le fragment de pTV1 homologue à pJP4 précédemment purifié à partir de pTV2. Des extractions d'ADN total ont également été réalisées à partir de la souche JMP222 d'*A. eutrophus* mère et d'un clone transformant. Des profils de digestion par l'enzyme de restriction *EcoRI* de ces deux ADN ont alors été réalisés .

Le protocole utilisé pour l'étude de l'expression des gènes clonés chez *A. eutrophus* JMP222 est le premier que nous avons exposé au chapitre 3.4.2

3.6.2 Résultats

L'ensemble de ces étapes nous a permis de sélectionner un clone d'*A. eutrophus* JMP222 portant pTV3 (figure 2.26 et 2.27 B). Nous avons pu vérifier l'identité des profils d'ADN obtenus à partir de la souche mère d'*A. eutrophus* JMP222 et du clone transformant (figure 2.27 A) ainsi que la présence, au sein de ce clone, du fragment *EcoRI*"H" de pTV1 (figure 2.27B). En effet, l'utilisation en tant que sonde, du fragment *EcoRI* "H" de pTV1 lors d'une hybridation sur ADN total extrait des souches *A. eutrophus* JMP222 et *A. eutrophus* JMP222 [Tc^R] (issue de la conjugaison entre *E. coli* JM107 pTV3 et *A. eutrophus* JMP222), révèle



Aucune Colonie

Le transposon peut-il sauter du chromosome sur le plasmide?

pTV1 possède-t-il des gènes *mab* et *tra* fonctionnels?

Le plasmide est-il conjugatif mais à spectre d'hôte étroit?

Figure 2.28 : Principe utilisé pour vérifier la transmissibilité de pTV1.

la présence d'un fragment homologue à *EcoRI* "H" au sein du clone transformant dont la taille correspond à celle du fragment recherché. Cette observation démontre la présence du plasmide pTV3 au sein du clone d'*A. eutrophus* JMP222 [Tc^R] sélectionné. Nous avons alors pu vérifier que la présence de pTV3 chez *A. eutrophus* restaurait la capacité de cette souche à croître sur 2,4-D comme seule source de carbone. En effet, la mise en culture de ce clone sur un milieu où le 2,4-D constitue la seule source de carbone disponible entraîne l'apparition d'un trouble au bout de 8 jours d'incubation alors que le milieuensemé par la souche *A. eutrophus* JMP222 reste transparent dans les mêmes conditions de culture (figure 2.27 C). L'ensemble de ces résultats nous a donc permis de montrer que l'introduction du fragment *EcoRI* "H" de pTV1 chez la souche non dégradante *A. eutrophus* JMP222 était responsable de l'acquisition par cette souche des capacités à dégrader le 2,4-D. Le fragment *EcoRI* "H" isolé à partir du plasmide pTV1 d'*A. paradoxus* porte donc des gènes impliqués dans la dégradation du 2,4-D. Ces résultats nous permettent donc de conclure à la localisation plasmidique des gènes de dégradation du 2,4-D chez *A. paradoxus* TV1, tout au moins des gènes impliqués dans les premières étapes de la dégradation de cette molécule c'est à dire, selon le schéma proposé pour *A. eutrophus*, les gènes permettant la transformation du 2,4-D en acide chloromaléylacétique, le reste des étapes étant codées par le chromosome chez cette souche. En effet, les gènes portés par le fragment *EcoRI* "H" de pTV1 complètent ceux portés par la souche *A. eutrophus* JMP222 dépourvue de plasmide.

4- TRANSMISSIBILITÉ ET SPECTRE D'HOTE DE PTV1

4.1 Objectifs généraux et principes de l'expérimentation

Dans le but de vérifier la transmissibilité de pTV1 vers différentes souches réceptrices, il était plus aisé de tester l'aptitude d'*A. paradoxus* TV1 à transmettre, *via* son plasmide, un gène de résistance porté par un transposon préalablement inséré au niveau de ce plasmide plutôt que de chercher à sélectionner le transfert des capacités à dégrader le 2,4-D qui pourraient ne pas s'exprimer. En effet, la transmissibilité du caractère "capacité à dégrader le 2,4-D" s'avérait ne pas être un bon critère de sélection pour suivre le passage du plasmide pTV1 d'*A. paradoxus* TV1 vers une souche receveuse quelconque. Il est possible en effet qu'à l'image d'*A. eutrophus* JMP134, certains gènes impliqués

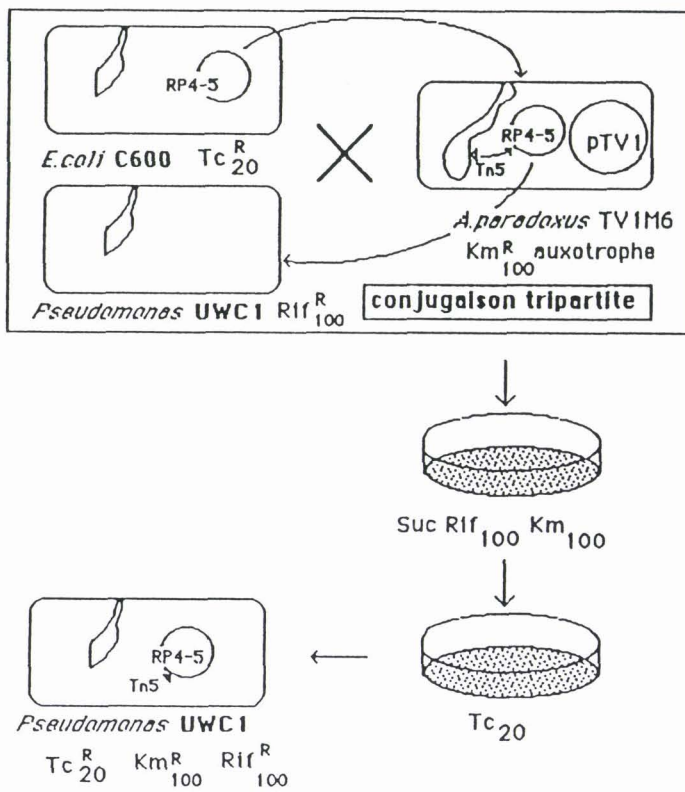


Figure 2.29 : Vérification de la mobilité du transposon Tn5 inséré dans le chromosome du mutant auxotrophe *Alcaligenes paradoxus* TV1M6.

dans la dégradation du 2,4-D soient codés par le chromosome d'*A. paradoxus* TV1 et donc absent de la souche receveuse. Ce fait conditionne l'impossibilité de sélectionner des transconjugants ayant acquis les propriétés dégradantes. L'utilisation du transposon Tn5 était un moyen d'obtenir un plasmide pTV1::Tn5 porteur de plusieurs gènes de résistance à des antibiotiques (la kanamycine, la streptomycine et la néomycine-bléomycine) dont on peut aisément vérifier la transmissibilité lors de conjugaisons avec des souches receveuses dépourvues de ces gènes de résistance. Le spectre d'hôte pouvait ainsi être déterminé par conjugaisons successives avec différentes espèces de bactéries receveuses.

4.2 Première expérience

4.2.1 Matériel et méthodes

La transmissibilité du plasmide a été étudiée à l'aide du mutant auxotrophe d'*A. paradoxus*::Tn5 pTV1 (TVM6). Nous ne disposions pas, au moment de cette étude, des mutants présentant une insertion plasmidique du transposon Tn5.

Afin d'évaluer le spectre d'hôte de pTV1, nous avons tout d'abord cherché à savoir si ce plasmide était transmissible vers des bactéries d'espèce et de genre voisins. Deux croisements ont donc été réalisés entre le mutant auxotrophe de la souche *A. paradoxus*::Tn5 pTV1 (TV1M6) utilisée comme donneuse et les souches receveuses *P. putida* UWC1 résistante à la rifampicine (Mc Clure *et al.*, 1989), et *A. eutrophus* JMP222 guérie de son plasmide et résistante à la streptomycine (Don *et al.*, 1985) (figure 2.28). La souche auxotrophe d'*A. paradoxus*::Tn5 a été utilisée comme souche donneuse en s'appuyant sur l'hypothèse que le transposon pouvait sauter du chromosome sur pTV1 auquel cas les souches de *P. putida* UWC1 et d'*A. eutrophus* JMP222 ayant reçu le plasmide devaient hériter de la résistance à la kanamycine facilitant ainsi le criblage des transconjugants. Ceux-ci ont donc été sélectionnés sur milieu minimum contenant 12 mM de succinate, de la kanamycine et respectivement, de la rifampicine ou de la streptomycine (fiche technique 1). Des témoins de mutation spontanée ont été réalisés.

4.2.2 Résultats-Discussion

Aucun transconjugant UWC1 pTV1::Tn5 ni JMP222 pTV1::Tn5 n'a été obtenu au cours de ces croisements. Plusieurs hypothèses explicatives ont alors été formulées :

- Le transposon est incapable de sauter depuis le chromosome d'*A. paradoxus* sur le plasmide pTV1.

- Le plasmide pTV1 n'est pas conjugatif.

- Le plasmide est conjugatif mais à spectre d'hôte étroit.

Nous avons donc cherché à vérifier ces différentes hypothèses.

4.3 Vérification de la mobilité du transposon

4.3.1 Matériel et méthodes

Afin de vérifier l'hypothèse de la mobilité du transposon chez notre mutant auxotrophe, un croisement a été réalisé entre la souche UWC1 de *P. putida*, la souche C600 d'*E. coli*, possédant le plasmide RP4-5 (Burkardt *et al.*, 1979) et *A. paradoxus*::Tn5 pTV1 (figure 2.29). RP4-5 est un plasmide répliatif dérivé de RP4 qui ne porte plus le gène conférant la résistance à la kanamycine, mais conserve le gène de résistance à la tétracycline. Par conjugaison avec une souche de *E. coli* porteuse de ce plasmide, *A. paradoxus* TV1 peut recevoir RP4-5. Dans ce cas, une copie du transposon peut venir s'insérer sur ce plasmide qui, étant conjugatif, peut être transmis à une cellule de *P. putida* UWC1 utilisée comme souche receveuse finale dans cette conjugaison triparentale.

4.3.2 Résultats

Le tri de souches de *P. putida* Km^R et Tc^R, effectué sur milieu Nutrient Agar + Rifampicine + Kanamycine + Tétracycline, nous a donc permis de démontrer l'aptitude du transposon Tn5 à se répliquer chez *A. paradoxus* TV1 et donc à sauter du chromosome vers le plasmide RP4-5. On peut donc, semble-t-il, en déduire son aptitude à sauter sur pTV1. Par conséquent, l'explication de nos premières observations serait à rechercher parmi les autres hypothèses précédemment exposées. La non-transmissibilité de pTV1 pouvait être due, entre autres, à l'absence sur ce plasmide de gènes *mob* ou *tra* fonctionnels. En

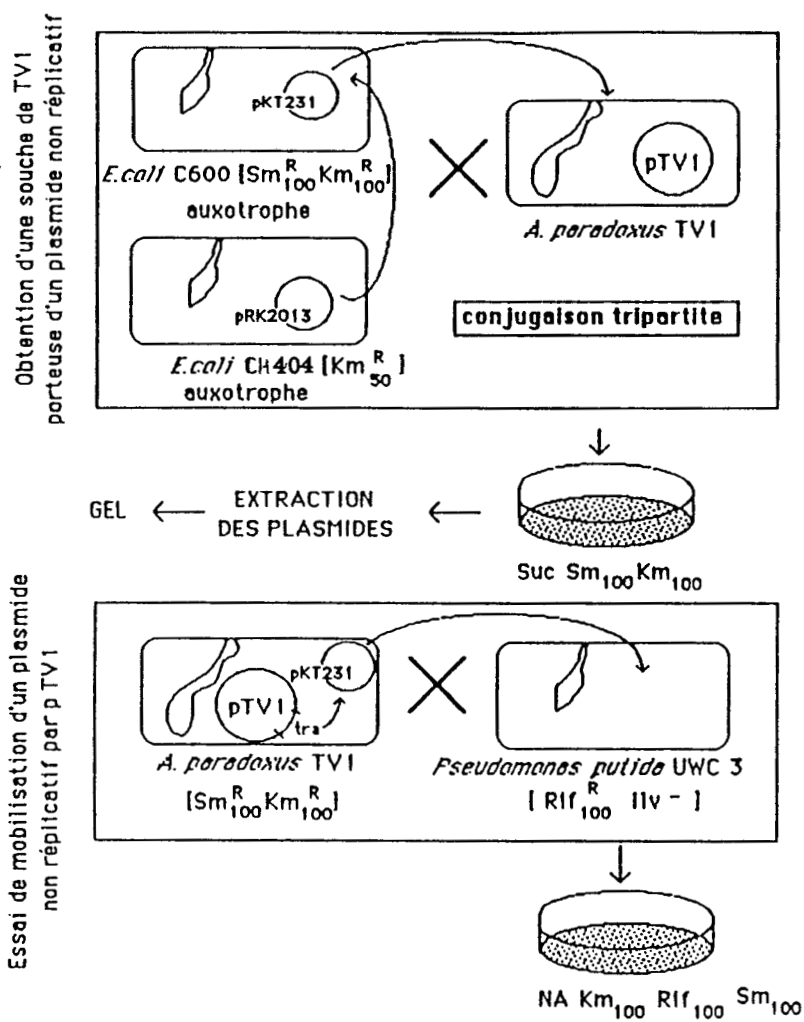


Figure 2.30: Principe utilisé pour vérifier la présence de gènes *tra* fonctionnels chez pTV1.

effet, pour qu'un plasmide soit autotransmissible, il est nécessaire qu'il possède une origine de transfert (gène *oriT* ou *mob*) reconnue comme telle par des protéines codées par des gènes *tra* portés par ce même plasmide. L'absence de l'un ou l'autre de ces gènes entraîne une impossibilité d'"autotransfert" du plasmide considéré. Il est cependant nécessaire de remarquer que les gènes *tra* pouvant intervenir en *trans*, un plasmide possédant un gène *mob* peut être transmissible. On parle alors de plasmide mobilisable.

4.4 PTV1 possède -t-il des gènes *tra* fonctionnels?

4.4.1 Principe

Pour mettre en évidence la présence de gènes *tra* fonctionnels sur pTV1, nous avons voulu voir si pTV1 était capable de mobiliser un plasmide mobilisable (possédant un gène *mob*) mais non autotransmissible (ne possédant pas l'ensemble des gènes *tra* nécessaires à son transfert) (figure 2.30). Dans un premier temps, nous avons donc essayé de générer une souche d'*A. paradoxus* TV1 porteuse d'un tel plasmide. La présence d'un plasmide "helper" portant des gènes *tra* devait permettre de transférer un plasmide non autotransmissible vers *A. paradoxus* pTV1 à partir d'une souche donneuse.

4.4.2 Matériel et méthodes

La souche C600 d'*E. coli* munie du plasmide non autotransmissible pKT231 (Bagdasarian *et al.*, 1981) portant des gènes *mob* ainsi que des gènes de résistance à la streptomycine et à la kanamycine a été choisie comme souche donneuse. Une conjugaison tripartite a été réalisée entre celle-ci, *A. paradoxus* TV1 et *E. coli* CH404 auxotrophe et porteuse du plasmide helper pRK2013 (Figurski et Helinski, 1979) portant des gènes *tra* fonctionnels. La sélection des transconjugants d'*A. paradoxus* TV1 ayant reçu pKT231 a été réalisée sur milieu minimal enrichi en succinate et comprenant 100 µg l⁻¹ de kanamycine et de streptomycine.

Dans un second temps, nous avons alors utilisé une souche de *P. putida* UWC3 dérivée auxotrophe (*ilv*-) de la souche UWC1 (Hill, 1992). Cette souche a

été choisie comme receveuse d'un croisement avec la souche *A. paradoxus* TV1 porteuse du plasmide non répliatif pKT231

4.4.3 Résultats

Compte-tenu de la très faible probabilité d'une double mutation spontanée conduisant à la résistance simultanée à la kanamycine et à la streptomycine chez *A. paradoxus* TV1, et bien que la vérification de la présence du plasmide pKT231 chez les transconjugants d'*A. paradoxus* TV1, faite par la méthode du gradient de saccharose n'ait pas donné de résultats concluants (il était difficile de visualiser la présence sur gel d'agarose de ce plasmide, celui-ci se comportant alors comme le chromosome bactérien), l'expérience a été poursuivie. Si pTV1 possédait des gènes *tra* fonctionnels, alors il devrait pouvoir mobiliser pKT231 vers la souche réceptrice *P. putida* UWC3. Aucune colonie de *Pseudomonas putida* UWC3 résistant à la streptomycine et à la kanamycine n'a été obtenue à la suite de cette conjugaison. Un tel résultat pouvait aussi bien être dû à l'absence de gènes *tra* fonctionnels sur pTV1 qu'à une incompatibilité plasmidique entre pKT231 et pTV1 poussant à la ségrégation des deux plasmides. Cette expérimentation ne nous permet donc pas de conclure à la présence de gènes *tra* fonctionnels sur pTV1. Elle devra être reprise dans des conditions qui permettront de tester chacune des hypothèses envisagées ci-dessus.

4.5 PTV1 possède-t-il des gènes *mob* fonctionnels?

4.5.1 Matériel et méthodes

Pour tester l'hypothèse de l'absence de gènes *mob* fonctionnels sur pTV1, un premier croisement triparental a été réalisé entre la souche *A. paradoxus*::Tn5 pTV1 utilisée comme donneuse et la souche de *P. putida* UWC3 en présence d'*E. coli* C600 porteuse du plasmide "helper" pRK2013. Une telle expérience devait nous permettre de savoir si pTV1::Tn5 était mobilisable par un plasmide possédant des gènes *tra* fonctionnels (figure 2.31).

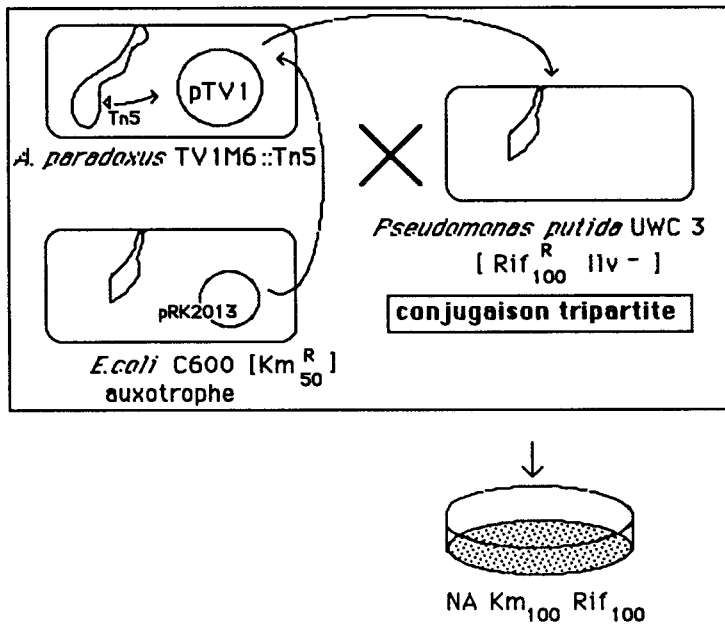


Figure 2.31 : Principe utilisé pour vérifier la présence de gènes *mob* fonctionnels chez pTV1.

4.5.2 Résultats- Discussion

Aucun transconjugant *P. putida* UWC3 pTV1::Tn5 n'a été sélectionné sur nutriment agar + kanamycine + rifampicine.

Plusieurs autres alternatives expérimentales nous étaient offertes par le biais de l'utilisation de transposons Tn5 munis de gènes *mob* (Simon *et al.*, 1984), *mob* et *tra* (Johnson, 1988) *mob*, *sacB*, *sacR* (Hynes *et al.*, 1989) (figure 2.32) permettant d'introduire dans un plasmide non conjugatif les gènes nécessaires à son transfert vers une bactérie receveuse donnée.

Pour suivre l'effet de l'insertion de gènes *mob* sur pTV1, il était possible de croiser une souche d'*E. coli* munie du transposon Tn5-*mob* porté par le vecteur suicide pSUP5011::Tn5-*mob* (Simon, 1983) avec notre souche dégradant le 2,4-D et chercher des transconjugants d'*A. paradoxus* TV1 ayant reçu le transposon. Dans une seconde étape, un croisement entre ces transconjugants et une souche réceptrice UWC1 de *P. putida* devait permettre de sélectionner le transfert du plasmide pTV1::Tn5-*mob*, éventuellement en présence d'un plasmide "helper", et ainsi, le saut du transposon sur pTV1. La souche d'*E. coli* Sm10 pSUP 5011::Tn5-*mob* possède les gènes *mob* du plasmide RP4 insérés au niveau du gène de résistance à la streptomycine du transposon Tn5 (Simon, 1983). Un tel système permet, par le biais de la transposition, l'introduction dans le génôme cible d'une origine de transfert (*oriT*) ou *mob* reconnue en *trans* par le système enzymatique produit des gènes *tra* du plasmide RP4. Ce système confère alors à un plasmide porteur d'un tel transposon, la propriété d'être mobilisable par RP4. En l'absence des fonctions de transfert apportées en *trans* par le plasmide RP4, l'introduction d'un tel transposon à l'intérieur d'un plasmide permet de vérifier si celui-ci possède ou non des gènes *tra* fonctionnels sauf en cas d'incompatibilité entre les deux systèmes de transfert ou d'impossibilité de traduction des gènes de RP4 par la bactérie hôte.

Nous avons cependant préféré à l'emploi de ce transposon, celui du Tn5 *mob sac* construit par Hynes *et al.* (1989). Celui-ci, tout en nous permettant d'introduire un gène *mob* sur pTV1, nous offrait la possibilité ultérieure de sélectionner la perte de ce plasmide chez *A. paradoxus* TV1 par l'intermédiaire des gènes *sacB* et *sacR* de *Bacillus subtilis* portés par ce transposon.

