

T 50 1210/1994 / 80 bis

11 JUIL 1994

N° d'ordre : 115-94

Année 1994

THESE  
présentée devant  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I  
pour l'obtention du  
DIPLOME DE DOCTORAT

par

Cécile PONSONNET

STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS D'AGROBACTERIUM  
APPORT À L'ECOLOGIE DES PLASMIDES TI



JURY :	L. JOUANIN	Directeur de recherche au CNRS	Rapporteur
	J. PINON	Directeur de recherche à l'INRA	Rapporteur
	H. BOUZAR	Professeur associé	Rapporteur externe
	P. NORMAND	Directeur de recherche au CNRS	
	X. NESME	Ingénieur de recherche à l'INRA	



# T50/210/1994/80 bis

Président de l'Université  
1er Vice-Président Fédération Santé  
1er Vice-Président Fédération Sciences  
Président du Comité de coordination  
des Etudes Médicales  
Secrétaire Général

M. le Professeur G. FONTAINE  
M. le Professeur P. ZECH  
M. le Professeur Y. LEMOIGNE  
  
M. le Professeur P. ZECH  
M. J. FLACHER

## FEDERATION SANTE

- UFR de Médecine GRANGE-BLANCHE
- UFR de Médecine ALEXIS-CARREL
- UFR de Médecine LYON-NORD
- UFR de Médecine LYON-SUD
- Institut des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques
- UFR d'Odontologie
- INSTITUT DES TECHNIQUES DE READAPTATION
- Département de Biologie Humaine
- Département d'INNOVATION ET DE COORDINATION PEDAGOGIQUE

Directeur : Mme le Pr PELLET  
Directeur : M. le Pr. EVREUX  
Directeur : M. le Pr. PATRICOT  
Directeur : M. le Pr. DEJOUR  
  
Directeur : M. le Pr VILLARD  
Directeur : M. le Pr. MAGLOIRE  
Directeur : M. le Pr. EYSSETTE  
Directeur : M. le Pr. BRYON  
  
Directeur : M. le Pr. LLORCA

## FEDERATION SCIENCES

- Institut DES SCIENCES DE LA MATIERE
- Institut DES SCIENCES DE L'INGENIERIE ET DU DEVELOPPEMENT TECHNOLOGIQUES
- Institut de CHIMIE ET BIOLOGIE
- Institut d'ANALYSE DES SYSTEMES BIOLOGIQUES ET SOCIO-ECONOMIQUES
- Institut DES SCIENCES DE LA TERRE DE L'OCEAN, DE L'ATMOSPHERE, DE L'ESPACE ET DE L'ENVIRONNEMENT
- UF des ACTIVITES PHYSIQUES ET SPORTIVES
- I.U.T. A
- I.U.T. B
- Département de 1er Cycle pluridisciplinaire Sciences
- Département de 2ème Cycle
  - Sciences de la Vie et de la Terre
  - Sciences pour l'Ingénieur
  - Sciences de l'Analyse et de la Matière

Directeur : M. le Pr. ELBAZ  
Directeur : M. le Pr. DIMNET  
Directeur : Mme VARAGNAT, MDC  
  
Directeur : M. le Pr. LEGAY  
  
Directeur : M. le Pr. ELMI  
Directeur : M. le Pr. CAMY  
Directeur : M. le Pr. GTELLY  
Directeur : M. le Pr. PIVOT  
  
Directeur : M. PONCET, MDC  
Directeur : M. le Pr. BLANCHET  
Directeur : M. le Pr. BETHOUX  
  
Directeur : M. le Pr. VIALLE

Je tiens à remercier Mr Bardin pour m'avoir accueillie dans le laboratoire d'Ecologie Microbienne du Sol ainsi que X. Nesme pour m'avoir confié ce sujet de Thèse et pour le suivi de ce travail pendant ces trois années.

Je remercie également toutes les personnes du jury qui ont jugé ce travail et en particulier P. Normand pour avoir accepté de diriger ces recherches.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## TABLE DES MATIERES

	page
Table des matières	i
Résumé	iv
Liste des figures, tableaux et annexes	v
Liste des abréviations	ix
 <b>INTRODUCTION GENERALE</b>	 1
 <b>PARTIE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>Chapitre I. Introduction à l'étude des populations bactériennes</b>	4
1. Populations ou peuplements bactériens?	4
2. Intérêts de l'étude des populations bactériennes	5
3. Méthodes d'étude des populations bactériennes	6
<b>Chapitre II. Populations d'<i>Agrobacterium</i></b>	10
Introduction: rappels sur la biologie d' <i>Agrobacterium</i>	10
1. Diversité chromosomique et plasmidique	11
1.1 Diversité chromosomique	11
1.2 Diversité des plasmidesTi	13
2. Populations naturelles d' <i>Agrobacterium</i> : abondance et diversité	20
2.1 Densité de populations dans les sols	20
2.2 Structure génétique des populations d' <i>Agrobacterium</i>	22
2.3 Description du modèle épidémiologique étudié	23
<b>CONCLUSION DE LA PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	28
 <b>PARTIE II MATERIEL ET METHODES</b>	
<b>1. Echantillonnage des isolats d'<i>Agrobacterium</i></b>	29
1.1 Matériel végétal	29
1.2 Caractéristiques des sols	30
1.3 Matériel bactérien	30
1.4 Dénombrements bactériens à partir du sol de Peyrat	31
<b>2. Caractérisation des isolats d'<i>Agrobacterium</i></b>	32
2.1 Caractérisation sérologique	32
2.2 Identification des isolats par PCR-RFLP	32
2.3 Analyse et interprétation des données de PCR-RFLP	37
<b>3. Caractérisation d'un élément d'insertion</b>	40
3.1 Localisation de l'insertion	40
3.2 Caractérisation de l'insertion par séquençage	40