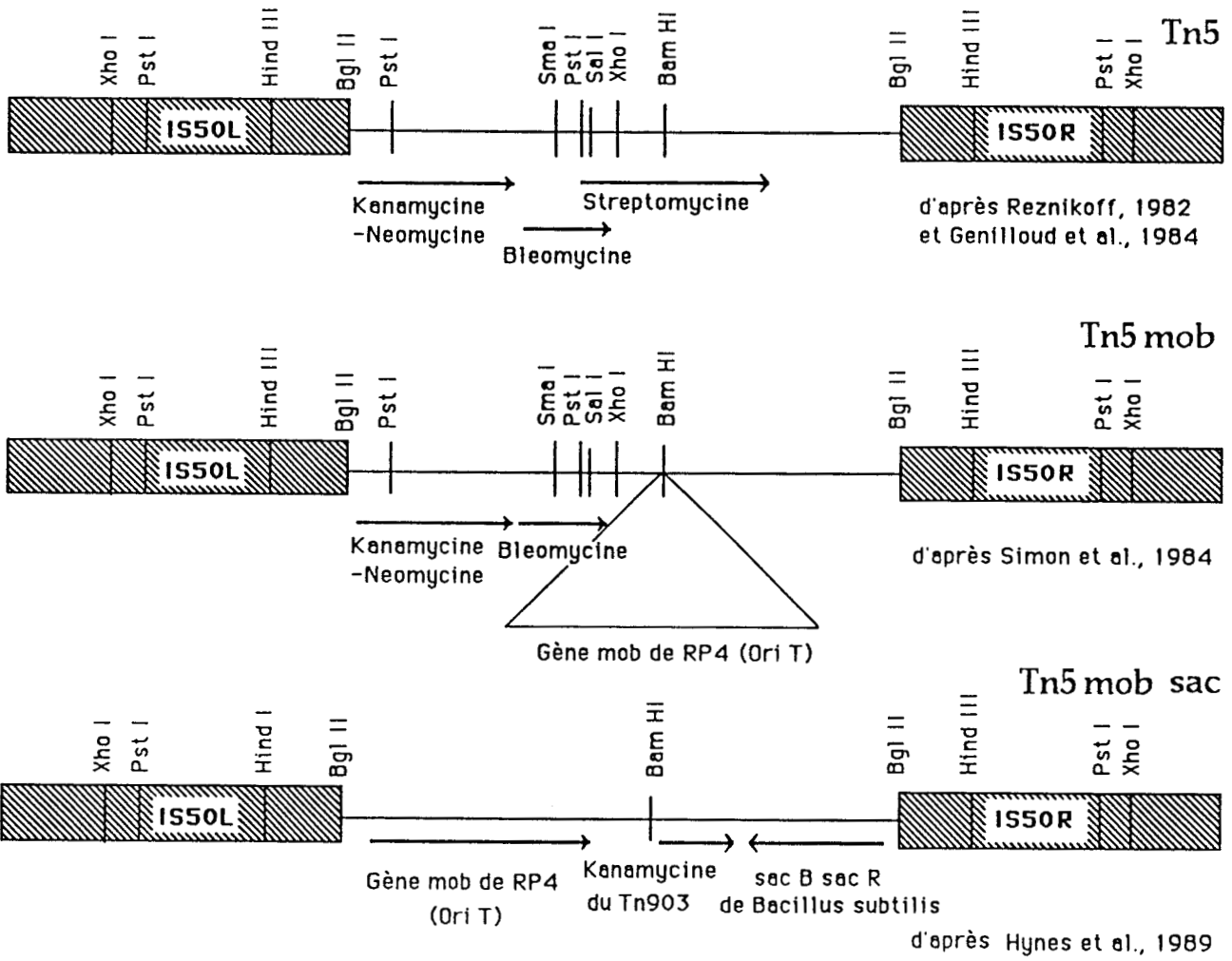


Figure 2.32 : Carte de restriction des transposons Tn5 utilisés.

4.6 PTV1 est-il conjugatif mais à spectre d'hôte restreint à la souche mère?

4.6.1 Objectif et principe

Nous avons tenté de vérifier que pTV1 était conjugatif mais à spectre d'hôte étroit par rétrotransfert de pTV1 dans une souche d'*A. paradoxus* TV1 préalablement guérie de son plasmide. Il nous était donc nécessaire d'obtenir une telle souche. Pour cela, nous avons utilisé le principe suivant

L'introduction des gènes *sacB* et *sacR* de *Bacillus subtilis* dans le génôme d'une bactérie gram négative confère à celle-ci la sensibilité au saccharose (Gay *et al.*, 1983) par l'intermédiaire, en particulier, de la levansaccharase codée par *sacB* (Gay *et al.*, 1985). L'introduction de gènes de sensibilité au saccharose sur le plasmide permet alors une sélection "positive" des bactéries ayant perdu celui-ci par étalement sur un milieu solide contenant du saccharose. La perte d'un plasmide pouvant être provoquée par adjonction, au milieu de culture, de mytomycine C en concentration subinhibitrice (Chakrabarty, 1972), il suffisait de sélectionner des souches de *A. paradoxus* TV1 présentant une insertion plasmidique de ce transposon puis, après culture en présence de mytomycine C, d'étaler la souche sur milieu complet contenant 5% de saccharose pour obtenir les génotypes recherchés dépourvus de plasmides. L'obtention d'une souche d'*A. paradoxus* guérie de son plasmide pTV1 nous permettait de vérifier par rétrotransfert, si ce plasmide était conjugatif mais à spectre d'hôte étroit.

4.6.2. Sélection de mutants d'*A. paradoxus* résistants à l'acide nalidixique

4.6.2.a Principe

Compte-tenu du spectre de résistance aux antibiotiques d'*E. coli* S17.1 pMH1701::Tn5-*mob sac* trop voisins de celui d'*A. paradoxus* TV1 et de sa forte tolérance vis à vis des sels de mercure, il était nécessaire de sélectionner des mutants d'*A. paradoxus* TV1 résistants à une substance toxique pour *E. coli* S17.1 pMH 1701::Tn5-*mob sac* afin de disposer ultérieurement d'un milieu de sélection des transconjugants. Etant donné la forte sensibilité à l'acide nalidixique

observée chez la souche S17.1 d'*E. coli* nous avons cherché à rendre *A. paradoxus* TV1 résistant à cet antibiotique.

4.6.2.b Matériel et méthode

Pour obtenir des mutants d'*A. paradoxus* TV1 résistants à 50 µg ml⁻¹ d'acide nalidixique nous avons réalisé des repiquages et enrichissements successifs d'*A. paradoxus* sur milieu contenant des concentrations croissantes de cet antibiotique.

4.6.2.c Résultats

La souche [Nal^R] d'*A. paradoxus* TV1 ainsi obtenue présentait les mêmes caractéristiques de croissance sur des milieux minimum contenant les sources carbonées assimilables par la souche sauvage. Enfin une extraction plasmidique sur gradient de saccharose nous a permis de vérifier que le plasmide pTV1 était toujours présent au sein de cette souche. D'autre part, aucun mutant spontané n'a été observé lors d'un étalement d'une aliquote de culture d'*E. coli* S17.1 contenant environ 10⁸ bactéries par ml, sur un milieu Nutrient Agar à 50 µg par ml d'acide nalidixique.

4.6.3. Tentative de guérissement de pTV1.

4.6.3.a Matériel et méthode

Escherichia coli S17.1 pMH1701::Tn5-mob sac (Hynes *et al.*, 1989) a été utilisée comme souche donneuse dans une conjugaison avec le mutant spontané d'*A. paradoxus* résistant à l'acide nalidixique. La sélection de transconjugants a été réalisée sur milieu Loos + kanamycine + acide nalidixique (figure 2.33).

Parallèlement des fioles de milieu LB (fiche technique 1) contenant des concentrations croissantes en mytomycine C (10, 20, 40, 50, 80 et 100 µg ml⁻¹) ont étéensemencées par *A. paradoxus* et incubées à 28°C sur agitateur rotatif. Nous avons suivi l'apparition de troubles dans ces milieux pour déterminer approximativement la concentration en mytomycine C subinhibitrice.

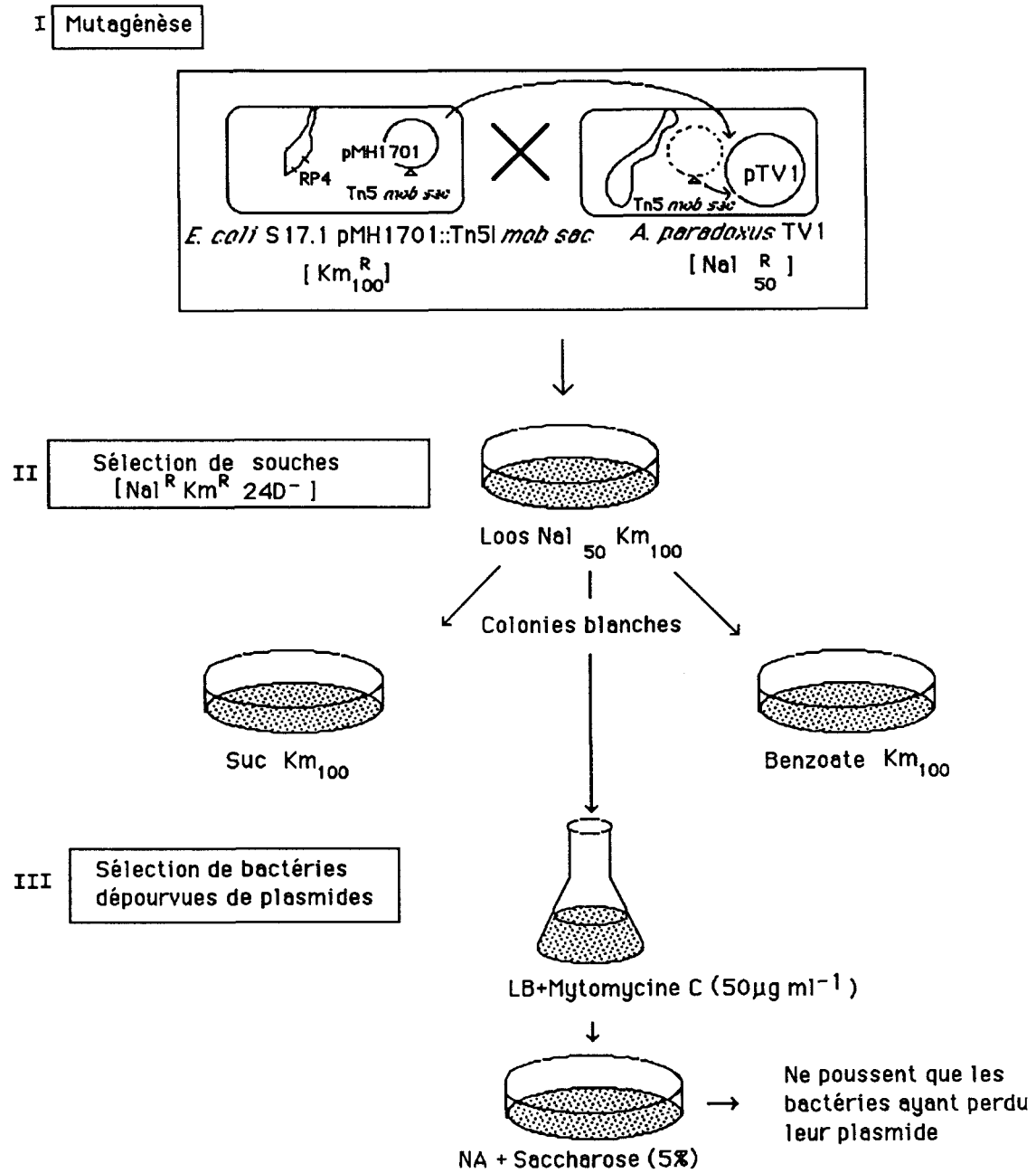


Figure 2.33 : Mutagénèse à l'aide du transposon Tn5-*mob sac* portant un gène de résistance à la kanamycine et sélection de souches d' *Alcaligenes paradoxus* TV1 ayant perdu leur plasmide.

4.6.3.b Résultats

La concentration en mytomycine C subinhibitrice pour la croissance d'*A. paradoxus* TV1 a été évaluée à 50 µg ml⁻¹. L'ensemble de cette expérimentation n'a pu être mené à bien faute de temps.

Un autre dérivé du transposon Tn5 portant simultanément les gènes *OriT* et *tra* de RP4 pourrait également être utilisé pour achever cette étude et éclairer les résultats précédemment obtenus. Construit par Johnson (1988) ce transposon fournit en *cis* tous les gènes nécessaires au transfert plasmidique et confère par conséquent au plasmide qui le porte, la propriété d'être conjugatif à la condition toutefois que la bactérie receveuse soit capable d'exprimer le système enzymatique nécessaire à la conjugaison du plasmide RP4. Il aurait donc été intéressant de marquer pTV1 à l'aide d'un tel transposon et de reprendre, à l'aide d'une telle souche, l'ensemble de la démarche en suivant le protocole initialement exposé que nous avons adapté à partir des travaux de Weightman *et al.* (1984) et Don *et al.* (1985). Sans doute ce type d'expérience nous permettrait non seulement de répondre aux questions laissées en suspens mais également de confirmer les résultats obtenus, en l'occurrence la présence, au sein du plasmide pTV1 des gènes de dégradation de la souche d'*A. paradoxus* TV1 isolée au laboratoire.

5-DISCUSSION

L'ensemble de cette étude nous a donc permis de localiser des gènes de dégradation d'*A. paradoxus* sur son plasmide pTV1. Encore nous est-il impossible d'affirmer, au vu de nos résultats, que tous les gènes impliqués dans la dégradation du 2,4-D sont, chez *A. paradoxus*, situés sur le fragment cloné voire même sur le plasmide. Bien au contraire, l'obtention de mutant [2,4-D⁻] présentant une insertion du transposon Tn5 qui semble située en dehors du fragment *EcoRI*"H" de pTV1 implique que tous les gènes nécessaires à la dégradation du 2,4-D ne sont pas présents au niveau du fragment cloné. Un gène au moins est présent sur une autre partie du plasmide. Son activité semble cependant complétée chez *A. eutrophus* JMP222 par un gène chromosomique. Il est plus probable qu'un tel gène soit un gène structurel plutôt qu'un gène de régulation, puisque les souches d'*A. paradoxus* mutées à l'aide du transposon Tn5 perdent complètement l'activité dégradante. Compte-

tenu des résultats de la bibliographie, il pourrait s'agir d'un gène codant par exemple pour la maleylacétate réductase dont la localisation chromosomique a été rapportée chez *A. eutrophus* par Kukor *et al.*, (1989). Si un tel gène était présent sur pTV1 chez *A. paradoxus*, alors, l'insertion transpositionnelle au niveau d'un tel gène pourrait être à l'origine du phénotype observé. C'est là une des explications possibles à nos résultats qui demanderait des vérifications expérimentales. Celles-ci pourraient être réalisées par hybridation (une sonde correspondant à la maléylacétate réductase d'*A.eutrophus* , par exemple, serait nécessaire) ou plus simplement en étudiant les métabolites accumulés chez les mutants obtenus.

Il resterait également à localiser les différents gènes sur le fragment *Eco*R1 "H" cloné. En particulier il serait intéressant de rechercher sur pTV1, le gène *tfdA* . Ainsi pourrait-on, sans doute, répondre à l'une des questions que nous nous sommes posés à la suite de l'isolement de notre communauté microbienne et au vu des caractéristiques de la dégradation du 2,4-D par les différentes souches présentes : l'ensemble des quatre souches composant la communauté du chémostat, lorsque celui-ci était alimenté par un milieu à base de 2,4-D comme seule source de carbone, possédait l'aptitude à minéraliser la chaîne latérale du pesticide alors qu'aucune des 19 souches composant la communauté isolée initialement ne s'étaient montrées capable d'opérer cette transformation. De plus, si aucune souche isolée de la communauté initiale constituée de 19 micro-organismes ne présentait les caractéristiques morphologiques d'*A.paradoxus* TV1 (souche C), une des souches (souche n°1 de la communauté initiale) possédait des caractéristiques morphologiques semblables à celles de *Pseudomonas aureofaciens* (souche A) reconnaissable, essentiellement, par la diffusion d'un pigment orange intense. Une autre souche de la communauté initiale (souche n°2) pouvait être confondue, d'après la forme de ses colonies, avec *Pseudomonas maltophilia* (souche B). La capacité des souches A et B à dégrader la chaîne latérale devait être nécessairement liée à la présence, chez ces souches, d'un gène de type *tfdA* impliqué dans la rupture de la liaison éther entre la chaîne et le cycle de la molécule de 2,4-D. Nous disposions alors d'un matériel biologique qui nous poussait à nous pencher sur l'éventualité d'un transfert d'information génétique entre les souches. La localisation d'un gène *tfdA* chez *A. paradoxus* TV1 pouvait nous permettre ultérieurement de rechercher la présence de gènes de ce type chez les autres souches de la communauté et de comparer les degrés d'homologie entre ces gènes : le gène *tfdA* d'*A.paradoxus* d'une part, et d'autre part le gène *tfdA* d'*A. eutrophus* JMP134. Le premier but d'une telle étude était de savoir si la capacité

à dégrader la chaîne latérale de la molécule de 2,4-D existant chez les souches B, C et D était intrinsèque à ces souches ou, compte-tenu de la présence probable de ce gène sur pTV1, avait-elle été la conséquence d'un transfert de ce plasmide (bien que nous n'ayons pas réussi à démontrer sa transmissibilité).

Une autre réflexion motivait une telle approche. En s'appuyant sur la conservation de la première étape de la dégradation du 2,4-D (qui était ressortie de notre première approche bibliographique) était-il possible d'utiliser le gène *tfdA* en tant que sonde pour mettre en évidence la présence de bactéries dégradant ce pesticide dans l'environnement?

I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :

DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES DE SÉLECTION ET D'IDENTIFICATION DES MICRO-ORGANISMES DÉGRADANT LES PESTICIDES DANS L'ENVIRONNEMENT

1- INTRODUCTION

L'évaluation de la toxicité biologique des pesticides et plus particulièrement de leurs effets sur la microflore des sols est un des moyens de mesurer leur impact au niveau écologique. La détermination de leur effet quantitatif doit cependant s'accompagner d'études plus qualitatives sur la richesse spécifique de la microflore. Ces deux démarches constituent des approches expérimentales complémentaires. Jusqu'au début des années 80, de nombreux travaux ont cherché à suivre le devenir, dans les sols, des composés xénobiotiques et à déterminer l'ensemble des facteurs pouvant influencer sur leur persistance ou, au contraire leur dégradation. De telles études étaient souvent réalisées à un niveau assez global, mesurant le flux des pesticides dans l'environnement et leur effet sur une biomasse totale ou ses différentes activités. Par ailleurs, certains auteurs ont étudié l'effet de pesticides sur des micro-organismes ou des communautés microbiennes isolés du sol et étudiés hors de leur milieu naturel. De tels travaux ont tenté d'établir les voies de dégradation des composés xénobiotiques chez des micro-organismes particuliers, de mesurer ou de comprendre l'origine et le mode d'évolution de leurs capacités dégradantes. Assez rapidement, la nécessité d'intégrer ces deux types d'approches s'est faite ressentir dans le but de comprendre quels étaient les facteurs qui permettaient aux principaux agents de la dégradation des composés xénobiotiques, les micro-organismes, de s'adapter à ces substrats nouveaux et ainsi, de favoriser leur rôle épurateur. Une telle démarche nécessitait la maîtrise de deux types de techniques, celles tout d'abord qui devaient permettre de mettre en évidence, dans l'environnement, l'activité dégradante proprement dite, celles enfin permettant de repérer, d'isoler et d'identifier les micro-organismes responsables de l'activité recherchée.

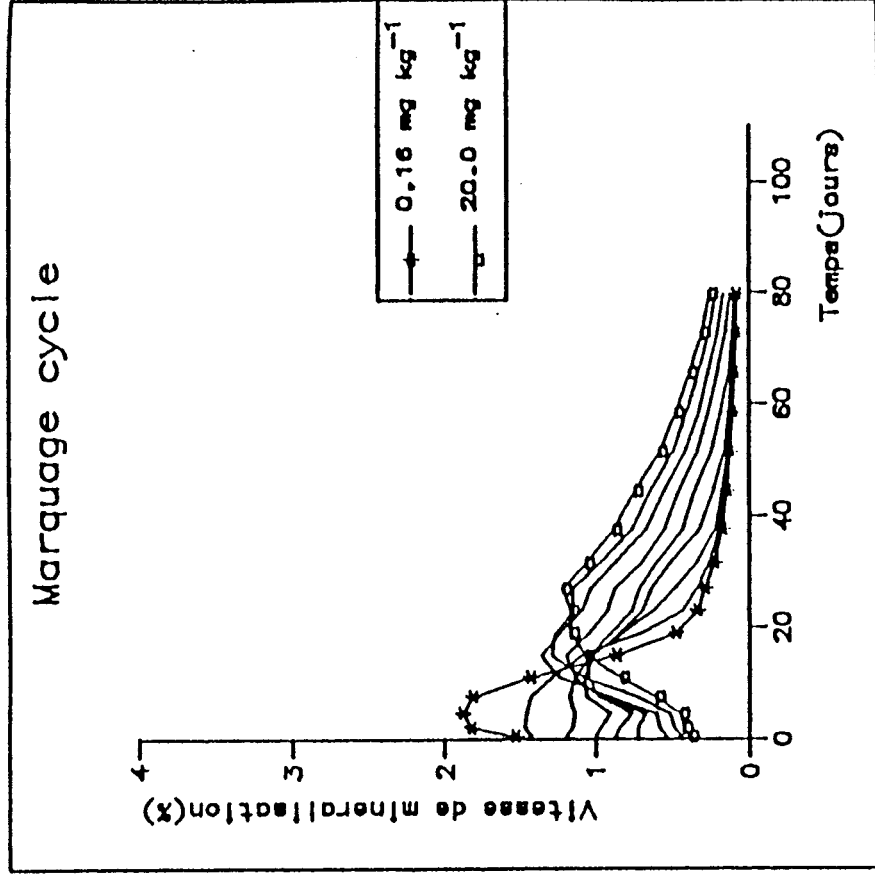
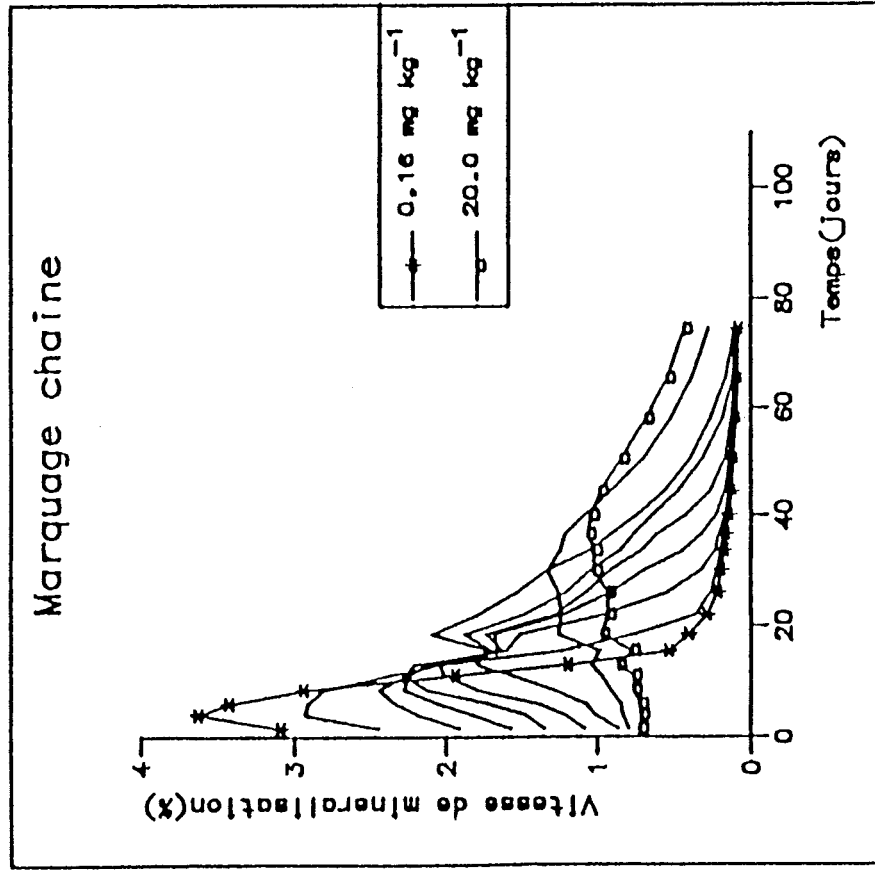


Figure 3.1 : Cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur la chaîne ou sur le cycle à différentes concentrations. (d'après Soulas, 1990)

Ainsi, dans les années 1970, la première attitude a consisté à mettre au point des techniques de dénombrement des microflore dégradant les composés xénobiotiques dans l'environnement, par mesure de leur activité. En effet, dans un premier temps, les préoccupations semblaient plus tournées vers la compréhension du phénomène d'adaptation des microflore aux traitements phytosanitaires successifs (qui s'est ensuite avéré être un problème agronomique important) que vers l'évaluation de leur réel impact écologique. Ainsi, les méthodes utilisées par les équipes se penchant sur ces problèmes illustrent leurs préoccupations. L'effet des pesticides sur la microflore est initialement estimé par la mesure de son activité dégradante vis-à-vis de tel ou tel pesticide ou encore le dénombrement de ses micro-organismes dégradants.

2- DÉNOMBREMENTS PAR MESURES D'ACTIVITÉS

1.1 Méthodes mesurant la disparition du substrat

Loos *et al.*, (1979), réalisent des dénombrements de la microflore dégradant le 2,4-D par mesure de l'activité dégradante développée naturellement à l'égard du 2,4-D sur des sols non traités. Pour ce faire, ils réalisent des suspensions-dilutions de sol et mesurent la disparition du 2,4-D dans le milieu de culture à l'aide d'un spectrophotomètre U.V. Ils dénombrent alors les micro-organismes dégradant à l'aide de la méthode du nombre le plus probable et concluent à la présence dans le sol, d'une bactérie dégradant le 2,4-D sur 3.10^4 à 3.10^7 bactéries présentes.

2.2 Mesures de minéralisation du ^{14}C -2,4-D.

Les mesures par dénombrements, souvent réalisées sous forme de dilutions dans des milieux pauvres apparaissent peu représentatives des conditions naturellement présentes dans les sols où les micro-organismes sont susceptibles de dégrader un composé xénobiotique tout en s'approvisionnant en énergie ou en carbone au détriment des autres substrats carbonés naturellement présents. Cette notion de co-métabolisme pousse donc certains auteurs à mettre au point des techniques de mesures *in situ* de l'activité des microflore dégradantes. La radiorespirométrie qui

consiste à mesurer le $^{14}\text{CO}_2$ dégagé par minéralisation d'une molécule dont l'un des atomes est marqué apparaît adaptée à la détermination d'un potentiel de dégradation d'un sol. Ainsi, Soulas *et al.* (1984) et Soulas (1990), proposent une méthode s'appuyant sur la mesure du flux de $^{14}\text{CO}_2$ dégagé à partir de ^{14}C -2,4-D. Après incorporation de la radioactivité dans la biomasse "active" à l'égard du substrat dans l'échantillon de sol traité puis fumigation de celui-ci, le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ est suivi par l'expérimentateur.

L'inconvénient de ce type de méthode est de ne pas avoir accès aux micro-organismes dégradant le pesticide dans l'environnement et donc à leur diversité. Cependant, les travaux de Soulas (1990), Soulas et Lagacherie (1990) suggèrent l'intervention d'au moins deux types de populations microbiennes dans la dégradation du 2,4-D selon les concentrations appliquées. Aux faibles doses appliquées, un seul pic d'activité apparaît après environ 5 jours d'incubation. Lorsque des concentrations de 2,4-D plus importantes sont appliquées, le premier pic d'activité disparaît, ce que les auteurs attribuent à une sensibilité des populations microbiennes non spécialisées pour lesquelles le 2,4-D apparaîtrait comme un substrat fortuit. Celui-ci fait place à un second pic qui apparaît avec une certaine phase de latence, après 20 jours d'incubation, montrant la nécessité d'une phase d'adaptation ou de croissance de populations microbiennes plus "spécialisées" (figure 3.1).

S'appuyant sur le même principe, Fournier (1980, 1989) propose une méthode pour dénombrer les micro-organismes métabolisant et co-métabolisant le 2,4-D dans les sols.

2 -PREMIERES TENTATIVES DE CARACTÉRISATION DE LA DIVERSITÉ DES MICRO-ORGANISMES DÉGRADANTS À L'AIDE DE MÉTHODES D'ISOLEMENT ET D'ENRICHISSEMENT SÉLECTIF

Pendant longtemps, les méthodes de détection de micro-organismes dans les milieux naturels sont restées limitées à quelques techniques d'étalement sur milieux gélosés sélectifs alternant éventuellement avec des séquences d'enrichissement. Ainsi, en jouant sur la formulation des milieux et des conditions de culture (température, pH, oxygénation...) et en s'appuyant sur les capacités différentielles des micro-organismes à pousser sur des substrats spécifiques aussi bien organiques que minéraux, il était possible d'enrichir les cultures en un type déterminé de micro-organismes

avant de les isoler sur des milieux gélosés. La capacité à utiliser un substrat spécifique et l'utilisation de marqueurs d'activité tel que les indicateurs d'oxydoréduction ou de pH pouvait autoriser la caractérisation et le repérage des micro-organismes recherchés. C'est ainsi que Loos (1975) met au point un milieu dérivé du milieu EMB standard destiné à isoler les micro-organismes dégradant l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique. Mettant à profit l'acidification consécutive à la libération de chlorures à partir du 2,4-D par les micro-organismes qui dégradent ce pesticide, cet auteur ajuste les concentrations en deux indicateurs de pH, le bleu de méthylène et l'éosine B de façon à ne pas inhiber l'activité dégradante du 2,4-D qui constitue la principale source carbonée. C'est à l'aide de ce milieu que Sandmann et Loos (1984), sont parvenus à identifier des micro-organismes dégradant le 2,4-D en repérant les colonies susceptibles de métaboliser le 2,4-D sur le milieu décrit.

S'appuyant sur le fait que la dégradation consomme de l'oxygène, DiGeronimo *et al.*, (1978) proposent un milieu contenant de la résazurine pour caractériser l'activité dégradante et isoler des micro-organismes utilisant des benzoates et des phénols chlorés ou non.

C'est à l'aide de séquences successives d'enrichissement et d'étalement sur milieux sélectifs où le 2,4-D constitue la principale source de carbone qu'Amy *et al.* (1985) parviennent à isoler un grand nombre de souches dégradantes à partir d'eaux résiduaires. De même, Ausmees et Heinaru (1990) rapportent l'isolement de souches dégradant le 2,4-D à partir de sols estoniens par séquences d'enrichissement sélectif sur milieu liquide comportant du 2,4-D comme seule source de carbone

L'inconvénient essentiel de ce type d'approche est, nous l'avons déjà souligné, qu'il conduit à l'isolement de micro-organismes, principalement des bactéries aérobies, dont le composé xénobiotique est la seule source de carbone et d'énergie. C'est le cas de la plupart des études que nous venons de citer, même si parfois, de faibles quantités d'extrait de levure entrent dans la composition des milieux proposés (Loos, 1975). Une telle procédure ne permet pas d'isoler des micro-organismes nécessitant une seconde source de carbone pour exprimer leur potentiel de dégradation (co-métabolisants) ni même ceux qui sont capables de n'effectuer qu'un nombre limité d'étapes métaboliques et qui nécessitent la présence de souches complémentaires. Il est certain que la diversité des populations dégradantes obtenues par ces méthodes est notablement sous-estimée. L'aspect purement quantitatif des résultats obtenus à l'aide des méthodes précédentes laisse transparaître une certaine insatisfaction. Rapidement, l'intérêt d'une approche qualitative est

soulignée. Ainsi, Sayler *et al.* (1986), définissent des buts nouveaux à toute recherche s'intéressant au devenir des pesticides et à leurs effets sur l'environnement, et les formulent ainsi :

- 1- évaluer les concentrations létales des composés xénobiotiques
- 2- développer des procédés de traitement visant à détruire ou tout au moins à transformer les matières polluantes accumulées dans l'environnement
- 3- mesurer le taux d'adaptation et les capacités évolutives de populations microbiennes sous l'effet de pressions de sélection exercées par les traitements phytosanitaires
- 4- prédire l'altération des communautés microbiennes ou, tout au moins, leur réponse aux pollutions environnementales.

Les objectifs changent, et le problème de fond n'est alors plus avant tout, d'ordre agronomique. Le but n'est plus seulement de comprendre l'adaptation d'un sol à un pesticide donné, de diminuer ou au contraire d'accroître, dans un but épurateur, une activité de la microflore. Il est de comprendre, mais aussi de mesurer l'impact d'un traitement phytosanitaire sur la microflore des sols. Une autre question se pose alors : les mesures globales d'activité microbienne étaient-elles représentatives de l'état physiologique d'un sol et pouvaient-elles rendre compte de l'effet réel des pesticides sur l'environnement? Loin d'inhiber l'activité des microflores, les doses agronomiques employées semblaient parfois l'accroître. Ceci semblait particulièrement applicable aux micro-organismes dégradants pour lesquels les composés xénobiotiques se présentaient comme de nouveaux substrats, mais certainement faux pour la plupart des autres microbes du sol. Les méthodes acquises ne semblent plus adaptées aux nouveaux objectifs : prédire l'altération des microflores sous l'action des traitements phytosanitaires et comment prédire l'impact de ces derniers sur ces microflores si ce n'est par mesure de leur diversité. Le quatrième point souligné par Sayler *et al.* (1986) demandait de développer des techniques nouvelles pouvant, à long terme, permettre d'évaluer la diversité des microbes du sol. Encore paraissait-il difficile d'avoir une image exacte, voire même approchée d'un système aussi complexe que le sol où toutes les espèces microbiennes n'avaient pas été déterminées et d'autant plus, de déterminer les évolutions d'un tel système. Aussi une telle démarche demandait de se restreindre à des groupes microbiens qu'il était possible de caractériser d'une part et d'autre part, des groupes sur lesquels un effet des composés xénobiotiques pouvait être mis en évidence. Les microflores

capables de dégrader ces composés semblaient répondre à ces différentes exigences. En effet, la capacité à dégrader un pesticide est avant tout un phénomène aléatoire qui préexiste chez certains micro-organismes du sol pour qui le composé xénobiotique n'est qu'une molécule peu différente de ses substrats habituels. On peut donc penser que l'aptitude à dégrader un pesticide apparaît indépendamment chez des micro-organismes relativement diversifiés, ne présentant pas à l'égard du pesticide les mêmes propriétés physiologiques et en particulier, la sensibilité aux fortes doses de ces composés. Les travaux de Soulas (1990) introduisent une notion de diversité fonctionnelle des micro-organismes impliqués dans la dégradation des composés xénobiotiques selon les doses appliquées. Il serait cependant nécessaire de relier cette diversité fonctionnelle à une diversité spécifique des micro-organismes impliqués. Une telle démarche demande de posséder des techniques fiables permettant de repérer, dans l'environnement, des micro-organismes dégradant un pesticide donné.

3- MÉTHODES S'APPUYANT SUR LES TECHNIQUES DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET L'UTILISATION DE SONDÉS

3.1 Existence d'homologies entre différents plasmides impliqués dans la dégradation du 2,4-D et du 3-chlorobenzoate.

Un nombre déjà important de souches dégradant le 2,4-D avait été isolé du sol (Don et Pemberton, 1981; Beadle et Smith, 1982; Kilbane *et al.*, 1982; Amy *et al.*, 1985; Sandmann et Loos, 1988; Chaudry et Huang, 1988; Ditzelmüller *et al.*, 1989; Ausmees et Heinaru, 1990; Greer *et al.*, 1990 pour ne citer que quelques unes des plus récentes...). Peu d'entre elles ont donné lieu à des caractérisations génétiques poussées mais, chez celles qui ont fait l'objet de telles études, les gènes impliqués dans la dégradation du 2,4-D ont été localisés sur des plasmides. Récemment, Ausmees et Heinaru (1990) ont mis en évidence chez deux *Pseudomonas* sp. (EST4002 et EST4003) et une souche indéterminée (EST4001) un même plasmide conjugatif (pEST4011) d'une taille de 78 kb dont un fragment de 23 kb semblerait porter les gènes impliqués dans la dégradation du 2,4-D. Ces auteurs ont alors montré que les profils de restriction des plasmides pRC10, pJP4 et pEST4011 étaient différents. Cependant, bien qu'ils aient souligné l'intérêt d'une étude systématique de caractérisation et de comparaison, à l'échelle du globe, des différents

plasmides impliqués dans la dégradation du 2,4-D décrits dans la bibliographie, ces auteurs n'ont pas cherché à vérifier la présence d'homologies entre ces plasmides. Différentes études ont conduit à constater l'existence d'homologies entre la plupart de ces plasmides et plus spécifiquement entre leurs gènes de dégradation. L'homologie existant entre pAC25 et pJP4 (Ghosal *et al.*, 1985; Ghosal et You, 1988) a pu également être vérifiée entre pJP4 et pRC10 (Chaudhry et Huang, 1988) ainsi qu'entre pAC25 et pWR1 (pB13) (Chatterjee et Chakrabarty, 1983; Frantz *et al.*, 1987) supposant ainsi l'existence d'un ancêtre commun entre les gènes de dégradation de composés organochlorés tels que le 2,4-D et le 3-CB. Nous avons également présenté au cours du second chapitre de ce travail, l'homologie mise en évidence entre pTV1 et pJP4. Des homologies ont de même été observées entre les promoteurs de l'opéron du gène *tfdCDEF* et celui de *tfdA* et surtout celui des gènes *clcABD* impliqués dans la dégradation du 3-CB sur le plasmide pAC27 (dérivant de pAC25) de *P. putida* montrant ainsi la présence de séquences conservées chez l'ensemble de ces plasmides (Ghosal et You, 1989). Ces résultats suggèrent une certaine identité d'origine chez ces plasmides .

3.2 Autres sources d'homologie

Il a été mis en évidence que les plasmides appartenant au groupe d'incompatibilité IncP (*Pseudomonas* groupe P1) présentaient tous un spectre d'hôte remarquablement étendu leur permettant de jouer le rôle de vecteur d'information génétique entre de nombreuses bactéries gram négatives. En 1983, Yacobson et Guiney, subdivisent ce groupe en 2 sous-groupe IncP α et IncP β , sur la base d'homologie entre les origines de transfert de ces plasmides. Smith et Thomas (1987), s'intéressant au sous-groupe Inc P β ajoutent aux homologies observées entre les origines de transfert, une organisation commune des gènes de réplication, de transfert, que de certains marqueurs fréquemment présents sur les plasmides de ce groupe tels la résistance au mercure. Il se trouve que la résistance au mercure est également codée par pJP4, plasmide dont l'appartenance au groupe d'incompatibilité IncP a été confirmée par Don et Pemberton, (1985) . Aussi, Burlage *et al.* (1990), cherchent à vérifier si cette communauté d'organisation se double de l'existence d'homologies entre différents plasmides appartenant à ce groupe.

Pour cela, ces auteurs choisissent des plasmides du groupe IncP β responsables de caractères phénotypiques très différents tels que la capacité à

dégrader le 3-CB, le 2,4-D, les chlorobiphényles ou la résistance au triméthoprim. Ainsi, utilisant des sondes spécifiques de *loci* connus tels que les gènes *tra*, *oriT*, *oriV*, ils mettent en évidence plusieurs zones d'homologies entre pBR60, pJP4, pSS50, pSS60, pR751. De plus, ils montrent que l'ordre de ces *loci* est remarquablement conservé entre ces différents plasmides, ce qu'ils attribuent à une origine évolutive commune. Enfin, ces auteurs remarquent que la zone conservée est interrompue par une ou des zones riches en sites de restriction contenant les gènes de résistance (R751) ou de dégradation (pJP4, pSS50, pBR60). Celle-ci se trouve de façon systématique entre les gènes *oriV* et *trfA*.

3.3 Intérêt de ces homologies pour la recherche de micro-organismes spécifiques

Ces résultats laissent entrevoir la possibilité de caractériser et d'isoler des souches présentant une activité spécifique en mettant à profit les homologies existant entre des gènes codant pour l'activité recherchée. Ainsi (théoriquement) l'utilisation de milieux sélectifs pour l'isolement de telles souches devrait-elle être rendue facultative, la sélection s'appuyant sur la présence d'un gène (ou d'un ensemble de gène) que celui-ci soit fonctionnel ou non. Le principe de l'hybridation moléculaire ADN/ADN sur colonie peut alors être appliqué à la recherche de micro-organismes présentant l'activité souhaitée. De tels principes ont déjà été appliqués par plusieurs auteurs

4.3 Les techniques d'hybridation ADN/ADN sur colonies

Théoriquement, les techniques d'hybridation ADN/ADN sur colonies sont suffisamment sensibles pour la détection de séquences spécifiques en l'absence d'agents sélectifs. Ainsi dès 1985, Saylor *et al.* affirment que de telles techniques devraient permettre de détecter les bactéries dégradant un pesticide donné dans les sols même si celles-ci sont présentes en faible nombre. Ces auteurs tentent donc d'appliquer cette démarche à la recherche des plasmides de dégradation dans l'environnement, à la mesure de leur taux de dispersion et de leur capacité de maintenance. Ils s'intéressent en particulier à deux plasmides bien caractérisés, TOL et NAH et utilisent pour leur travail les plasmides entiers marqués en tant que sonde. Les problèmes

de non spécificité qu'ils rencontrent peuvent être la conséquence du choix de la sonde. Des plasmides entiers peuvent présenter, nous l'avons vu précédemment, des zones d'homologies communes à d'autres plasmides n'intervenant nullement dans la dégradation.

Aussi Steffan *et al.* (1988) affinent la démarche lorsqu'ils cherchent à repérer dans l'environnement des souches d'*Alcaligenes* A5 dégradant les chlorobiphényles et des souches de *Pseudomonas cepacia* AC1100 dégradant l'acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique. Pour la détection de la souche *Alcaligenes* A5, ces auteurs emploient comme sonde le plasmide entier pSS50 porté par la souche (Pettigrew et Saylor, 1986). Dans le deuxième cas, ils utilisent un fragment de restriction de 1,3 kb portant une séquence répétée spécifique présente à plus de 15 exemplaires sur le chromosome et les plasmides de *P. cepacia* AC1100 (Steffan et Atlas, 1988).

Ces auteurs signalent cependant les difficultés qu'il y a à mettre en évidence, sur milieu non sélectif, des souches dont l'effectif est inférieur à une valeur seuil qu'ils estiment de l'ordre de 0,1% de la population totale des micro-organismes et ceci même si l'effectif des micro-organismes recherchés atteint 10^4 cellules viables par ml (chiffre mesuré par les méthodes "traditionnelles"). Aussi ces auteurs considèrent-ils qu'une telle méthode n'est pas adaptée au but poursuivi et soulignent la nécessité de passer par une étape préalable de criblage sur milieu sélectif.

Cependant, Saylor *et al.* (1985) affirment que la valeur seuil de la taille de la population-cible rapportée à la microflore totale peut atteindre $1/10^6$ micro-organismes.

4-CONCLUSIONS

Les problèmes auxquels nous avons été confrontés lors de l'isolement de la souche responsable de la dégradation du 2,4-D au sein de la communauté microbienne cultivée en chémostat nous ont poussés à mettre au point une méthode plus fine de mise en évidence et d'isolement des micro-organismes dégradants. Cette méthode reposant sur l'utilisation de sondes moléculaires, en particulier de fragments de matériel génétique codant pour la dégradation du 2,4-D, nécessitait des vérifications préalables concernant le type de sonde à utiliser en fonction de leur spécificité. Pour cela, nous avons mis à profit un ensemble de souches dégradant le 2,4-D et originaires de régions très éloignées dont nous disposions au laboratoire. En

effet, une telle méthode impliquerait une communauté de structure et d'origine des voies de dégradation du 2,4-D et donc des gènes de dégradation au sein des populations microbiennes des sols impliqués dans la dégradation du 2,4-D.

II. APPROCHE EXPERIMENTALE

A INTRODUCTION : PRINCIPES ET OBJECTIFS DE CE TRAVAIL

Nous avons cherché à savoir si la convergence des voies de dégradation du 2,4-D était ou non la conséquence de l'existence d'une homologie entre les gènes impliqués dans le métabolisme de cette molécule chez différentes souches capables de la dégrader. Si l'homologie observée au niveau génétique par Ghosal *et al.* (1985b) entre pAC27 et pJP4, deux plasmides issus de souches dégradant le 2,4-D, était généralisable à l'ensemble des souches dégradant cette molécule, alors on pouvait espérer mettre au point une méthode de caractérisation des micro-organismes dégradants s'appuyant sur des techniques de la biologie moléculaire et en particulier, l'utilisation de sondes moléculaires formées de fragments portant ces gènes de dégradation. Nous avons vérifié, au cours du travail exposé dans le second chapitre de cette thèse, qu'une homologie existait également entre pTV1, plasmide de la souche d'*A. paradoxus* isolée d'un sol de Dijon et pJP4. Nous avons montré ultérieurement que cette homologie était bien due aux gènes impliqués dans la dégradation du 2,4-D. Nous disposions, au laboratoire, d'un ensemble de souches isolées de sols de la région dijonnaise (*Alcaligenes xylosoxidans*, *Pseudomonas oxalaticus* ; Fournier, 1990) ou originaires d'Indonésie (*Pseudomonas cepacia* ; Gunalan, 1991), d'Australie (*Alcaligenes eutrophus* JMP134; Don et Pemberton, 1981) et de Grande-Bretagne (souche indéterminée AW5, Weightman, communication personnelle). Aussi, avons-nous recherché l'existence d'éventuelles homologies entre ces différentes souches. Plusieurs fragments de pJP4 portant les différents gènes de dégradation du 2,4-D pouvaient être utilisés comme sonde. L'utilisation du fragment de pJP4 portant le gène *tfdA* nous semblait particulièrement judicieuse compte-tenu de la conservation de la première étape de la voie de dégradation du 2,4-D chez de nombreuses souches (comme nous l'avons rapporté en introduction générale). Il était nécessaire, compte-tenu de la présence vraisemblablement fréquente de gènes codant pour la rupture des liaisons éther chez les micro-organismes du sol, de vérifier que ce type de sonde n'était pas à l'origine d'un bruit de fond trop important. Nous avons alors défini les objectifs suivants :

Espèce	souche	Origine	Dégradation 2,4-D ¹	milieu Loos ²	milieu liquide ³	Références
<i>Alcaligenes paradoxus</i>	TV1	Dijon	+	+	+	ce travail
<i>Alcaligenes xylooxidans</i>		Dijon	+	+	+	Fournier, 1990
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	JMP 134	Australie	+	+	+	Don et Pemberton, 1981
<i>Pseudomonas cepacia</i>		Indonésie	+	+	+	Gunalan, 1991
<i>Pseudomonas oxalaticus</i>		Dijon	+	+	+	Fournier, 1990
indéterminée	AW5	Grande Bratagne	+	+	+	Weightman, communication personnelle
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	A	Dijon	±	-	-	ce travail
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	B	Dijon	±	-	-	ce travail
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	1	Dijon	-	-	-	ce travail
indéterminée	2	Dijon	-	-	-	ce travail
<i>Pseudomonas putida</i>	UWC1	Dijon	-	-	-	Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981
<i>Pseudomonas</i> sp.		Dijon	-*	-	-	Gunalan, communication personnelle

Figure 3.2 : Origine et activité des souches utilisées.

* souche ayant perdu la capacité de dégrader le 2,4-D

1 (+) minéralise le cycle et la chaîne (±) minéralise la chaîne (-) pas de dégradation

2 (+) coloration des colonies (-) colonies blanches

3 (+) croissance avec 2,4-D comme source de carbone (-) pas de croissance avec 2,4-D comme source de carbone.

1- vérifier que *tfdA* pouvait être utilisé en tant que sonde pour la recherche de micro-organismes dégradant le 2,4-D

2- comparer les différences de spécificité de la sonde *tfdA* avec celles du fragment portant les gènes de dégradation d'*A. paradoxus* isolé de pTV1. Celles-ci pouvaient être reliées à la taille de la sonde, au choix des gènes de dégradation utilisés...

3- éventuellement, l'origine géographique des sondes pouvait influencer sur la spécificité de l'hybridation. Nous nous sommes donc proposé de voir si l'origine géographique des souches exerçait un effet sur le degré d'homologie obtenu avec une sonde donnée en fonction de l'origine de celle-ci.

4- Enfin, nous disposions de trois souches isolées à partir du chémostat dégradant essentiellement la chaîne latérale de la molécule de 2,4-D et présentant une très faible activité à l'égard du cycle. Celles-ci pouvaient être utilisées pour, d'une part, tester la spécificité des sondes à l'égard de ce type d'activité dégradante, et d'autre part, rechercher un éventuel transfert d'information génétique entre *A. paradoxus* TV1 (souche C) et les souches A et B (respectivement *P. aureofaciens* et *P. maltophilia*) pour lesquelles nous disposions de souches formant sur la gélose des colonies similaires qui avaient été isolées de la communauté initiale du chémostat. Ces dernières ne présentaient pas, par conséquent d'activité dégradante à l'égard du 2,4-D.

B MATÉRIEL ET MÉTHODES

1-SOUCHES UTILISÉES ET CONDITIONS DE CULTURE

Les souches dégradant complètement la molécule d'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique et les témoins non dégradant ou dégradant partiellement la molécule sont présentés sur la figure 3.2. Nous avons également présenté sur cette figure la provenance de ces souches. Les souches sont testées sur milieu de Loos (1975) et milieu 2,4-D liquide (fiche technique 1) avant tout traitement.

Les souches d'*E. coli* porteuses des plasmides dans lesquels avaient été clonés les gènes de dégradation des souches *A. eutrophus* JMP134 et *A.*

paradoxus TV1 utilisés comme sonde moléculaire dans cette étude avaient été présentées sur les figures 2.8 et 2.9

Pour les extractions d'ADN à partir de souches dégradant le 2,4-D, celles-ci ont été cultivées sur milieu LB liquide (fiche technique 1) à 28°C sur table d'agitation (200 RPM) auquel avait été ajouté du 2,4-D (3 mM) afin d'éviter la perte des propriétés dégradantes chez les souches développant ce caractère de façon instable.

Pour la purification des sondes, les souches d'*E. coli* ont été cultivées dans les mêmes conditions, sur milieu LB en présence de l'antibiotique nécessaire au maintien du plasmide .

2- MÉTHODES MOLÉCULAIRES

2.1 Isolement préparatif d'ADN total

L'ADN est extrait à partir du culot des cultures bactériennes ainsi obtenues à l'aide de la méthode proposée par Marmur (1961) (fiche technique 11)

2.2 Profil de restriction d'ADN total

L'ADN total est ensuite digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* en présence du tampon préconisé par le fournisseur. L'ADN est incubé en présence de l'enzyme à 37°C pendant une nuit puis chargé sur gel à 0,5% d'agarose en Tampon TBE (fiche technique 3). Le gel est alors transféré sur membrane Pharmacia à l'aide du protocole décrit au chapitre 2 et soumis à hybridation (fiches techniques 16 et 18)

2.3 Purification des sondes

La purification des sondes "*tfdA*" d'*A.eutrophus* JMP134 et "*tfd*" d'*A.paradoxus* TV1 a été réalisée par extraction des plasmides sur gradient de chlorure de césium (fiche technique 5) à partir des souches d'*E. coli*

présentées sur la figure 2.8, puis digestion à l'aide de l'enzyme de restriction appropriée. Ainsi, *sacI* (*sstI*) a été utilisée pour libérer le fragment *sacI* "G" de pJP4 portant le gène *tfdA* à partir du vecteur pGSS8 où il était cloné (Streber *et al.*, 1987). *EcoRI* a été utilisée pour l'obtention, à partir de pTV2, du fragment *EcoRI* "H" de pTV1 portant des gènes *tfd* d'*A. paradoxus* TV1. La séparation de l'insert (porteur des gènes de dégradation) du vecteur où il avait été cloné a alors été faite par migration sur gel d'agarose 0,7% puis isolement de la bande d'agarose portant l'insert et électro-élution de l'ADN qu'elle contenait (fiche technique 3).

2.4 Hybridations

Celles-ci ont été réalisées par dot (fiche technique 15) ou sur profil de restriction d'ADN total selon les protocoles décrits au chapitre précédent (fiche technique 16 et 18).

C EXPÉRIMENTATIONS

1-CARACTÉRISTIQUES MÉTABOLIQUES DES SOUCHES À L'ÉGARD DU 2,4-D

1.1 Matériel et méthodes

Les souches isolées du chémostat avaient été préalablement testées pour leur capacité à minéraliser le 2,4-D lorsque celui-ci était marqué au ^{14}C sur le cycle et sur la chaîne latérale de la molécule. Le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ avait été suivi (selon la méthode exposée en 2.3 du chapitre I). De plus, les souches ont été cultivées séparément sur milieu 2,4-D (fiche technique 1 § II 2 : milieu liquide minimal contenant 3mM de 2,4-D et § II.4 milieu 2,4-D pour fermenteur) pour tester leur capacité à croître sur ce substrat lorsque celui-ci est la seule source de carbone dans le milieu (en l'absence et en présence d'extrait de levure). Enfin, les souches ont étéensemencées sur milieu de Loos (1975) (fiche technique 1 § II.5) pour tester leur capacité à déchlorer la molécule.

1.2 Résultats

Les résultats des cinétiques de minéralisation du ^{14}C -2,4-D avaient été présentés au cours du chapitre I. Les souches *A. eutrophus* JMP134, *A. paradoxus* TV1, *A. xylooxidans*, *P. oxalaticus*, *P. cepacia*, et la souche indéterminée AW5 ont conduit à des réactions positives sur milieu de Loos et sur les deux milieux 2,4-D liquides utilisés. Elles étaient donc capables de croître au dépend du 2,4-D comme seule source de carbone et d'énergie et de déchlorer la molécule. Les deux souches de *Pseudomonas aureofaciens* (souche A et souche 1), la souche B de *Pseudomonas maltophilia* et la souche 2, une souche de *Pseudomonas* sp. isolée d'un sol de la région dijonnaise (Gunalan, 1991) ainsi que la souche UWC1 de *Pseudomonas putida* utilisée comme témoin négatif tout au long de cette expérience n'ont montré de réaction positive sur aucun des trois milieux. Nous avons résumé l'ensemble des résultats sur la figure 3.2.

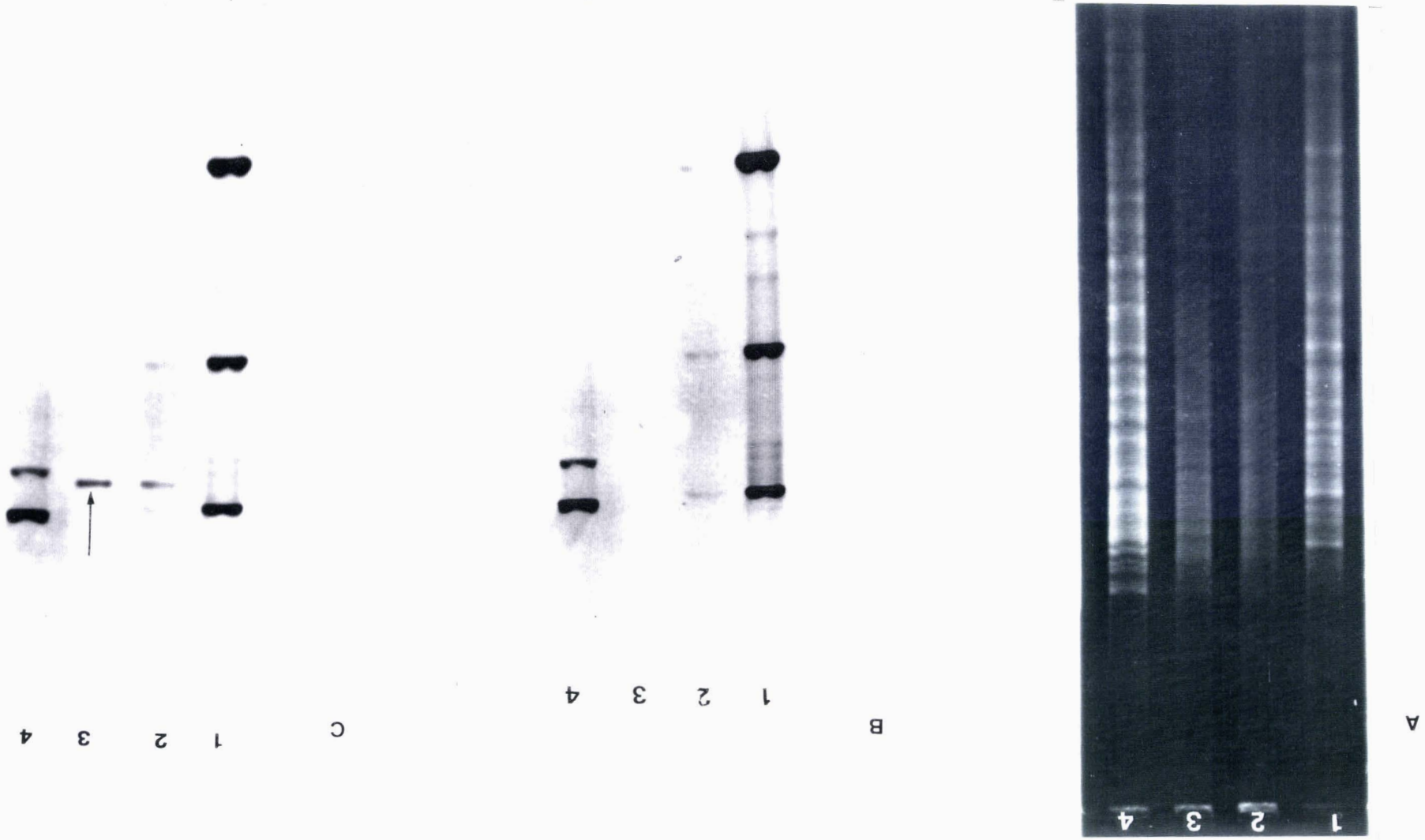
2- RECHERCHE D'HOMOLOGIES ENTRE DES SOUCHES DÉGRADANT LE 2,4-D D'ORIGINE VARIÉE (FRANCE, AUSTRALIE, INDONÉSIE, GRANDE-BRETAGNE)

2.1 Matériel et méthodes

L'ADN total de six souches dégradant le 2,4-D et capables de pousser sur cet herbicide comme seule source de carbone et d'énergie a été extrait, digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI*, déposé sur gel d'agarose, puis transféré sur membrane après migration. Des hybridations avec les sondes *sacI* "G" *tfdA* de pJP4 puis *EcoRI* "H" de pTV1 ont alors été réalisées successivement. L'ADN extrait de deux souches dégradant la chaîne latérale et faiblement le cycle (incapables de pousser sur 2,4-D comme seule source de carbone et d'énergie) ainsi que de quatre souches témoins non dégradantes a été soumis au même traitement.

1 *A. xyloxydans*
 2 *P. oxalaticus*
 3 *A. paradoxus* TV1
 4 *A. eutrophus* JMP 134

Figure 3.4 : Comparaison des profils d'hybridation sur ADN total de souches dégradant le 2,4-D digéré par *EcoRI* (A) en utilisant comme sonde le gène *tfdA* de pJP4 (B) et le fragment *EcoRI* "H" de pTV1 (C).



2.2 Hybridation de profils de restriction d'ADN de souches dégradant ou non le 2,4-D avec la sonde *tfdA*

Les résultats obtenus à l'aide de la sonde "*tfdA*" ne nous ont pas paru concluants. Plusieurs souches capables de croître sur le 2,4-D comme seule source de carbone n'ont montré aucun signal lorsque le fragment *sacI* "G" de pJP4 portant *tfdA* était utilisé comme sonde. Ainsi aucun signal n'était observé sur les profils de restriction par *EcoRI* d'ADN extrait des souches AW5, *P.cepacia* et même *A.paradoxus* TV1 (une partie des résultats obtenus est présentée sur la figure 3.4.B). Aucune des deux souches minéralisant la chaîne latérale du 2,4-D mais incapables de croître dans un milieu où le pesticide constituait la seule source de carbone n'a montré d'homologie avec la sonde *tfdA*. Nous avons alors comparé ces résultats à ceux obtenus avec la sonde portant des gènes de dégradation de pTV1

2.3 Hybridation de profils de restriction d'ADN de souches dégradant ou non le 2,4-D avec la sonde formée du fragment *EcoRI*"H" de pTV1

Les résultats de cette hybridation sont présentés sur les figures 3.3 et 3.4.C. Une différence est observée entre les résultats des hybridations réalisées à l'aide de la sonde *tfdA* d'une part et, d'autre part, la sonde formée par le fragment *EcoRI* "H" de pTV1 (figure 3.4.C). En particulier, l'ADN total extrait de la souche *A.paradoxus* TV1 n'hybride pas avec la sonde portant le gène *tfdA* d'*A.eutrophus* JMP134 lorsqu'un lavage à 1xSSC (annexes fiche technique 18) est utilisé. Une bande est au contraire visible lorsque le fragment *EcoRI*"H" est utilisé (nous l'avons signalée par une flèche sur la figure 3.4.C). Il apparaît que l'ensemble des souches capables de dégrader l'entité de la molécule de 2,4-D et de pousser sur cet herbicide comme seule source de carbone hybrident avec la sonde *EcoRI* "H" issue de pTV1 (lavage en 1x SSC). Cependant, le signal émis dans le cas des souches AW5 (originaire de grande-Bretagne et *P. cepacia* (originaire d'Indonésie) est difficilement distinguable du bruit de fond, même léger, observé au niveau des souches témoins. La quantité d'ADN déposée sur le gel pouvait être sur la figure 3.3 un facteur limitant dans le cas de la souche indonésienne

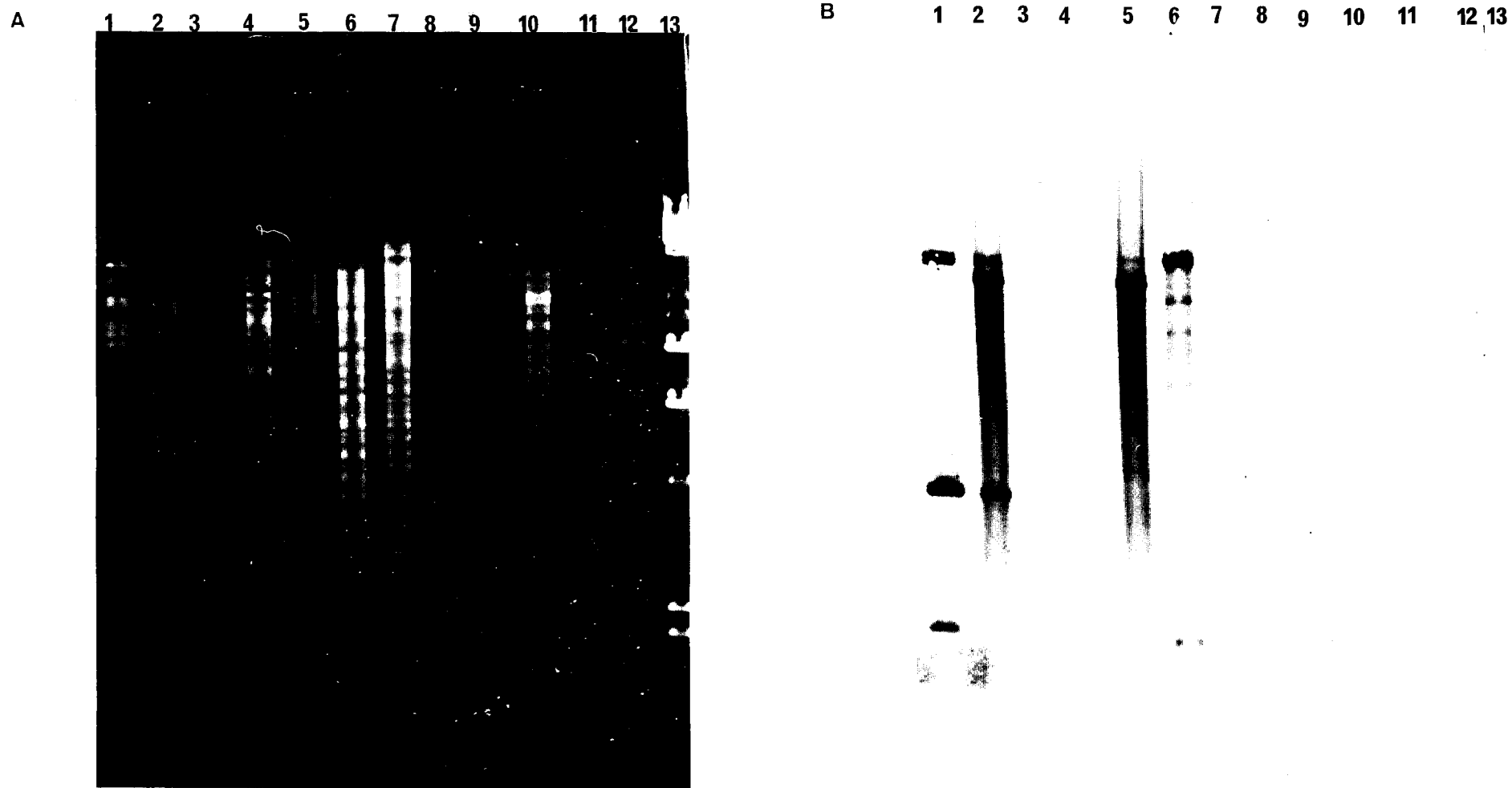


Figure 3.3 : Profil de restriction de l'ADN total de bactéries dégradant le 2,4-D digéré par l'enzyme *EcoRI* (A) et hybridation à l'aide de la sonde *EcoRI* "H" issue de pTV1 (B).

Souches dégradantes :

- 1 *A. xyloxydans*
- 2 *P. oxalaticus*
- 3 *P. cepacia*
- 4 AW5 souche indéterminée
- 5 *A. paradoxus*
- 6 *A. eutrophus*

Souches ne dégradant pas la totalité de la molécule :

- 7 *P. sp.*
- 8 *P. aureofaciens* (souche A)
- 9 *P. aureofaciens* (souche 1)
- 10 *P. maltophilia* (souche B)
- 11 *P. maltophilia* (?) (souche 2)
- 12 *P. putida* (UWC1)

(cependant, des expériences ultérieures ont confirmé une homologie plus faible entre cette souche et le fragment *EcoRI* "H" que celles observées entre ce fragment et les souches d'origine dijonnaise en particulier (figure 3.5)). Dans le cas de la souche AW5, la quantité d'ADN déposée sur le gel n'est pas limitante et le signal observé indique une faible homologie entre l'ADN extrait de cette souche et la sonde utilisée. Ces résultats montrent, par conséquent, que les souches isolées de la région de Dijon auraient tendance à présenter un degré d'homologie plus important avec ce fragment lorsque celui-ci est utilisé comme sonde que des souches d'origines éloignées.

En ce qui concerne la spécificité de l'hybridation, il apparaît, dans ce cas encore, qu'aucune des souches capables de dégrader principalement la chaîne latérale du 2,4-D (sans pour autant être capable de croître sur un milieu où le pesticide constitue la seule source carbonée), ne présente de zones homologues à la sonde *EcoRI*"H". Le bruit de fond est dans ce cas, parfois difficilement distinguable des faibles signaux d'homologie émis par certaines souches d'origine éloignée par rapport à celle de la sonde.

La comparaison de la spécificité des sondes ne peut être discutée à ce niveau du fait de la présence, sur le fragment *EcoRI* "H" de pTV1, de plus d'un gène impliqué dans la dégradation du 2,4-D. Une telle étude aurait nécessité de disposer d'un gène équivalent à *tfdA* isolé à partir d'*A. paradoxus*. Il est également vraisemblable que la taille des sondes intervienne dans l'intensité des signaux émis compte-tenu de la méthode de marquage employée (la sonde portant le gène *tfdA* d'*A. eutrophus* JMP134 présente une taille près de six fois inférieure à celle de du fragment *EcoRI* "H").

2.3 Comparaison des profils d'hybridation entre les souches capables de croître sur 2,4-D

Un effet "origine" est également sensible si l'on compare les profils d'hybridation sur l'ADN total obtenu à l'aide d'une même sonde et réalisés pour les différentes souches dégradant le 2,4-D (figure 3.3). On retrouve cet effet "origine" au niveau de la position des fragment composant les profils d'hybridation. Les souches isolées de la région ont en effet tendance à présenter des profils d'hybridation beaucoup plus proches quoique non identique, lorsque le fragment *EcoRI* de pTV1 est utilisé comme sonde, comme le signale la présence de deux fragments conservés. entre les souches *A. paradoxus*, *P. oxalaticus*, et *A. xyloxydans*. Il serait intéressant de

rechercher si ces fragments appartiennent à des plasmides et réaliser un travail similaire sur des profils plasmidiques extraits à partir de ces différentes souches si toutefois celles-ci en sont pourvues. Selon les résultats de la bibliographie et ceux de notre propre travail, il ne serait pas surprenant de pouvoir relier la présence de ces bandes à ceux de gènes de dégradation présents sur un plasmide chez ces différentes souches. Don et Pemberton, (1981) ont réalisé une étude similaire sur six plasmides dégradant le 2,4-D issus de souches isolées du sol australien et ont conclu à l'identité des profils de restriction pour plusieurs de ces plasmides. Nous ne pouvons cependant aller au delà dans nos interprétations et l'ensemble de ces dernières remarques ne peuvent que constituer des hypothèses de travail que nous tenterons de développer. A ce titre la démarche suivie pour *A. paradoxus* TV1 pourrait être généralisée à l'ensemble de ces souches. Elle constituerait, de plus, une vérification de la position privilégiée des gènes de dégradation du 2,4-D sur un plasmide. Le matériel biologique constitué de cet ensemble de souches dégradantes dont nous disposons pourrait servir de base à une étude phylogénique des gènes de dégradation du 2,4-D et à leur dissémination à travers la microflore. Il est intéressant de remarquer en effet que des profils d'hybridation similaires sont observables sur des souches d'espèces différentes suggérant la possibilité d'un transfert d'une même information génétique initiale qui divergerait ultérieurement, en fonction de l'hôte microbien. L'intérêt d'une telle approche serait encore accru en augmentant le nombre et surtout la diversité des souches dégradantes isolées d'une même région.

Nous nous sommes donc penchés sur la possibilité d'utiliser ces résultats pour isoler du sol des micro-organismes dégradant le 2,4-D. La mise au point d'une telle technique nécessitait l'établissement de la sensibilité de détection de ce type de méthode vis à vis des souches dégradant cette molécule. L'utilisation de l'hybridation de colonies sur membranes pouvait nous permettre de tester un plus grand nombre de souches.

3- CONFIRMATION DE LA PRÉSENCE D'HOMOLOGIES ENTRE SOUCHES DÉGRADANT LE 2,4-D PAR HYBRIDATION DE COLONIES SUR MEMBRANES

3.1 Principe

La mise en évidence de bactéries dégradant le 2,4-D dans l'environnement passait nécessairement par la mise au point d'une technique pouvant être utilisée en routine sur un grand nombre de bactéries. Amy *et al.*, (1990) avaient montré que l'utilisation de l'hybridation de colonies sur membrane pouvait permettre de repérer et d'isoler du sol des micro-organismes dégradants avec une bonne précision comparée aux méthodes de dénombrement traditionnelles. Nous disposions d'une sonde qui semblait présenter une bonne spécificité vis à vis des micro-organismes dégradant le 2,4-D isolés de sols de la région, aussi avons nous tenté d'appliquer une telle méthode en utilisant, en tant que sonde, le fragment *EcoRI* "H" de pTV1.

3.2 matériel et méthodes

Des suspensions-dilutions dans du milieu 2,4-D (fiche technique 1) ont été réalisées à partir de colonies isolées de souches dégradant complètement la molécule de 2,4-D et capables de croître sur ce pesticide lorsqu'il constitue la seule source de carbone présente dans le milieu. Les souches précédentes ont été utilisées pour cette étude. Nous avons également testé deux souches dégradantes non déterminées isolées du sol de Dijon. La souche JMP222 guérie de son plasmide pJP4 a été utilisée comme témoin négatif. Les souches *A. paradoxus* et *A. eutrophus* JMP222 pTV3 ont été utilisées en tant que témoin positif. 50µl des différentes dilutions étaient alors déposés sur une membrane puis soumis à une hybridation en présence de la sonde *EcoRI*"H" de pTV1 (le protocole détaillé a été décrit sur la fiche technique 15)

3.3 Résultats- discussion

Les résultats obtenus semblent confirmer les observations précédentes montrant une plus faible intensité d'hybridation au niveau des souches AW5 (originaire de Grande-Bretagne) et *Pseudomonas cepacia* (originaire d'Indonésie) relativement aux souches autochtones.

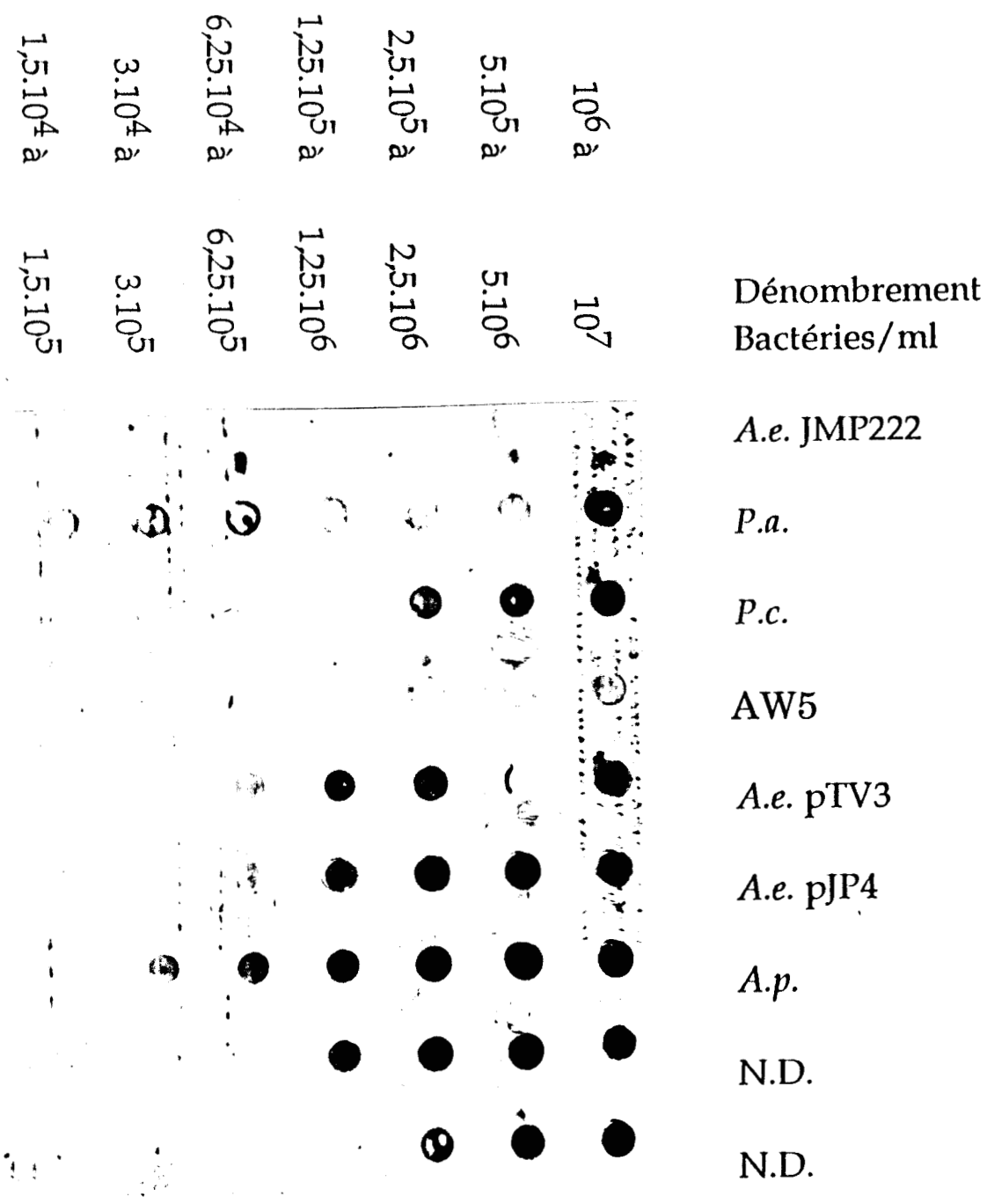


Figure 3.5 : Hybridation de colonies sur membrane à l'aide de la sonde *EcoRI* du plasmide pTV1 homologue à pJP4.

A.e = *Alcaligenes eutrophus*
P.a = *Pseudomonas aureofaciens*
P.c = *Pseudomonas cepacia*
 AW5 = souche non déterminée
A.p = *Alcaligenes paradoxus*
 N.D. = non déterminé.

Cette étude s'est limitée à définir le seuil de détection de micro-organismes dégradant le 2,4-D bien déterminés, dont les capacités dégradantes étaient connues préalablement et surtout, maintenues en culture pure. La sensibilité, et la fiabilité de la méthode n'ont pas été abordées. Il aurait été intéressant en particulier d'utiliser en tant que témoins négatifs, non seulement des souches connues comme ne dégradant pas le 2,4-D mais également des souches dégradant des composés proches du 2,4-D tels que le 3-CB, le 2,4,5-T ou le MCPA et de façon plus générale, des souches connues pour dégrader d'autres composés phytosanitaires appartenant à la famille des acides phénoxyalcanoïques. La détection de faux positif par des méthodes cherchant à détecter, dans l'environnement, des souches dégradantes s'appuyant sur l'utilisation de sondes moléculaires est un problème qui a été soulevé (Zehnder, 1992) La recherche d'analogies entre des souches dégradant des composés voisins apporterait également des résultats intéressants en ce qui concerne l'origine évolutive des gènes de dégradation.

Notre étude nous permet simplement de mettre en évidence une homologie entre des gènes issus de bactéries dégradant le 2,4-D provenant de zones géographiques éloignées. Ceux-ci sont probablement impliqués dans la dégradation du 2,4-D, ce qu'il reste cependant à démontrer. Nos résultats ne nous permettent pas cependant d'établir d'hypothèses quant à l'origine des gènes de dégradation. A ce titre, l'application de notre démarche à des bactéries dégradant des composés aromatiques chlorés naturellement présent dans l'environnement pourrait apporter quelques résultats intéressants dans ce domaine.

4 HOMOLOGIES ENTRE LES SOUCHES ISOLÉES DE LA COMMUNAUTÉ DU CHÉMOSTAT.

4.1 Matériel et méthodes

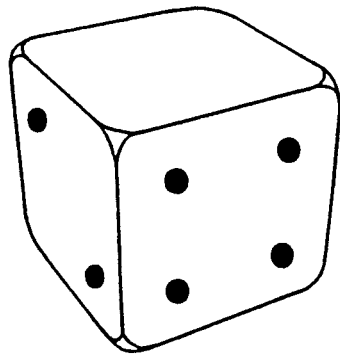
Les souches et les méthodes employées ont été décrites au paragraphe 2.1.

4.2 Résultats

Les résultats sont présentés sur la figure 3.3. Les profils de restriction par l'enzyme *EcoRI* de l'ADN des souches A et 1 (isolées respectivement de la communauté initiale du chémostat alimenté par un milieu contenant de l'extrait de sol et la communauté à quatre membres cultivée sur un milieu où le 2,4-D constituait la seule source de carbone) sont identiques. (canaux 8 et 9 de la figure 3.3) Les résultats des cinétiques de minéralisation du 2,4D exposés dans le premier chapitre de ce travail avaient montré que la souche 1 était incapable de minéraliser le 2,4-D et ne libérait pas de $^{14}\text{CO}_2$ que le pesticide soit marqué sur le cycle ou sur la chaîne. Au contraire, la souche C qui avait été déterminée comme appartenant à l'espèce *P. aureofaciens*, s'était avérée capable de minéraliser rapidement la chaîne latérale de la molécule. L'identité des profils de restriction observée entre les ADN des souches 1 et A montrent qu'elles appartiennent à la même espèce : *P. aureofaciens*. Ces conclusions ne sont pas vérifiées en ce qui concerne les souches B (*P. maltophilia*) et la souche 2 dont les profils de restriction sont respectivement présentés sur les canaux 10 et 11.

Lorsque l'on utilise comme sonde le fragment *EcoRI* "H" de pTV1, aucune hybridation n'est observée (figure 3.3.B). Cependant, un signal apparaît lorsque l'hybridation est réalisée sur des colonies d'*A. aureofaciens* (souche C) en présence de la même sonde. Ce signal présente une faible intensité comparé au signal émis par *A. eutrophus* JMP222 ayant reçu le plasmide pTV3 dans lequel avait été cloné le fragment *EcoRI* "H" de pTV1. Nos résultats ne nous permettent pas, par conséquent de conclure en faveur d'un transfert d'information entre les souches.

DISCUSSION GENERALE



DISCUSSION GÉNÉRALE

EXCLUSION COMPÉTITIVE OU COEXISTENCE ?

L'exclusion compétitive est souvent invoquée lorsque plusieurs souches sont cultivées en chémostat en présence d'un facteur limitant. Celle-ci repose, au niveau théorique, sur l'hypothèse d'une compétition vis-à-vis d'un même substrat entre les membres d'une communauté. Dans ce cas, la théorie prédit l'élimination des compétiteurs les moins adaptés et ceci jusqu'à atteindre un nombre de souches égal au nombre de substrats limitants. Si la coexistence est observée c'est que les relations établies entre les membres d'une communauté microbienne sont beaucoup plus complexes qu'une simple compétition vis-à-vis du ou des substrats limitants, et il est alors nécessaire de rechercher et de définir celles-ci. Les approches théoriques ont donc cherché à se rapprocher des observations obtenues par les expérimentateurs et à définir des modèles tenant compte de la coexistence. Ainsi, il a été montré entre autre que l'introduction d'oscillations périodiques de certains paramètres ou variables (concentration en substrat mais peut-être aussi température, oxygénation....) pouvait expliquer la coexistence de souches en présence d'un seul substrat limitant. D'autres modèles ont su rendre compte du phénomène d'inhibition pouvant être observé en présence d'un substrat, toxique à partir d'une certaine dose, et prédire une collaboration entre les compétiteurs dans la détoxification.

La coexistence est simplement la conséquence de l'existence d'interactions plus complexes que la simple compétition entre les individus d'une communauté. Ces interactions peuvent être de nature coopératives saprophytique ou commensaliste. Entre autre, la toxicité des xénobiotiques servant de source carbonée est un facteur important pouvant être à l'origine d'une collaboration entre les membres d'une communauté microbienne.

La coexistence peut également être reliée à l'hétérogénéité du milieu de culture et en particulier aux phénomènes souvent observés de formation de flocules au centre desquels la concentration en pesticide est beaucoup moins élevée autorisant les souches à croître à des concentrations qui seraient létales si leur répartition était homogène.

Dans notre cas, il semblerait que la coexistence soit le fait d'une interaction trophique doublée d'une collaboration complexe dont nous n'avons cependant pas établi clairement le fonctionnement. Nous pouvons

cependant affirmer au vu de nos résultats que la simple compétition ne régit pas les relations entre la souche C (*A. paradoxus* TV1) qui dégrade rapidement l'entité de la molécule et l'ensemble des souches A, B et D.

En batch sur un milieu contenant 200 mg l⁻¹ de 2,4-D, la vitesse initiale de minéralisation de la molécule par la communauté du chémostat apparaît plus élevée que la somme des vitesses initiales de minéralisation par les différentes souches. La même tendance est pressentie en ce qui concerne les vitesses maximales de minéralisation. Une collaboration entre les souches est donc mise en évidence même si sa nature exacte n'est pas élucidée.

Pour qu'il y ait coexistence, il faut que l'ensemble des souches d'une communauté tire bénéfice de la présence des autres et ceci doit être particulièrement vérifié dans notre cas pour la souche C qui peut se passer de la présence des autres membres de la communauté et, nous l'avons montré, dégrader seule le 2,4-D en chémostat. "Natural selection will produce nothing in one species for the exclusive good or injury of another; though it may well produce parts, organs, and excretions highly useful or even indispensable, or highly injurious to another species, but in all cases at the same time useful to their owner", déclare Darwin. Le premier bénéfice qu'apporte la présence des autres souches à la souche C est sans doute une contribution à la détoxification du 2,4-D. Cet herbicide est loin de n'être pour les souches de la communauté étudiée qu'un simple substrat. Il n'est pas inoffensif dans le sens où une sensibilité de la souche d'*A. paradoxus* au 2,4-D a été observée lors de la deuxième partie de ce travail. Sans doute aurait-il été nécessaire, pour étayer cette hypothèse, de comparer la toxicité du 2,4-D ainsi que celle du 2,4-dichlorophénol envers *A. paradoxus* cultivée seule à celle du pesticide lorsque cette souche était cultivée en présence des autres membres de la communauté microbienne. Une telle expérience pourrait confirmer une collaboration des membres dans la détoxification de la molécule contribuant ainsi à l'explication de la stabilité de l'association observée.

Cependant, si les raisons de la coexistence des souches dans le chémostat n'ont pas été clairement établies, la première partie de ce travail nous a permis d'obtenir un matériel biologique caractérisé en ce qui concernait son aptitude à dégrader le 2,4-D. Nous disposions alors d'une souche (*A. paradoxus* TV1) capable de minéraliser l'entité de la molécule de 2,4-D et de croître sur 2,4-D comme seule source de carbone. De plus, notre première approche nous avait permis d'isoler deux souches de *P. aureofaciens* (souche A et 1) présentant à l'égard du 2,4-D des capacités dégradantes

différentes. La souche 1 isolée de la communauté microbienne cultivée en chémostat en présence de 2,4-D et d'extrait de sol s'était montrée dépourvue de capacité métabolique vis-à-vis du 2,4-D marqué sur le cycle et la chaîne latérale de la molécule. Au contraire, la souche A isolée ultérieurement à partir de la même communauté, avait présenté une importante activité de minéralisation de la chaîne latérale du 2,4-D et une très faible activité vis-à-vis du cycle. Aucune de ces deux souches ne s'était montrée capable de croître sur 2,4-D comme seule source de carbone. Une souche de *Pseudomonas* sp. et une souche de *Pseudomonas maltophilia* présentant les mêmes caractéristiques métaboliques vis-à-vis du 2,4-D que la souche A avaient alors également été isolées. Une souche non dégradante initialement reconnue comme appartenant à l'espèce *Pseudomonas maltophilia* pour sa ressemblance avec la souche B avait également été isolée de la communauté initiale du chémostat. Cependant, ayant montré un profil de restriction d'ADN total différent de celui de la souche B (ce que nous avons montré au cours de la troisième partie), cette souche a été abandonnée dans la suite de notre étude. Ce matériel biologique nous a conduit à nous orienter vers une approche génétique de la communauté microbienne.

IMPLICATION D'UN PLASMIDE DANS LA DÉGRADATION DU 2,4-D CHEZ *A. PARADOXUS* TV1 (SOUCHE C)

Dans un premier temps, notre attention s'est essentiellement portée sur la souche C (*A. paradoxus* TV1), compte-tenu de sa capacité à dégrader seule la totalité de la molécule de 2,4-D et de croître sur 2,4-D comme seule source de carbone. Les données de la bibliographie ainsi que nos observations (la présence d'une activité de minéralisation de la chaîne latérale chez *A. aureofaciens* (souche A) pouvait être la conséquence d'un transfert d'information génétique de la souche C vers la souche 1) nous ont poussé à rechercher, chez cet organisme, un plasmide porteur des gènes de dégradation du 2,4-D. Des hybridations réalisées entre le plasmide pJP4 d'*A. eutrophus* JMP134 et le plasmide pTV1 d'une taille approximative de 200 kb isolé à partir d'*A. paradoxus* TV1 nous ont conduit à localiser une zone d'homologie entre les deux plasmides. Celle-ci s'est avérée correspondre pour les deux plasmides étudiés à des fragments portant les gènes de dégradation du 2,4-D. Ainsi avons-nous montré la localisation plasmidique des gènes de dégradation de

ce pesticide chez *A. paradoxus* TV1. Une sonde portant des gènes de dégradation de cette souche (le fragment *EcoRI*"H" de pTV1) était alors disponible.

Ce résultat nous a poussé à rechercher des homologues entre les membres de la communauté microbienne établie dans le chémostat.

MUTATIONS SPONTANÉES ADAPTATIVES OU TRANSFERT D'INFORMATION GÉNÉTIQUE?

Le problème de la coexistence se pose également en terme génétique, en terme de potentiel d'évolution : un certain déterminisme doit gouverner la sélection de mutations susceptibles de se produire au sein de communautés microbiennes cultivées en chémostat. Celui-ci est sans aucun doute à relier à une notion de "capacité évolutive" ou de potentiel évolutif des différents membres composant une telle communauté : si l'on suppose que les mutations susceptibles de se produire au sein d'une communauté microbienne cultivée en chémostat obéissent à la loi du hasard, c'est-à-dire qu'une mutation favorable donnant naissance à une souche "mieux adaptée" a la même chance de se produire qu'une mutation défavorable, on devrait systématiquement et au bout d'un temps fini observer l'apparition dans le milieu de culture d'une souche mieux adaptée ayant acquis des capacités métaboliques supplémentaires ou complémentaires. Il reste à définir ce que peut représenter un temps fini au niveau expérimental et à évaluer à partir de paramètres tels que la fréquence de mutation spontanée et le temps de génération, ce temps moyen au bout duquel théoriquement, une telle mutation devrait être observée. Cependant, de nombreux exemples expérimentaux nous montrent qu'il est improbable pour ne pas dire impossible de sélectionner en culture continue et de façon systématique une souche dégradante à partir d'une communauté dégradante fonctionnelle établie en chémostat en un temps expérimental fini c'est-à-dire raisonnable (qui est de plusieurs années dans notre cas). L'explication d'un tel résultat est sans aucun doute à rechercher au niveau génétique. La mutation spontanée n'est pas le seul événement pouvant être à l'origine d'une évolution et ce, surtout dans le cas d'une communauté de micro-organismes disposant d'une information génétique diversifiée. Ici encore, il faut raisonner en terme de

probabilité : si l'acquisition d'une voie métabolique nouvelle nécessite que plusieurs gènes soient affectés par des mutations spontanées (ce qui doit être fréquemment le cas compte tenu de l'intervention de plus d'un gène), sa probabilité d'apparition apparaît comme le produit des probabilités élémentaires de telles mutations. Elle est donc très faible. Or, de nombreux articles montrent à quel point plasmides et transposons jouent un rôle actif dans l'acquisition de capacités métaboliques nouvelles. Nous avons cherché à mettre en évidence ce type d'événement au sein de notre communauté.

Dans notre cas, il demeure impossible de déterminer si la souche dégradante d'*A. paradoxus* préexistait dans la communauté initiale à un niveau de population trop faible pour pouvoir autoriser sa détection ou si l'apparition de cette souche dans la communauté a été la conséquence de mutations ou de successions de conjugaisons, de recombinaisons, voire de transpositions entre les membres formant la communauté initiale.

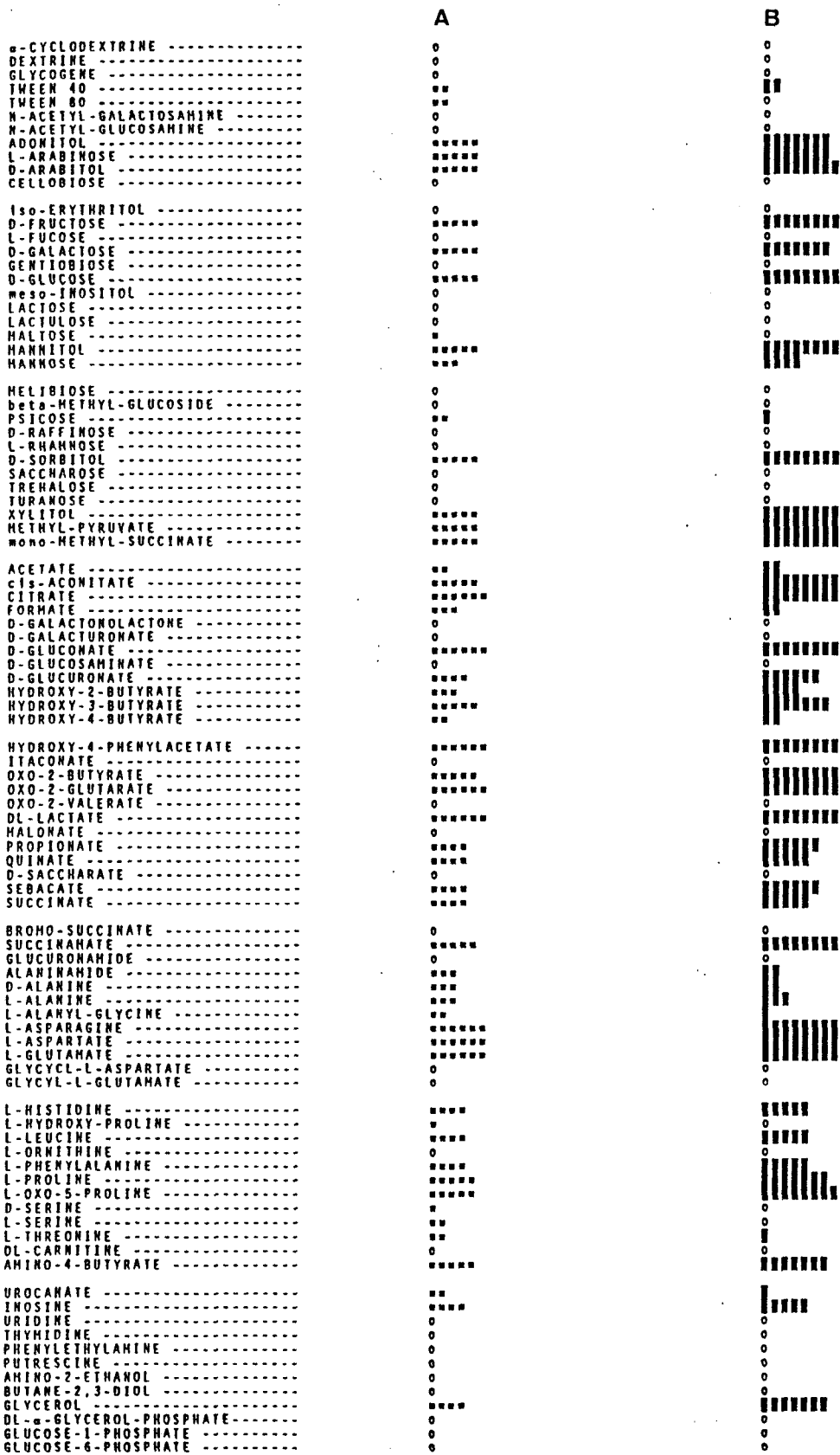
Par contre, en ce qui concerne la souche A de *P. aureofaciens*, nous avons établi que si aucune homologie n'était visible sur les profils de restriction d'ADN total de cette souche lorsqu'une hybridation était réalisée à l'aide de la sonde *EcoRI* "H" issue de pTV1 ou la sonde *tfdA* de pJP4, une homologie était discernable entre cette souche et le fragment *EcoRI*"H" de pTV1 lorsque l'hybridation était réalisée sur colonies (dot) ce qui pouvait indiquer la présence de gènes homologues entre la souche C (*A. paradoxus*) et la souche A (*P. aureofaciens*). Aucune hybridation avec les sondes testées n'avait été mise en évidence sur l'ADN total extrait de la souche 1 et digéré à l'aide d'*EcoRI*. Cette souche présentait cependant un même profil de restriction d'ADN total que la souche A et appartenait par conséquent à la même espèce (*P. aureofaciens*). Cependant, compte-tenu du faible degré d'homologie observée (et de l'absence d'une sonde portant les gènes *tfdA* d'*A. paradoxus*), la potentialité d'un transfert d'information génétique entre les deux souches C et A n'a pas pu être démontrée.

De plus, si l'acquisition de la capacité à dégrader la chaîne latérale de la molécule par la souche 1 (qui aurait donné naissance à la souche A ultérieurement isolée du chémostat) nous poussait à rechercher un transfert d'information génétique entre les souches C et A, toutes nos tentatives de transfert de pTV1 auraient échoué. Ainsi, nos résultats nous pousseraient à conclure à la non transmissibilité du plasmide.

LES GENES IMPLIQUÉS DANS LA DÉGRADATION DU 2,4-D CHEZ DES BACTÉRIES D'ORIGINES DIFFÉRENTES SONT-ILS HOMOLOGUES?

Dans une troisième partie, dans le but de pallier les difficultés rencontrées lors de l'étape d'isolement des micro-organismes du chémostat, nous nous sommes penchés sur la mise au point d'une méthode permettant de détecter les micro-organismes dégradant le 2,4-D dans l'environnement. Nous sommes partis de la constatation rapportée par la bibliographie, de l'homologie des voies de dégradation du 2,4-D mise en évidence au niveau de la première étape de la dégradation du pesticide chez de nombreuses souches microbiennes capables de le dégrader. Aussi avons-nous choisi de tester la spécificité d'une sonde formée du gène *tfdA* de pJP4 vis-à-vis de bactéries dégradantes de différentes origines et de la comparer à celle du fragment cloné à partir de pTV1 qui, nous l'avions montré, s'était avéré porter des gènes de dégradation du 2,4-D d'*A. paradoxus* TV1. Nous avons montré que des homologies existaient entre la sonde *EcoRI* "H" de pTV1 et l'ADN total issu de six souches dégradant complètement la molécule de 2,4-D. La sonde *tfdA* de pJP4 n'avait pas permis de mettre en évidence une homologie entre l'ensemble des souches capables de dégrader le pesticide. Aucune des deux sondes n'avait hybridé avec l'ADN total des bactéries capables de dégrader seulement la chaîne latérale (et très faiblement le cycle) et les bactéries témoins. Enfin, les profils d'hybridation des trois souches d'origine dijonnaise montraient une certaine tendance à présenter des fragments homologues de taille conservée. La recherche de plasmides chez les différentes souches étudiées apporterait certainement des compléments d'information aux résultats obtenus au cours de notre étude. Elle apparaît comme l'une des suites qu'il est nécessaire de donner à ce travail. Nos résultats montrent qu'il est sans doute possible d'utiliser des méthodes moléculaires pour rechercher, dans l'environnement, les bactéries dégradant le 2,4-D. L'application de ces résultats aux milieux naturels apparaît donc comme une autre orientation possible.

ANNEXES



Intensité de croissance d'*Alcaligenes paradoxus* TV1 (souche C) sur un ensemble de sources carbonées après 2 jours (A) et 4 jours (B) d'incubation. (d'après l'Institut Pasteur Paris.)

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Amy, P.S., Schulke, J.W., Frazier, L.M. & Seidler, R.J., 1985. Characterization of aquatic bacteria and cloning of genes specifying partial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (5) : 1237-1245.

Amy, S.P., Staudaher, M.V. & Seidler, R. J., 1990. Comparison of a gene probe with classical methods for detecting 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-biodegrading bacteria in natural waters. *Current Microbiol.* 21 : 95-101.

Anderson, E.S., 1966. Possible importance of transfer factors in bacterial evolution. *Nature (London).* 209 : 637.

Ауссмээс, Н.Р., хейнару, Д.Л., 1990. Новые плазмиды биодеградации гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. *Генетика* 26 (4) : 770-772.

Audus, L.J., 1951. The biological detoxication of hormone herbicides in soil. *Plant and Soil.* 3 : 170-192.

Audus, L.J., 1952. The decomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2-methyl, 4-chlorophenoxyacetic acid in the soil. *J. Sci. Food. Agric.* 3 : 268-274.

Audus, L.J., 1960. Microbiological breakdown of herbicides in soils. *In* "Herbicides and the soil." Ed. Woodford, E.K. & Sagar, G.R. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 1-19.

Bagdasarian, M, Lurz, R., Rueckert, B., Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M.M., Frey, J. & Timmis, K.N., 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. II: broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16 : 237-247.

Bardsley, W.G. & McGinlay, P.B., 1989. Optimal design for model discrimination using the F-test with non-linear biochemical models. Criteria for choosing the number and spacing of experimental points. *J. Theor. Biol.* 139 : 85-102.

Bauer, S.R., Wood, E.N. & Traxler; R.W., 1979. Co-oxidation of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Int. Biodeterio. Bull.* 15 : 53-56.

Beadle, C.A. & Smith, A. R.W., 1982. The purification and properties of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from a strain of *Acinetobacter* species. *Eur. J. Biochem.* 123 : 323-332.

Bell, G.R., 1957. Some morphological and biochemical characteristics of a soil bacterium which decomposes 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 3 : 821-840.

Birnboim, H.C. & Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids Res.* 7: 1513-1523.

Bollag, J.M., Helling, C.S. & Alexander, M., 1967. Metabolism of 4-chloro-2-methyl-phenoxyacetic acid by soil bacteria. *Appl. Microbiol.* 15 : 1393-1398.

Bollag, J.M., Helling, C.S. & Alexander, M., 1968. 2,4-D metabolism. Enzymatic hydroxylation of chlorinated phenols. *J. Agric. Food. Chem.*, 16 : 826-828.

Bonting, C.F.C., Kortstee, G.J.J. & Zhender, A.J.B., 1991. Properties of polyphosphate : AMP phosphotransferase of *Acinetobacter* strain 210A. *J. Bacteriol.* 173 (20) : 6484-6488.

Boulnois, G.J., 1981. A colicine Ib does not cause plasmid promoted abortive phage infection of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* 182 : 508-510.

Boulnois, G.J., Varley, J.M., Sharpe, G.S. & Franklin, C.H., 1985. Transposon donor plasmids, based on collb -P9, for use in *Pseudomonas putida* and a variety of other Gram negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* 200 : 65-67.

Brian, R.C., 1976. The history and classification of herbicides. In "Herbicides. Physiology, Biochemistry, Ecology." (2nd Edition). Vol 1, Chap. 1, pp 1-54. Audus, L.J. Ed. Academic Press.

Bull, A.T., 1980. Biodegradation: some attitudes and strategies of microorganisms and microbiologists. In "Contemporary Microbial Ecology", Eds Ellwood, D.C., Hedger, J.N., Latham, M.J., Lynch, J.M. & Slater, J.H., Academic Press, pp. 107-136

Burkardt, H.J., Priefer, U., Pühler, A., Rieß, G. & Spitzbarth, P., 1979. Naturally occurring insertion mutants of broad host range plasmids RP4 and R68. In "Plasmids of medical, environmental and commercial importance" Eds Timmis, K.N., & Pühler, A. Elsevier-North Holland Biomedical Press. pp. 387-398.

Burlage, R.S., Bemis, L.A., Layton, A.C., Sayler, G.S. & Larimer, F., 1990. Comparative genetic organization of incompatibility group P degradative plasmids. *J. Bacteriol.* 172 (12) : 6818-6825.

Butler, G.J. & Wolkowicz, G.S.K., 1985. A mathematical model of the chemostat with a general class of functions describing nutrient uptake. *SIAM J. Appl. Math.* 45 (1) : 139-151.

Butler, G.J. & Wolkowicz, G.S.K., 1987. Exploitative competition in a chemostat for two complementary, and possibly inhibitory resources. *Math. Biosc.* 83 : 1-48.

Caussinus, H. & Ferre, L., 1989. Analyse en composantes principales d'individus définis par les paramètres d'un modèle. *Statistique et Analyse des Données*, 14 (3) : 19-28.

Chahuneau, F., Des Clers, S. & Meyer, J.A., 1980. Les modèles de simulation en écologie lacustre. Présentation des différentes approches et analyses des modèles existants. *Acta Oecologica Oecol. Gener.* 1 : 27-50.

Chakrabarty, A.M., 1972. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. J. Bacteriol. 112 (2) : 815-823.

Chakrabarty, A.M., 1976. Plasmids in *Pseudomonas*. Ann. Rev. Genet. 10 : 7-30.

Chakrabarty, A.M., Friello, D.A. & Bopp, L.H., 1978. Transposition of plasmid DNA segments specifying hydrocarbon degradation and their expression in various micro-organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75 : 3109-3112.

Chakrabarty, A.M., Karns, J.S., Kilbane, J.J. & Chatterjee, D.K., 1983. Selective evolution of genes for enhanced degradation of persistent, toxic chemicals. In "Genetic manipulation: Impact on man and society", Arber W., Peacock, W.J., Illmensee, K. & Starlinger, P. , Eds ICSU Press.Miami. pp.

Chapman, P.J., 1976. Microbial degradation of halogenated compounds. Biochem. Soc. Transac. 4 : 463-466.

Chatterjee, D.K., Kellog, S.T., Watkins, D.R. & A.M. Chakrabarty, 1981. In Molecular biology pathogenicity, and ecology of bacteria. 519 p. *

Chatterjee, D.K. & Chakrabarty, A.M., 1982. Genetic rearrangements in plasmids specifying total degradation of chlorinated benzoic acids. Mol. Gen. Genet. 188 : 279-285.

Chatterjee, D.K., Kilbane, J.J., & A.M. Chakrabarty. 1982. Biodegradation of 2,4,5 -trichlorophenoxyacetic acid in soil by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. Appl. Environ. Microbiol. 44 (2) : 514-516.

Chatterjee, D.K. & Chakrabarty, A.M., 1983. Genetic homology between independently isolated chlorobenzoate-degradative plasmids. J. Bacteriol. 153 (1): 532-534.

Chaudhry, G.R. & Huang, G. H., 1988. Isolation and characterization of a new plasmid from a *Flavobacterium* sp. which carries the genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate. J. Bacteriol. 170 (9) : 3897-3902.

Chaudhry, G.R. & Chapalamadugu, S., 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. Microbiol. Rev. 55 (1) : 59-79.

Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H., 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli* : transformation and storage of bacterial cells in the same solutions. Proc. Natl. Acad. Sci., 86 : 2172-2175.

Clarke, P.H., 1984. Evolution of new phenotypes. In "Current perspectives in microbial ecology" Klug, M.J., & Reddy, C.A., Eds ASM pp. 71-78.

Clément-Mullet, J.J., 1977. Le livre de l'agriculture d'Ibn-al-Awam. tome premier seconde édition. Bouslama eds. Tunis. 657 p.

Comby, S., 1989. Analyse de la croissance bactérienne en présence de concentrations subinhibitrices d'antibiotiques. Pour une acquisition et une application de la connaissance en bactériologie médicale. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard Lyon I.

Contois, D.E., 1959. Kinetics of bacterial growth : relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.* 21 : 40-50.

Croder, M.S. & Hand, D.J., 1990. Analysis of repeated measures. Chapman and Hall, London.

Currier, T.C. & Nester, E.W., 1976. Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal. Biochem.* 76 : 431-441.

Dagert, M. & Ehrlich, S.D.I., 1979. Préparation des cellules compétentes. *Gene* 6 : 23-28.

Darwin, C., 1859. The origin of species. New York, Penguin Books.

De Smet, M.J., Friedman, M.B. & Gunsalus, I.C., 1989. Plasmid control of the *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* phenotypes and of linalool and p-cymene oxidation. *J. Bacteriol.* 171 (9) : 5155-5161.

Dictor, M.-C., 1990. Etude de la dégradation du 2,4-D en chémostat par des souches pures et par une communauté microbienne isolées du sol. Mémoire de DEA spécialité Ecologie Microbienne, Université de Lyon I.

DiGeronimo, M.J., Nikaido, M. & Alexander, M., 1978. Most-Probable-Number technique for the enumeration of aromatic degraders in natural environments. *Microb. Ecol.* 4 : 263-266.

Ditzelmüller, G., Loidl, M. & Streichsbier, F., 1989. Isolation and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading soil bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31 : 93-96.

Don, R.H. & Pemberton, J.M., 1981. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 145: 681-686.

Don, R.H. & Pemberton, J.M., 1985. Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 161 (1) : 466-468.

Don, R.H., Weightman, A.J., Knackmuss, H.J., & Timmis, K.N., 1985. Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* 161 (1) : 85-90.

Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W. & Knackmuss, H.J., 1974. Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading *Pseudomonas*. *Arch. Microbiol.* 99: 61-70.

Dunn, N.W. & Gunsalus, I.C., 1973. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 114 : 974-979.

Duxbury, J.M., Tiedje, J.M., Alexander, M. & Dawson, J.E., 1970. 2,4-D metabolism : enzymatic conversion of chloromaleylacetic acid to succinic acid. J. Agric. Food. Chem. 18 : 199-201.

Eaton, R. W. & Timmis, K. N., 1986a. Characterization of a plasmid-specified pathway for catabolism of isopropylbenzene in *Pseudomonas putida* RE204. J. Bacteriol. 168 (1) : 123-131.

Eaton, R. W. & Timmis, K. N., 1986b. Spontaneous deletion of a 20-kilobase DNA segment carrying genes specifying isopropylbenzene metabolism in *Pseudomonas putida* RE204. J. Bacteriol. 168 (1) : 428-430.

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

Evans, W.C. & Smith, B.S.W., 1954. The photochemical inactivation and microbial metabolism of the chlorophenoxyacetic acid herbicides. Proc. Biochem. Soc., Biochem. J. 57 : xxx

Evans, W.C., Smith, B.S.W., Fernley, H.N. & Davies, J.I., 1971. Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetate. Biochem. J. 122 : 543-551.

Farell, R. & Chakrabarty, A.M., 1979. Degradative plasmids: molecular nature and mode of evolution. In "Plasmids of medical, environmental, and commercial importance." Timmis, K.N. & Pühler, A. Eds. Elsevier Amsterdam pp. 97-109.

Faulkner, J.K. & Woodcock, D., 1964. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by *Aspergillus niger*. Van Tiegh. Nature, 203 : 865.

Faulkner, J.K. & Woodcock, D., 1965. Fungal detoxication. Part. VII. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acids by *Aspergillus niger*. J. Chem. Soc. 1187-1191.

Figurski, D.H. & Helinski, D.R., 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (4) : 1648-1652

Fisher, P.R., Appleton, J. & Pemberton, J.M., 1978. Isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid pJP1 from *Alcaligenes paradoxus*. J. Bacteriol. 135 (3) : 798-804.

Focht, D.D., 1988. Performance of biodegradative microorganisms in soil: xenobiotic chemicals as unexploited metabolic niches. In "Environmental biotechnology". Omenn, G.S. Ed. Plenum Press, New York, vol. 15, pp. 15-30.

Fournier, J.C., 1980. Enumeration of the soil microorganisms able to degrade 2,4-D by metabolism or co-metabolism. Chemosphere. 9 (3) : 169-174.

Fournier, J.C., 1989. Aspect du comportement de la microflore dégradant les produits phytosanitaires dans le sol. Thèse de doctorat es sciences naturelles, Université de Perpignan

Fournier, J.C. & Soulas, G., 1984. Comportement de la microflore dégradant les herbicides 2,4-D et MCPA dans le sol.

Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M. & Timmis, K.N., 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta-cleavage pathway. *Biochem.* 78(12) : 7458-7462.

Frantz, B., Ngai, K.-L., Chatterjee, D. K., Ornston, L. N. & Chakrabarty, A. M., 1987. Nucleotide sequence and expression of *clcD*, a plasmid-borne diene lactone hydrolase gene from *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.* 169 (2) : 704-709.

Fredrickson, J.K., Bezdicek, D.F., Brockman, F.J. & Li, S.W., 1988. Enumeration of Tn5 mutant bacteria in soil by using a Most-Probable-Number-DNA hybridization procedure and antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (2) : 446-453

Friedrich, B., Meyer, M. & Schlegel, H.G., 1983. Transfer and expression of the herbicide-degrading plasmid pJP4 in aerobic autotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* 134 : 92-97.

Friello, D.A., Mylroie, J.R., Gibson, D.T., Rogers, J.E. & Chakrabarty, A.M., 1976. XYL, a non conjugative xylene degradative plasmid in *Pseudomonas* Pxy. *J. Bacteriol.* 127 (3) : 1217-1224.

Furhman, J.A. & Lee, S.H., 1988. Natural microbial species variations studied at the DNA level. In "Recent advances in microbial ecology", Hattori, T., Ishida, Y., Maruyama, Y., Morita, R.Y. & Uchida, A. (eds), Japan Scientific Societies Press, pp. 687-691

Furukawa, K. & Chakrabarty, A.M., 1982. Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (3) : 619-626.

Gaudy, A.F., Ramanathan, M. & Rao, B.S., 1967. Kinetic behavior of heterogeneous populations in completely mixed reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, vol. IX, issue 3 : 387-411

Gause, G.F., 1934. The struggle for existence. Williams et Wilkins eds, Baltimore.

Gause, G.F., 1935. Behavior of mixed populations and the problem of natural selection. *Amer. Natur.* 69 : 596-609

Gay, P., Le coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E. & Hoch, J.A., 1983. Cloning structural gene *sacB* which encodes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 153 : 1424-1431.

Gay, P., Le coq, D., Steinmetz, M., Berkelman, T. & Kado, C.I., 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence element in gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 164 : 918-921.

Genilloud, O., Garrido, M. C. & Moreno F., 1984. The transposon Tn5 carries a bleomycin-resistance determinant. *Gene* 32 : 225-233.

Genthner, B.R.S., Price II, W.A. & Pritchard, P.H., 1989a. Anaerobic degradation of chloroaromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (6) : 1466-1471.

Genthner, B.R.S., Price II, W.A. & Pritchard, P.H., 1989b. Characterization of anaerobic dechlorinating consortia derived from aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (6) : 1472-1476.

Ghosal, D., You, I.S., Chatterjee, D.K. & Chakrabarty, A.M., 1985a. Microbial degradation of halogenated compounds. *Science.* 228 : 135-142.

Ghosal, D., You, I.S., Chatterjee, D.K. & Chakrabarty, A.M., 1985b: Genes specifying degradation of 3-chlorobenzoic acid in plasmids pAC27 and pJP4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 1638-1642.

Ghosal, D. & You, I.S., 1988. Nucleotide homology and organization of chlorocatechol oxidation genes of plasmids pJP4 and pAC27. *Mol. Gen. Genet.* 211: 113-120.

Ghosal, D. & You, I.S., 1989. Operon structure and nucleotide homology of the chloro catechol oxidation genes of plasmids pJP4 and pAC27. *Gene* 83 : 225-232.

Greer, C.W., Hawari, J. & Samson, R., 1990. Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat. *Arch. Microbiol.* 154 : 317-322.

Grenney, W.J., Bella, D.A. & Curl Jr, H.C., 1973. A theoretical approach to interspecific competition in phytoplankton communities. *Amer. Natur.* 107 (955) : 405-425

Grishchenkov, V.G., Fedechkina, I.E., Baskunov, B.P., Anizimova, L.A., Boronin, A.M. & Golovleva, L.A., 1983. Degradation of 3-chlorobenzoic acid by *Pseudomonas putida* strain (in russian) *Mikrobiologiya* 52 : 771.

Grunstein, M. & Hogness, D.S., 1975. Colony hybridization : a method for the isolation of cloned DNAs that contained a specific gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biochem.* 72 (10) : 3961-3965.

Guerry, P., Leblanc, D.G. & Falkow, S., 1973. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 116 (2) : 1064-1066.

Hall, B.G., 1984. Adaptation by acquisition of novel enzyme activities in the laboratory. *In* "Current perspectives in microbial ecology" Klug, M.J., & Reddy, C.A., Eds ASM pp. 79-86.

Hamner, C.L. & Tukey, H.B., 1944. The herbicidal action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on bindweed. *Science.* 100 : 154-155.

- Hansen, J.B. & Olsen, R.H., 1978. Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids PMG1 and PMG5. *J. Bacteriol.* 135 (1) : 227-238.
- Hardman, D.J., Gowland, P.C. & Slater, J.H., 1986. Large plasmids from soil bacteria enriched on halogenated alkanolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51 (1): 44-51.
- Harker, A. R., Olsen, R. H. & Seidler, R. J., 1989. Phenoxyacetic acid degradation by the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (TFD) pathway of plasmid pJP4 : mapping and characterization of the TFD regulatory gene, *tfdR*. *J. Bacteriol.* 171 (1) : 314-320.
- Haugland, R.A., Sangodkar, U.M.X. & Chakrabarty, A.M., 1990a. Repeated sequences including RS1100 from *Pseudomonas cepacia* AC1100 function as IS elements. *Mol. Gen. Genet.* 220 : 222-228.
- Haugland, R.A., Schlemm, D.J., Lyons III, R.P., Sferra, P.R. & Chakrabarty, A.M., 1990b. Degradation of the chlorinated phenoxyacetate herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by pure and mixed bacterial cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (5) : 1357-1362.
- Higashi, S., 1967. Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor. *J. Gen. Microbiol.* 13 : 391-403.
- Hill, K.E., Weightman, A.J. & Fry, J.C., 1992. Isolation and screening of plasmids from the epilithon which mobilize recombinant plasmid pD10. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (4) : 1292-1300.
- Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K. & Tiedje, J.M., 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (3) : 703-711.
- Holmes, D.S. & Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114 : 193-197.
- Horowitz, A., Shelton, D.R., Cornell, C.P. & Tiedje, J.M., 1983. Reductive dehalogenation of halobenzoates by anaerobic lake sediment microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 : 1459-1465.
- Houllier, F., 1987. Comparaison de courbes et de modèles de croissance. Choix d'une distance entre individus. *Statistique et Analyse de Données*, 12 (3) : 17-36
- Hsu, S.B., Hubbell, S. & Waltman, P., 1977. A mathematical theory for single-nutrient competition in continuous cultures of micro-organisms. *SIAM J. Appl. Math.* 32 (2) : 366-383.
- Hsu, T.S. & Bartha, R., 1979. Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 37 (1) : 36-41.

Hsu, S.B., Cheng, K.S. & Hubell, S.P., 1981. Exploitative competition of microorganisms for two complementary nutrients in continuous culture. *SIAM J. Appl. Math.* 41 (3) : 422-444.

Humphreys, G.O., Willshaw, G.A. & Anderson, E.S., 1975. A simple method for the preparation of a large quantities of pure plasmid DNA. *Biochem. Biophys. Acta.* 383: 457-463.

Hynes, M.F., Quandt, J. O'Connell, M.P. & Puhler, A., 1989. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis sacB* gene. *Gene.* 78 : 111-120.

Jain, R.K., Burlage, R.S. & Sayler, G.S., 1988. Methods for detecting recombinant DNA in the environment. *CRC Critic. Rev. Biotechnol.* 8 : 33-84.

Jansson, J.K., Holben, W.E. & Tiedje, J.M., 1989. Detection in soil of a deletion in an engineered DNA sequence by using DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (11) : 3022-3025.

Jeenes, D.J., Reineke, W., Knackmuss, H.J. & Williams, P.A., 1982. TOL plasmid pWWO in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains : enzyme regulation and DNA structure. *J. Bacteriol.* 150 (1) : 180-187.

Jeenes, D.J. & Williams, P.A., 1982. Excision and integration of degradative pathway genes from TOL plasmid pWWO. *J. Bacteriol.* 150 (1) : 188-194.

Jensen, H.L. & Petersen, H.I., 1952. Detoxification of hormone herbicides by soil bacteria. *Nature.* 170 : 32-40.

Jensen, R.A., 1976. Enzyme recruitment in evolution of new fonction. *Ann. Rev. Microbiol.* 30 : 409-425.

Johnson, D.A., 1988. Construction of transposons carrying the transfer functions of RP4. *Plasmid* 20 (3) : 249-258.

Jolliffe, I.T., 1986. Principal component analysis for non-independent and time series data. In "Principal component analysis", chap. 11.2, pp.205-209, Springer-Verlag, New York.

Kado, C.I. & Liu, S.T., 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145 : 1365-1373.

Kamp, P.F. & Chakrabarty, A.M., 1979. Plasmids specifying p-chlorobiphenyl degradation in enteric bacteria. In "Plasmids of medical, environmental and commercial importance". Timmis, K.N. & Pühler, A. eds, pp. 275-285, Elsevier Amsterdam, Biomedical Press.

Kaphammer, B., Kukor, J.J. & Olsen, R.H., 1990. Regulation of *tfdCDEF* by *tfdR* of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 172 : 2280-2286.

Kaphammer, B. & Olsen, R.H., 1990. Cloning and characterization of *tfdS*, the repressor-activator gene of *tfdB*, from the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid catabolic plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 172 (10) : 5856-5862.

Karns, J.S., Kilbane, J.J., Chatterjee, D.K. & Chakrabarty, A.M., 1984. Microbial degradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and chlorophenols *In* "Genetic Control of environmental Pollutants" Omnen, G.S., & Hollaender, A. Eds pp. 3-23, Plenum Press, New-York.

Kawasaki, H, Tone, N. & Tonomura, K., 1981a. Plasmid determined dehalogenation of haloacetates in *Moraxella* species. *Agric. Biol. Chem.* 45 (1) : 29-34.

Kawasaki, H, Tone, N. & Tonomura, K., 1981b. Purification and properties of haloacetate halohydrolyase specified by plasmid from *Moraxella* sp. strain B. *Agric. Biol. Chem.* 45 (1) : 35-42.

Kellog, S.T., Chatterjee, D.K. & Chakrabarty, A.M., 1981. Plasmid-assisted molecular breeding : new techniques for enhanced biodegradation of persistent toxic chemicals. *Science.* 214 : 1133-1135.

Kilbane, J.J., Chatterjee, D.K., Karns, J.S., Kellogg, S.T. & Chakrabarty, A.M., 1982. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1) : 72-78.

Kilpi, S., Backstrom, V. & Korhola, M., 1980. Degradation of 2-methyl,4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), benzoic acid and salicylic acid by *Pseudomonas* sp. HV3. *FEMS Microbiol. Lett.* 8 : 177-182.

Kleckner, N., 1977. Translocatable elements in prokaryotes. *Cell* 11 : 11-23.

Kleckner, N., 1990. Regulating Tn10 and IS10 transposition. *Genetics* 124 : 449-454.

Kleckner, N., Chan, R.K., Tye, B.K. & Botstein, D. 1975. Mutagenesis by insertion of a drug resistance element carrying an inverted repetition. *J. Mol. Biol.* 94 : 561-575.

Kukor, J. J., Olsen, R. H. & Siak J-S., 1989. Recruitment of a chromosomally encoded maleylacetate reductase for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 171 (6) : 3385-3390.

Lappin, H.M., Greaves, M.P. & Slater, J.H., 1985. Degradation of the herbicide Mecoprop [2- (2-methyl-4-chlorophenoxy) propionic acid] by a synergistic microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 (2) : 429-433.

Legay, J.-M., 1986. Méthodes et modèles dans l'étude des systèmes complexes. *Les Cahiers de la Recherche Développement*, 11 : 1-6.

Leon, J.A. & Tumpson, D.B., 1975. Competition between two species for two complementary or two substitutable resources. *J. Theoret. Biol.* 44 : 373-386.

Levin, S.A., 1970. Community equilibria and stability, and an extension of the competitive exclusion principle. *Amer. Natur.* 104 : 413-423.

Liu, T. & Chapman, P.J., 1984. Purification and properties of a plasmid encoded 2,4-dichlorophenol hydroxylase. *FEBS Lett.* 173 (2) : 314-318.

Loos, M.A., 1975. Indicator media for microorganisms degrading chlorinated pesticides. *Can. J. Microbiol.* 21 : 104-107.

Loos, M.A., Roberts, R.N. & Alexander, M., 1967. Phenols as intermediates in the decomposition of phenoxyacetates by an *Arthrobacter* species. *Can. J. Microbiol.* 13 : 679-690.

Marmur, J., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3 : 208-218.

Marth, P.C. & Mitchell, J.W., 1944. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid as differential herbicide. *Bot. Gaz.* 106 : 224-232.

Maxwell, G. M., Allen, E. R. & Freese, E., 1987. Immersible probe for continual monitoring of the population of microorganisms grown in liquid media. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (3) : 618-619.

May, R.M. & Leonard, W.J., 1975. Nonlinear aspects of competition between three species. *SIAM J. Appl. Math.* 29 (2) : 243-253.

Mazodier, P., Genilloud, O., Giraud, E. & Gasser F., 1986. Expression of Tn5-encoded streptomycin resistance in *E. Coli*. *Mol. Gen. Genet.* 204 : 404-409.

Mc Clure, N.C., Weightman, A.J. & Fry, J.C., 1989. Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated-sludge unit. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (10) : 2627-2634.

Mc Clure, N.C., Fry, J.C. & Weightman, A.J., 1990. Gene transfer in activated sludge *In* "Bacterial genetics in natural environments." Ed. Fry, J.C. & Day, M.J., Chapman Hall, London pp. 111-129.

Mc Clure, N.C., Fry, J.C. & Weightman, A.J., 1991. The survival and catabolic activity of natural and genetically engineered bacteria in a laboratory scale activated sludge unit. *Appl. Environ. Microbiol.*

Meers, J.L., 1971. Effect of dilution rate on the outcome of chemostat mixed culture experiment. *J. Gen. Microbiol.* 67 : 359-361.

Megee III, R.D., Drake, J.F., Fredrickson, A.G. & Tsuchiya, H.M., 1972. Studies in intermicrobial symbiosis. *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus casei*. *Can. J. Microbiol.* 18 : 1733-1742.

Mermod, M., Lerbach, P.R., Don, R.H. & Timmis, K.N., 1986. Gene cloning and manipulation in *Pseudomonas*. *In* "The bacteria", vol. X, pp. 325-355, Academic Press.

- Meyers, J.A., Sanchez, D. Elwell, L.P. & Falkow, S. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127 (3) : 1529-1537.
- Mitchell, J.W. & Hamner, C.L., 1944. Polyethylene glycols as carriers for growth-regulating substances. *Bot. Gaz.* 105 : 474-483.
- Monod, J., 1942. *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.* Hermann ed., Paris, 210 p.
- Monod, J., 1950. La technique de culture continue : théorie et applications. *Ann. Institut Pasteur.* 79 (2) : 390-410.
- Morris, C.F., Hershberger, C.L. & Rownd, R., 1973. Strain specific nick in open circular R-factor deoxyribonucleic acid : attachment of the linear strand to a proteinaceous cellular component. *J. Bacteriol.* 114 (1) : 300-308.
- Moser, H., 1957 in Kargi & Shuler, 1979. Generalized differential specific rate equation for microbial growth. *Biotechnol. Bioeng.* 221 : 1871-1875.
- Murray, N.E., Brammar, W.J. & Murray, K., 1977. Lambda phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.* 150 : 53-61.
- Neidle, E.L., Hartnett, C., Bonitz, S. & Orston, L.N., 1988. DNA sequence of the *Acinetobacter calcoaceticus* catechol 1,2- dioxygenase I structural gene *catA*: Evidence for evolutionary divergence of intradiol dioxygenases by acquisition of DNA sequence repetitions. *J. Bacteriol.* 170 (10) : 4874-4880.
- Ngai, K.-L. & Ornston, L. N., 1988. Abundant expression of *Pseudomonas* genes for chlorocatechol metabolism. *J. Bacteriol.* 170 (5) : 2412-2413.
- Novick, R.P., 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51 (4) : 381-395.
- Novick, A. & Szilard, L., 1950. Description of the chemostat. *Science*, 112 : 715-716.
- Ogram, A.V., Jessup, R.E., Ou, L.T. & Rao, P.S.C., 1985. Effects of sorption on biological biodegradation rates of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soils. *Appl. Microbiol.* 49 : 582-587.
- Packard, J., Breen, A., Sayler, G.S. & Palumbo, A.V., . Monitoring populations of 4-chlorobiphenyl-degrading bacteria in soil and lake water microcosms using colony hybridization. *Recombinant DNA Technologies: Marine Biodegradation* 119-125.
- Palchaudry, S. & Chakrabarty, A., 1976. Isolation of plasmid desoxyribonucleic acid from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 126 (1) : 410-416.
- Parkes, R.J., 1982. Methods for enriching, isolating, and analysing microbial communities in laboratory systems. *In* "Microbial interactions and communities." Vol 1 Eds Bull, A.T. & Slater, J.H., London, pp.

Pavé, A., Rousseau, B. & Yoccoz, G., 1988. Informatique appliquée à la biologie, calcul scientifique. Dynamac : un logiciel de simulation et d'étude de modèles mathématiques. Exemples d'utilisation en biologie. Cours ENSL.

Pemberton, J.M., 1979. Pesticide degrading plasmids: a biological answer to environmental pollution by phenoxyherbicides. *AMBIO*. 8 (5) : 202-205.

Pemberton, J.M. & Clark, A.G., 1973. Detection and characterization of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO. *J. Bacteriol.* 114 (1) : 424-433.

Pemberton, J.M. & Fisher, P.R., 1977. 2,4-D plasmid and persistence. *Nature* 268 : 742-743.

Pemberton, J.M., Corney, B. & Don, R.H., 1979. Evolution and spread of pesticide degrading ability among soil microorganisms. *In* "Plasmids of medical, environmental, and commercial importance." Timmis, K.N. & et Pühler, A. Eds. Elsevier Amsterdam. pp. 287-299.

Perkins, E.J., Bolton, G.W., Gordon, M.P. & Lurquin, P.F., 1988. Partial nucleotide sequence of the chlorocatechol degradative operon *tfdCDEF* of pJP4 and similarity to promoters of the chlorinated degradative operons *tfdA* and *clcABD*. *Nucleic Acid Res.* 16 (14) : 7200.

Perkins, E.J. & Lurquin, P.F., 1988. Duplication of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid monooxygenase gene in *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* 170 (12) : 5669-5672.

Perkins, E.J., Gordon, M.P., Caceres, O. & Lurquin, P.F., 1990. Organization and sequence analysis of the of 2,4-dichlorophenol oxidative operons of plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 172 : 2351-2359.

Pertsova, R.N., Kunc, F. & Golovleva, L.A., 1984. Degradation of 3-chlorobenzoate in soil by pseudomonads carrying biodegradative plasmids. *Folia Microbiol.* 29 : 242-247.

Pettigrew, C.A. & Saylor, G.S., 1986. The use of DNA : DNA colony hybridization in the rapid isolation of 4-chlorobiphenyl degradative bacterial phenotypes. *J. Microbiol. Meth.* 5 : 205-213.

Pieper, D.H., Reineke, W., Engesser, K-H., Don, R.H., Timmis, K.N. & Knackmuss, H.J., 1985. Modified ortho-cleavage pathway in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. for the degradation of 4-methylcatechol. *FEMS Microbiol. Lett.* 29 : 63-67.

Pieper, D.H., Reineke, W., Engesser, K-H. & Knackmuss, H.J., 1988. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Archiv. Microbiol.* 150: 95-102.

Pieper, D.H., Reineke, W., Engesser, K.-H. & Knackmuss, H.J., 1989. Regulation of catabolic pathways of phenoxyacetic acids and phenols in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Archiv. Microbiol.* 151 : 365-371.

Pirt, S.J., 1965. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. Proc. Roy. Soc. London, 163 : 224-231.

Powell, E.O., 1958. Criteria for the growth of contaminants and mutants in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 18 : 259-268.

Reineke, W., 1986. Construction of bacterial strain with novel degradative capabilities for chloroaromatics. J. Basic. Microbiol. 9 : 551-567.

Reineke, W. & Knackmuss, H.J., 1980. Hybrid pathway of chlorobenzoate metabolism in *Pseudomonas* sp. B13 derivatives. J. Bacteriol. 142 (2) : 467-473.

Renneboog-Squilbin, C., 1967. Theory of the chemostat- Study of the condition under which a population of micro-organisms and its mutant will coexist in the chemostat. J. Theor. Biol. 14 : 74-101.

Reznikoff, W.S., 1982. Tn5 transposition and its regulation. Cell 31 : 307-308.

Rheinwald, J.G., Chakrabarty, A.M. & Gunsalus, I.C., 1973. A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 70 : 885-889.

Roels, J.A., 1983. Energetics and kinetics in biotechnology. Chap. 9: Unstructured models for growth and product formation in microorganisms pp. 223-258. Elsevier Biomedical Press Amsterdam.

Rogoff, M.H. & Reid, J.J., 1956. Bacterial decomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. J. Bacteriol. 71 : 303-307.

Rojo, F., Pieper, D. H., Engesser, K.-H., Knackmuss, H.-J. & Timmis, K. N., 1987. Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. Science 238 : 1395-1398.

Rosenberg, A. & Alexander, M., 1980a. Microbial metabolism of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in soil, soil suspensions, and axenic culture. J. Agric. Food. Chem. 28 : 297-302.

Rosenberg, A. & Alexander, M., 1980b. 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) decomposition in tropical soil and its cometabolism by bacteria in vitro. J. Agric. Food Chem. 28 : 705-709.

Rousseau, B., 1987. Dynamac : un logiciel interactif pour l'étude des systèmes dynamiques. Revue Internationale de Systémique 1 : 181-207

Samardzija, N. & Greller, L.D., 1988. Explosive route to chaos through a fractal torus in a generalized lotka-volterra model. Bull. Math. Biol. 50 (5) : 465-491.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Sandmann, E.R.I.C. & Loos, M.A., 1984. Enumeration of 2,4-D microorganisms in soil and crop plant rhizospheres using indicator media; high populations associated with sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Chemosphere*. 13 (9) : 1073-1084.

Sandmann, E.R.I.C. & Loos, M.A., 1988. Aromatic metabolism by a 2,4-D degrading *Arthrobacter* sp. *Can. J. Microbiol.* 34 : 125-130.

Sangodkar, U.M.X., Chapman, P.J. & Chakrabarty, A.M., 1988. Cloning, physical mapping and expression of chromosomal genes specifying degradation of the herbicide 2,4,5-T by *Pseudomonas cepacia* AC1100. *Gene*, 71 : 267-277.

Sayler, G.S., Shields, M.S., Tedford, E.T., Breen, A., Hooper, S.W., Sirotkin, K.M. & Davis, J.W., 1985. Application of DNA-DNA colony hybridization to the detection of catabolic genotypes in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (5) : 1295-1303.

Sayler, G.S., Jain, R.K., Ogram, A., Pettigrew, C.A., Houston, L., Blackburn, J. & Riggsby, W.S., 1986. Genetic elements. In " Perspectives in microbial ecology", Megusar, F. & Gantar, M. (eds), Slovene Society for Microbiology, Ljubljana, pp. 499-508

Sayler, G.S., Fleming, J., Applegate, B., Werner, C. & Nikbakht, K., 1988. Microbial community analysis using environmental nucleic acid extracts. In "Recent advances in microbial ecology", Hattori, T., Ishida, Y., Maruyama, Y., Morita, R.Y. & Uchida, A. (eds), Japan Scientific Societies Press, pp. 658-661

Sayler, G.S. & Layton, A.C., 1990. Environmental application of nucleic acid hybridization. *Ann. Rev. Microbiol.* 44 : 625-648

Selvaraj, G. & Iyer, V. N., 1984. Transposon Tn5 specifies streptomycin resistance in *Rhizobium* spp. *J. Bacteriol.* 158 (2) : 580-589.

Senior, E., Bull, A.T. & Slater, J.H., 1976. Enzyme evolution in a microbial community growing on the herbicide dalapon. *Nature (London)* : 263 : 476-479.

Shailubhai, K., Sahasrabudhe, S.R., Vora, K.A. & Modi, V.V., 1983. Degradation of chlorinated derivatives of phenoxyacetic acid by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1 : 279-282.

Simon, R., 1984. High frequency mobilization of gram negative bacterial replicon by the *in vitro* constructed *Tn5-mob* transposon. *Mol. Gen. Genet.* 196 : 413-420.

Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A., 1983a. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering : transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnol.* 1 : 784-791.

Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A., 1983b. Vector plasmids for *in vivo* and *in vitro* manipulations of gram-negative bacteria plant interaction. A. Pühler, ed. Springer Verlag, Heidelberg. pp. 98-106.

Slater, J. H. & Bull, A. T., 1982. Environmental microbiology : biodegradation. Philos. Trans. R. Soc. London. 297 : 575-597.

Slater, J.H., Weightman, A.J. & Hall, B.G., 1985. Dehalogenase genes of *Pseudomonas putida* PP3 on chromosomally located transposable elements. Mol. Biol. Evol. 2 (6) : 557-567.

Smith, H.L., 1981. Competitive coexistence in an oscillating chemostat. SIAM J. Appl. Math. 40 (3) : 498-522

Smith, H.L., 1982. The interaction of steady state and Hopf bifurcations in a two-predator-one prey competition model. SIAM J. Appl. Math. 42 (1) : 27-43

Smith, C.A. & Thomas, C.M., 1987. Comparison of the organization of the genomes of phenotypically diverse plasmids of incompatibility group P : members of the IncP β sub-group are closely related. Mol. Gen. Genet. 206 : 419-427

Smouse, P.E., 1980. Mathematical models for continuous growth dynamics of mixed populations subsisting on a heterogeneous resource base: 1 Simple competition. Theor. Popul. Biol. 17 : 16-36.

Soulas, G., 1985. La dégradation des pesticides dans le sol. Aspects microbiens et cinétiques. Sci. Sol. 2 :43-57.

Soulas, G., 1990. Dégradation biologique d'un herbicide, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) dans le sol. Aspects cinétiques. Thèse de doctorat es sciences naturelles, Institut National Polytechnique de Lorraine - ENSAIA.

Soulas, G., Chaussod, R. & Verguet, A., 1984. Chloroform fumigation technique as a mean of determining the size of specialized soil microbial populations : application to pesticide-degrading microorganisms. Soil. Biol. Biochem. 5 : 497-501.

Soulas, G. & Lagacherie, B., 1990. Modelling of microbial processes that govern degradation of organic substrates in soil, with special reference to pesticides. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 329 : 369-373.

Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 : 503-517.

Southern, E.M., 1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. Anal. Biochem. 100 : 319-323.

Stanier, R.Y., Adelberg, E.A. & Ingraham, J.L., 1985. General Microbiology (fourth edition). MacMillan Publishers Ltd, London, 871 p.

Stapp, C. & Spicher, G., 1954. Untersuchungen über die Wirkung von 2,4-D im Boden. IV Mitteilung. *Flavobacterium peregrinum* n. sp. und seine Fähigkeit zum Abbau des Hormones. Zentralblatt für Bakt. E.T.C.II Abt. Bd. 108 Heft, 4 (7) : 113-126.

- Staskawicz, B., Dalhbeck, D., Keen, N. & Napoli, C., 1987. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race O and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. J. Bacteriol. 169 (12) : 5789-5794.
- Steenson, T.I. & Walker, N. 1956. Observation on the bacterial oxydation of chlorophenoxyacetic acids. Plant and Soil. 8 : 17-32.
- Steffan, R.J. & Atlas, R.M., 1988. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 54 (9) : 2185-2191.
- Steffan, R.J., Breen, A., Atlas, R.M. & Saylor, G.S., 1989. Application of gene probe methods for monitoring specific microbial populations in freshwater ecosystems. Can. J. Microbiol. 35 : 681-685.
- Stewart, F.M. & Levin, B.R., 1973. Partitioning of resources and the outcome of interspecific competition: a model and some general considerations. Amer. Naturalist. 107 : 171-198.
- Stewart, G.S.A.B., Lubinsky-Mink, S., Jackson, C.G., Cassel, A. & Kuhn, J., 1986. pHG 165: A pBR322 copies number derivative of pUC8 for cloning and expression. Plasmid 15 : 172-181.
- Streber, W.R., Timmis, K.N. & Zenk, M.H., 1987. Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetate mono-oxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. J. Bacteriol. 169 : 2950-2955.
- Taylor, P.A. & Williams, J.L., 1975. Theoretical studies on the coexistence of competing species under continuous-flow conditions. Can. J. Microbiol. 21 : 90-98.
- Tiedje, J.M., Duxbury, J.M., Alexander, M. & Bawson, J.E., 1969. 2,4-D metabolism: pathway of degradation of chlorocatechol by *Arthrobacter* sp. J. Agric. Food. Chem. 17 : 1021-1026.
- Tomasek, P.H., Frantz, B., Sangodkar, U.M.X., Haugland, R.A. & Chakrabarty, A.M., 1989. Characterization and nucleotide sequence determination of repeat element isolated from a 2,4,5-T degrading strain of *Pseudomonas cepacia*. Gene 76 : 227-238.
- Topiwala, H.H. & Hamer, G., 1971. Effect of wall growth in steady-state continuous cultures. Biotechnol. Bioeng., 13 : 919-922.
- Torsvik, V.L., 1979. Isolation of bacterial DNA from soil. Soil Biol. Biochem. 12 : 15-21.
- Torsvik, V.L. & Goksoyr, J., 1978. Determination of bacterial DNA in soil. Soil Biol. Biochem. 10 : 7-12.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. & Daae, F. L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56 (3) : 782-787.

Torsvik, V.L., Salt, K., Sorheim, R. & Goksoyr, J., 1990. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (3) : 776-781.

Trevors, J.T. & van Elsas, J.D., 1989. A review of selected methods in environmental microbial genetics. *Can. J. Microbiol.* 35 : 895-902.

Tsai, Y.-L. & Olson, B.H., 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (4) : 1070-1074.

Tyler, J.E. & Finn, R.K., 1974. Growth rates of a *Pseudomonas* on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenol. *Appl. Microbiol.* 28 (2) : 181-184.

van der Meer, J.R., Roelof, W., Schraa, G. & Zehnder, A.J.B., 1987. Degradation of low concentrations of dichlorobenzenes and 1,2,4-trichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. strain P51 in nonsterile soil columns. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45 : 333-341.

van der Meer, J.R., van Neerven, A.R.W., de Vries, E.J., de Vos, W.M. & Zhender, A.J.B., 1991a. Cloning and characterization of plasmid-encoded genes for the degradation of 1,2-dichloro-, 1,4-dichloro-, and 1,2,4-trichlorobenzene of *Pseudomonas* sp. strain P51. *J. Bacteriol.* 173 (1) : 6-15

van der Meer, J.R., Eggen, R.I.L., Zhender, A.J.B. & de Vos, W.M., 1991b. Sequence analysis of the *Pseudomonas* sp. strain P51 *tcb* gene cluster, which encodes metabolism of chlorinated catechols : evidence for specialization of catechol 1,2-dioxygenases for chlorinated substrates. *J. Bacteriol.* 173 (8) : 2425-2434.

van der Meer, J.R., Frijters, A.C.J., Leveau, J.H.J., Eggen, R.I.L., Zhender, A.J.B. & de Vos, W.M., 1991c. Characterization of the *Pseudomonas* sp. strain P51 gene *tcbR*, a Lys-R type transcriptional activator of the *tcbCDEF* chlorocatechol oxidative operon, and analysis of the regulatory region. *J. Bacteriol.* 173 (12) : 3700-3708.

van der Meer, J.R., Zhender, A.J.B. & de Vos, W.M., 1991d. Identification of a novel composite transposable element, Tn5280, carrying chlorobenzene dioxygenase genes of *Pseudomonas* sp. strain P51. *J. Bacteriol.* 173 (22) : 7077-7083.

Veldkamp, H. & Jannasch, H.W., 1972. Mixed culture studies with the chemostat. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 22 : 105-123.

Verhulst, P.F., 1838. Notice sur la loi que suit la population dans son accroissement. *Cor. Math. et Phys.* 10 : 113-121.

Vila, J.P., 1990. Exact experimental designs via stochastic optimization for non linear regression models. In "Compstat 90", Physica-Verlag Heidelberg for IASC (International Association for Statistical Computing) pp. 291-296.

Voordouw, G., Voordouw, J.K., Karkhoff-Schweizer, R.R., Fedorak, P.M. & Westlake, D.W.S., 1991. Reverse sample genome probing, a new technique for

identification of bacteria in environmental samples by DNA hybridization, and its application to the identification of sulfate-reducing bacteria in oil field samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 3070-3078.

Waid, H.S., 1972. The possible importance of transfer factors in the bacterial oxidation of herbicides in natural ecosystems. *Residue Rev.* 44 : 65-71.

Walia, S., Khan, A. & Rosenthal, N., 1990. Construction and applications of DNA probes for detection of polychlorinated biphenyl-degrading genotypes in toxic organic-contaminated soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 254-259.

Walker, R.L. & Newman, A.S., 1956. Microbial decomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Appl. Microbiol.* 4 : 201-206.

Watanabe, T., 1963. Infective hereditary of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 27 : 87.

Weeks, O.B., 1955. *Flavobacterium aquatile* (Frankland and Frankland) Bergey *et al.*, type species of the genus *Flavobacterium*. *J. Bacteriol.* 69 : 649-658.

Weightman, A.J., Don, R.H., Lehrbach, P.R. & Timmis, K.N., 1984. The identification and cloning of genes encoding haloaromatic catabolic enzymes and the construction of hybrid pathways for substrates mineralization. In "Genetic control of environmental pollutants." Omenn, G.S., & Hollaender, A. Eds. Plenum Press New York. *Basic Life Sciences* 28 : 47-80.

Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C. & Richardson, C.C., 1968. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI Further purification and prospecties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* 243 : 4543.

Weissenfels, W.D., Beyer, M. & Klein, J., 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 479-484.

Weisshaar, M.-P., Franklin, F.C.H. & Reineke, W., 1987. Molecular cloning and expression of the 3-chlorobenzoate degrading genes from *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.* 169 (1) : 394-402.

Wheatcroft, R. & Williams, P.A., 1981. Rapid methods for the study of both stable and unstable plasmids in *Pseudomonas*. *J. Gen. Microbiol.* 124 : 433-437.

Willets, N. & Crowther, C., 1981. Mobilization of the non-conjugative IncQ plasmid RSF1010. *Genet. Res. Camb.* 37 : 311-316.

Willetts, N. & Johnson, D., 1981. pED100, a conjugative plasmid derivative without insertion sequences. *Mol. Gen. Genet.* 182 : 520-522.

Williams, P.A. & Murray, K., 1974. Metabolism of benzoate and methylbenzoate by *Pseudomonas putida* (Arvilla) in mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 120 (1) : 416-423.

Williams, P.A. & Worsey, M.J., 1976. Ubiquity of plasmids incoding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. *J. Bacteriol.* 125 (3) : 818-828.

Williams, P.A. & Jeenes, D.J., 1981. Origin of catabolic plasmids, pp..144-147. *In* D. Schlessinger ed. , microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Worsey, M.J. & Williams, P.A., 1975. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (*Arvillia*) mt-2: evidence of a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 124 : 7-13.

Yakobson, E. & Guiney, D., 1983. Homology in the transfer origins of broad host range IncP plasmids : definitions of two subgroups of P plasmids. *Mol. Gen. Genet.* 192 : 436-438

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J., 1985. Improved M13 phage vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC18 vectors. *Gene* 33 : 103-119.

Zaitsev, G.M. & Baskunov, B.P., 1985. Utilization of 3-chlorobenzoic acid by *Acinetobacter calcoaceticus* . *Mikrobiologiya.* 54 : 203-208.

Zehnder, A.J.B., 1992. Biodegradation of xenobiotic compounds. Communication au troisième congrès de la société française de microbiologie. 21-24 Avril 1992.Lyon France.

ISOLEMENT D'UNE COMMUNAUTÉ MICROBIENNE DÉGRADANT L'ACIDE 2,4-DICHLOROPHÉNOXYACÉTIQUE À PARTIR D'UN SOL DE DIJON. CARACTÉRISATIONS CINÉTIQUE ET GÉNÉTIQUE DES SOUCHES IMPLIQUÉES

REMERCIEMENTS

ABRÉVIATIONS

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....1

PREMIERE PARTIE : SÉLECTION D'UNE COMMUNAUTÉ MICROBIENNE DÉGRADANT L'ACIDE 2,4-DICHLOROPHÉNOXYACÉTIQUE. CARACTÉRISTIQUES BIOCINÉTIQUES DE LA DÉGRADATION. :

I. APPROCHE BIBLIOGRAPHIQUE

1-Introduction.....	16
2-Le modèle expérimental. Justification du choix de la culture continue.....	17
3-Formalisation du problème.....	19
4- Cas d'une espèce microbienne cultivée dans un milieu où un seul substrat est limitant. Le modèle de Monod et ses conséquences.....	19
5- Variantes au modèle de Monod (1952).....	22
5.1 Les dérivés du modèle de Monod.....	23
5.2 Introduction de l'énergie de maintenance.....	24
5.3 Introduction de l'hétérogénéité spatiale : l'adhésion des micro-organismes aux parois.....	25
6-Généralisation au cas où plusieurs espèces rentrent en compétition vis à vis d'un même substrat.....	26
6.1 Modélisation de la culture mixte en chémostat.....	26
6.2 Remarques à propos du principe d'exclusion.....	28
6.3 Etudes théoriques de la coexistence.....	29
7 Lorsque plusieurs espèces entrent en compétition pour plus d'un substrat limitant.....	30

II APPROCHE EXPÉRIMENTALE

A Matériels et méthodes

1- Matériel de fermentation utilisé pour la sélection de la communauté dégradante.....	33
1.1 Description du chémostat.....	33

1.2 Milieux d'alimentation du chémostat.....	34
2- Milieux gélosés.....	34
3- Méthodes de mesures de l'activité dégradante.....	34
3.1 Mesure de l'activité dégradante dans le chémostat par spectrophotométrie U.V.....	34
3.2 Dispositif expérimental de mesure du $^{14}\text{CO}_2$ dégagé à partir de ^{14}C -2,4-D.....	35
3.3 Milieu de Loos (1975).....	35
4- Isolement, dénombrement et caractérisation des souches du chémostat.....	36
4.1 Isolement et caractérisation des souches.....	36
4.2 Dénombrement des micro-organismes dégradants.....	36
5- Traitement statistique des données.....	36
5.1 Analyse de variance sur données répétées.....	36
5.2 Ajustements.....	37

B Expérimentations

1-Inoculation du chémostat.....	38
2-Activité dégradante initiale dans le chémostat.....	38
2.1 objectif initial.....	38
2.2 Matériel et méthodes.....	39
2.3 Résultats - Discussion.....	39
3- Comparaison de l'activité dégradante de la communauté du chémostat et de la communauté reconstituée à partir des souches isolées de celui-ci.....	40
3.1 Matériel et méthode.....	40
3.2 Résultats-Discussion.....	41
4- Enrichissement du chémostat en micro-organismes dégradants.....	42
4.1 Objectif.....	42
4.2 méthode d'enrichissement.....	42
4.3 sélection d'une communauté réduite dégradant le 2,4-D.....	42
5-Recherche du rôle des micro-organismes composant la communauté dégradante.....	43
5.1 Objectifs.....	43
5.2 Dispositif utilisé.....	44
5.3 Principe de l'analyse statistique appliquée: l'ANOVA et la MANOVA sur mesures répétées.....	45
5.4 Résultats-Discussion.....	46
5.4.1 Minéralisation de la chaîne latérale de la molécule de 2,4-D.....	46
-Analyse de l'effet souche.....	46
-analyse de l'interaction souche-temps et discussion.....	47
5.4.2 Minéralisation du cycle.....	49
6-Dégradation du 2,4-D par des associations microbiennes de la communauté du chémostat.....	51
6.1 buts et limites d'une étude préliminaire.....	51
6.2 Matériel et méthodes.....	52
6.3 Résultats.....	52
6.3.1 Minéralisation du cycle.....	52
6.3.2 Minéralisation de la chaîne.....	53
6.3.3 Comparaison des cinétiques de minéralisation du cycle et de la chaîne latérale de la molécule de 2,4-D.....	54

7-Comparaison des cinétiques de minéralisation du 2,4-D marqué sur le cycle par la souche C seule et par la communauté reconstituée.....	54
7.1 objectif de l'étude.....	54
7.2 comportement des courbes et définition d'un modèle.....	55
7.2 Pondération des mesures expérimentales.....	56
7.3 Modèles ajustés et méthodes utilisées.	57
7.4 Le test du rapport de vraisemblance.....	57
7.5 Résultats -discussion.....	58
8 Recherche de relations trophiques entre les souches de la communauté dégradant le 2,4-D.	60
8.1 Matériel et méthode.....	60
8.2 Résultats.....	61
9 Détermination du taux de croissance d' <i>A. paradoxus</i> TV1 (souche C) dégradant le 2,4-D en culture continue en fonction du taux de dilution.	62
9.1 Matériel et méthodes.....	62
9.2 Résultats -Discussion.....	62
10 Conclusions.....	63

CHAPITRE II

CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE D'UNE SOUCHE D'*ALCALIGENES PARADOXUS* DÉGRADANT L'ACIDE 2,4-DICHLOROPHÉNOXYACÉTIQUE. LOCALISATION DES GENES IMPLIQUÉS DANS LA DÉGRADATION DU PESTICIDE.

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE: MISE EN EVIDENCE DU ROLE DES PLASMIDES DANS LA DEGRADATION DES COMPOSES XENOBIOTIQUES

1-Aspects historiques.....	65
1.1 Introduction.....	65
1.2 Mise en évidence des premiers plasmides de dégradation.....	66
1.3 Vers la mise au point de techniques d'isolement plasmidique applicables aux bactéries du sol.....	67
1.4 Des plasmides sont également impliqués dans la dégradation des composés xénobiotiques.....	68
1.5 Transferts et expression des gènes plasmidiques.....	71
1.6 Tentatives de mise en évidence des transferts d'information génétique en culture continue.....	73
2- Considérations evolutionistes sur l'origine et le devenir des gènes de dégradation.....	76
3- élaboration de la carte physique d'un plasmide codant pour la dégradation de l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique.....	79
3.1 La mutagénèse transpositionnelle - une méthode autorisant l'élaboration de cartes physiques et la localisation de gènes intervenant dans une voie métabolique.	79
3.2 Mise en évidence de la localisation plasmidique des gènes impliqués dans la dégradation du 2,4-D chez <i>A. eutrophus</i> JMP134.	81

3.3 A la recherche du gène codant pour la monooxygénase.....	83
3.4 "Recrutement" d'une maleylacétate réductase chromosomique pour la voie de dégradation du 2,4-D chez <i>A.</i> <i>eutrophus</i> JMP134.....	85
3.5 Mise en évidence de <i>tfdCII</i> chez <i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP134.....	85
3.6 Régulation des gènes de dégradation.....	86

II EXPÉRIMENTATION

A. Matériel et méthodes

1- Souches utilisées et plasmides.....	90
2- Milieux et conditions de culture.....	90
3- Méthodes moléculaires.....	90
3.1 Préparations d'ADN plasmidique.....	90
3.2 Profils de restriction.....	92
3.3 Electrophorèse en gel d'agarose.....	92
3.4 Transfert d'ADN sur membrane.....	92
3.5 Purification des sondes.....	93
3.5 Marquage des sondes et hybridations.....	93
3.6 Ligations et transformations.....	94
3.7 Conjugaisons.....	94

B Expérimentations

1- Caractéristiques métaboliques d' <i>Alcaligenes paradoxus</i> TV1.....	95
1.1 Objectifs.....	95
1.2 Matériels et méthodes.....	95
1.3-Résultats -Discussion.....	96
1.3.1 Spectres d'utilisation de substrats et spectres de résistance.....	96
1.3.2 Concentration en 2,4-D inhibitrice pour la croissance.....	97
1.3.3 Stabilité de la capacité dégradante.....	97
2-Présence d'un plasmide dans la bactérie.....	98
2.1 Objectifs.....	98
2.2 Matériel et méthodes.....	98
2.3 Résultats.....	99
3- Localisation des gènes codant pour la dégradation du 2,4-D.....	99
3.1 Objectifs généraux et techniques envisageables.....	99
3.2 Hybridations.....	100
3.2.1. Matériel et méthodes.....	100
3.2.2 Résultats.....	100
3.3 Mutagenèse transpositionnelle.....	101
3.3.1 Objectifs.....	101
3.3.2 Matériel et méthodes.....	103
3.3.3 Résultats.....	104
3.4 Clonage du fragment <i>EcoRI</i> de pTV1 hybridant avec pJP4 dans un vecteur d' <i>E. coli</i>	104

3.4.1 objectifs.....	104
3.4.2 Matériel et méthodes.....	105
3.4.3 Résultats-Discussion.....	106
3.5 Clonage du fragment <i>EcoRI</i> de pTV1 hybridant avec pJP4 dans un vecteur à large spectre d'hôte.....	107
3.5.1 objectifs et possibilités de réalisation.....	107
3.5.2 Matériel et méthodes.....	108
3.5.3 Résultats.....	110
3.6 Transfert de pTV3 (vecteur à large spectre d'hôte pLAFR3 portant le fragment cloné de pTV1 homologue à pJP4) chez <i>A.</i> <i>eutrophus</i> JMP222 et étude de l'expression des gènes clonés.....	111
3.6.1 matériel et méthodes.....	111
3.6.2 Résultats.....	111
4- Transmissibilité et spectre d'hôte de pTV1.....	112
4.1 Objectifs généraux et principes de l'expérimentation.....	112
4.2 Première expérience.....	112
4.2.1 Matériel et méthodes.....	112
4.2.2 Résultats-Discussion.....	113
4.3 Vérification de la mobilité du transposon.....	113
4.3.1 Matériel et méthodes.....	113
4.3.2 Résultats.....	114
4.4 PTV1 possède-t-il des gènes <i>tra</i> fonctionnels?.....	114
4.4.1 Principe.....	114
4.4.2 Matériel et méthodes.....	115
4.4.3 Résultats.....	115
4.5 PTV1 possède-t-il des gènes <i>mob</i> fonctionnels?.....	116
4.5.1 Matériel et méthodes.....	116
4.5.2 Résultats- Discussion.....	116
4.6 PTV1 est-il conjugatif mais à spectre d'hôte restreint à la souche mère?.....	117
4.6.1 Objectif et principe.....	117
4.6.2. Sélection de mutants d' <i>A. paradoxus</i> résistants à l'acide nalidixique.....	118
4.6.2.a Principe.....	118
4.6.2.b Matériel et méthode.....	118
4.6.2.c Résultats.....	118
4.6.3. Tentative de guérissage de pTV1.....	119
4.6.3.a Matériel et méthode.....	119
4.6.3.b Résultats.....	119

TROISIEME PARTIE :
EXISTENCE D'HOMOLOGIES ENTRE SIX SOUCHES
BACTÉRIENNES DÉGRADANT L'ACIDE 2,4-
DICHLOROPHÉNOXYACÉTIQUE DE DIVERSES PROVENANCES
UTILISATION DES SONDES POUR LA MISE EN ÉVIDENCE DES
MICRO-ORGANISMES DÉGRADANT LE 2,4-D.

I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE : DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES DE SÉLECTION ET D'IDENTIFICATION DES MICRO-ORGANISMES DÉGRADANT LES PESTICIDES DANS L'ENVIRONNEMENT

1- Introduction.....	123
2- Dénombrements par Mesures d'activités.....	124
1.1 Méthodes mesurant la disparition du substrat.....	124
2.2 Mesures de minéralisation du ¹⁴ C-2,4-D.....	124
2 -Premières tentatives de caractérisation de la diversité des micro-organismes dégradants à l'aide de Méthodes d'isolement et d'enrichissement sélectif.....	125
3- Méthodes s'appuyant sur les techniques de la biologie moléculaire et l'utilisation de sondes.....	128
3.3 Intérêt de ces homologies pour la recherche de micro-organismes spécifiques.....	130
4.3 Les techniques d'hybridation ADN/ADN sur colonies.....	130
4-Conclusions.....	131

II APPROCHE EXPÉRIMENTALE

A Principes et objectifs de ce travail

B Matériel et méthodes

1-Souches utilisées et conditions de culture.....	134
2- Méthodes moléculaires.....	135
2.1 Isolement préparatif d'ADN total.....	135
2.2 Profil de restriction d'ADN total.....	135
2.3 Purification des sondes.....	135
2.4 Hybridations.....	136

C Expérimentations

1-caractéristiques métaboliques des souches à l'égard du 2,4-D.....	136
1.1 Matériel et méthodes.....	136
1.2 Résultats.....	137
2- Recherche d'homologies entre des souches dégradant le 2,4-D d'origine variée (France, Australie, Indonésie, Grande-Bretagne).....	137
2.1 Matériel et méthodes.....	137

2.2 Hybridation de profils de restriction d'ADN de souches dégradant ou non le 2,4-D avec la sonde tfdA.....	138
2.3 Hybridation de profils de restriction d'ADN de souches dégradant ou non le 2,4-D avec la sonde formée du fragment EcoRI"H" de pTV1	138
2.3 Comparaison des profils d'hybridation entre les souches capables de croître sur 2,4-D.....	139
3- Confirmation de la présence homologies entre souches dégradant le 2,4-D par Hybridation de colonies sur membranes.....	140
3.1 Principe	140
3.2 matériel et méthodes.....	141
3.3 Résultats- discussion.....	141
4 Homologies entre les souches isolées de la communauté du chémostat.	142
4.1 Matériel et méthodes.....	142
4.2 Résultats	142

DISCUSSION GÉNÉRALE

Exclusion compétitive ou coexistence?.....

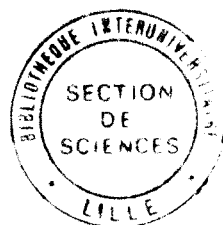
Implication d'un plasmide dans la dégradation du 2,4-D chez A. paradoxus TV1 (souche C).....

Mutations spontanées adaptatives ou transfert d'information génétique?.....

Les gènes impliqués dans la dégradation du 2,4-D chez des bactéries d'origine différente sont-ils homologues?

ANNEXES

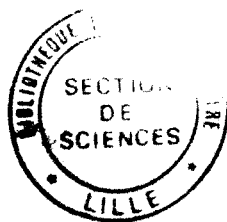
BIBLIOGRAPHIE



A microbial community degrading the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid was isolated from a chemostat inoculated with Dijon soil using continuous culture in medium containing 2,4-D as sole carbon source. The strain *Alcaligenes paradoxus* TV1 was shown to be responsible for the 2,4-D mineralization in the chemostat. The 3 other strains of the 2,4-D degrading community seemed to accelerate the 2,4-D mineralization rate by *A. paradoxus* TV1 as shown by ¹⁴C-2,4-D mineralization experiments. The introduction of an other carbon source in the 2,4-D medium inoculated with *A. paradoxus* had the same effect. These results suggest that some trophic relations exist between the community members.

A plasmid pTV1 was isolated from *A. paradoxus* TV1 which had an approximate size of 200 Kb. An 11.5 *Eco*RI fragment from this plasmid was shown to be homologous to the *tfd* genes carried by the plasmid pJP4 of the 2,4-D degrading strain *A. eutrophus* JMP134. It was cloned into the broad host range cosmid pLAFR3 to form the plasmid pTV3. The introduction of pTV3 into the cured non-degrading strain *A. eutrophus* JMP222 allowed this strain to grow on 2,4-D as sole carbon source.

The cloned fragment from pTV1 was then used to search for homology between 2,4-D degrading strains of different origin (Great-Britain, France, Indonesia, Australia). Homologies were found with these strains and the *Eco*RI fragment from pTV1 carrying *tfd* genes of *A. paradoxus* TV1.



résumé

Une communauté microbienne stable dégradant l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et composée de quatre souches microbiennes a été isolée du sol de Dijon. Elle est maintenue depuis 3 ans dans un chémostat alimenté par un milieu comprenant du 2,4-D comme seule source de carbone. La dégradation du 2,4-D dans le chémostat est essentiellement due au métabolisme de la molécule par l'un des membres de la communauté, une souche d'*Alcaligenes paradoxus*. L'utilisation de 2,4-D marqué au carbone 14 sur la chaîne latérale et sur le cycle a montré que cette souche était capable de dégrader complètement l'herbicide. Les trois autres membres de la communauté sont également capables de dégrader la molécule de 2,4-D, mais avec une certaine phase de latence. D'après le principe d'exclusion, si les souches avaient été en compétition vis-à-vis du substrat dans le chémostat, l'expérience aurait dû conduire à l'élimination des souches les moins adaptées. Nos études nous ont permis de montrer que la présence des trois autres souches de la communauté permettait d'accroître la vitesse de dégradation du 2,4-D par *A. paradoxus*. L'apport d'une autre source carbonée à une culture pure d'*A. paradoxus* a le même effet, ce qui suggère que des relations trophiques existent entre les différentes souches de la communauté dégradante.

Un plasmide pTV1 d'environ 200 kb a été mis en évidence chez la souche d'*A. paradoxus* dégradant le 2,4-D. Des fragments de ce plasmide présentaient des homologies avec le plasmide pJP4 d'*A. eutrophus* JMP134. Cette homologie était toujours observée lorsque les gènes de dégradation du 2,4-D portés par pJP4 étaient utilisés comme sonde. Le fragment *EcoRI* "H" de 11,5 kb de pTV1 responsable de l'homologie entre ces deux plasmides a été cloné dans le vecteur pHG327 pour former le plasmide pTV2. La souche JM107 d'*E. coli* transformée par ce plasmide n'a présenté aucune activité de dégradation vis à vis du 2,4-D. Ce fragment a alors été introduit dans le cosmide à large spectre d'hôte pLAFR3 pour former le plasmide pTV3. Une conjugaison réalisée entre la souche *E. coli* JM107 transformée par pTV3 et la souche guérie JMP222 d'*A. eutrophus* dépourvue d'activité dégradante a permis de sélectionner une souche d'*A. eutrophus* porteuse du plasmide pTV3 pour laquelle la capacité à dégrader le 2,4-D avait été restaurée. Il a ainsi été montré que les gènes de dégradation du 2,4-D d'*A. paradoxus* étaient portés par son plasmide pTV1. Le fragment cloné à partir de pTV1 a alors été utilisé comme sonde pour rechercher l'existence d'homologie avec des souches dégradant le 2,4-D d'origines éloignées (Grande-Bretagne, France, Indonésie, Australie). Une homologie a été mise en évidence entre l'ensemble de ces souches. Celle-ci était dans l'ensemble plus forte entre des souches de même provenance et semblait alors correspondre à des fragments conservés chez les différentes souches. Une méthode de recherche des bactéries dégradant le 2,4-D dans les milieux naturels s'appuyant sur ces résultats devrait pouvoir être mise au point.