3.3 Détection de l'IS292	44
4. Test du pouvoir tumorigène	45

### **PARTIE III. CARACTERISATION DES *AGROBACTERIUM* AUX NIVEAUX CHROMOSOMIQUE ET PLASMIDIQUE PAR LA METHODE DE PCR-RFLP**

INTRODUCTION	46
RESULTATS ET DISCUSSION	48
1. Analyse des fonds chromosomiques	48
1.1 Polymorphisme du gène 16S de l'opéron ribosomique	48
1.1.1 Résultats d'amplification et vérification de la spécificité	48
1.1.2 Discrimination des espèces par le polymorphisme du gène 16S	48
1.2 Polymorphisme de la région comprenant le gène 16S et l'IGS	49
1.2.1 Résultats d'amplification et vérification de la spécificité	49
1.2.2 Discrimination des souches par le polymorphisme de l'IGS	49
2. Analyse des plasmides Ti	52
2.1 Polymorphisme de la région de virulence	52
2.1.1 Résultats d'amplification et vérification de la spécificité	52
2.1.2 Discrimination de groupes de plasmides Ti	52
2.2 Polymorphisme au niveau du T-DNA	52
2.2.1 Résultats d'amplification et vérification de la spécificité	52
2.2.2 Discrimination de types parmi les plasmides Ti à nopaline	53
2.3 Comparaison de l'analyse des deux régions plasmidiques	54
3. Analyse simultanée des chromosomes et des pTi:	
caractérisation des génotypes	56
CONCLUSION	57

### **PARTIE IV. ETUDE DE LA STRUCTURE GENETIQUE DE POPULATIONS NATURELLES D'*AGROBACTERIUM***

INTRODUCTION	58
RESULTATS	59
1. Rappel sur la nature des populations analysées	59
2. Diversité génétique des populations naturelles d' <i>Agrobacterium</i>	59
2.1 Analyse sérologique	59
2.2 Analyse par PCR-RFLP	60
2.3 Structure des populations: fréquences des génotypes et indices de diversité	63
3. Comparaison de la structure génétique des populations d' <i>Agrobacterium</i>	68
3.1 Génotypes majoritaires	68
3.2 Génotypes minoritaires	69

DISCUSSION	70
1. Intérêt de la méthode de PCR-RFLP pour l'étude des populations d' <i>Agrobacterium</i>	70
Apport de la méthode de PCR-RFLP par rapport à la sérologie	70
Identité des plasmides Ti: lien épidémiologique entre les deux pépinières modèles	71
Identité des fonds chromosomiques: prépondérance de la transmission verticale des pTi	72
2. Apport de cette étude à l'écologie d' <i>Agrobacterium</i>	72
La tumeur: site privilégié de la diversité	72
Influence du passage par la plante ou le sol sur la dissémination des pTi	74
Adaptation écologique des espèces?	76
CONCLUSION	78
 PARTIE V. DESCRIPTION D'UN ELEMENT D'INSERTION: IMPLICATIONS POUR LES POPULATIONS DE PLASMIDES TI	
INTRODUCTION	79
RESULTATS	80
1. Mise en évidence d'un élément d'insertion dans le T-DNA	80
1.1 Détection d'une insertion dans le T-DNA	80
1.2 Localisation de l'insertion	80
1.3 Caractérisation de la séquence insérée	81
1.4 Recherche de séquences homologues	82
1.5 Comparaison des différents pTi292	84
2. Effet de la présence de l'IS292 sur le pouvoir tumorigène	84
3. Comparaison des associations 2177/pTi2177 et 2177/pTi292	85
3.1 Comparaison des plasmides Ti de types 2177 et 292	85
3.2 Comparaison des ribotypes 2177 associés aux plasmides Ti 2177 et 292	85
4. Recherche de l'IS292 dans les populations d' <i>Agrobacterium</i>	86
DISCUSSION	88
1. IS292: un nouvel élément d'insertion associé au genre <i>Agrobacterium</i>	88
2. Similitude des IS292 et ISR11 détectées chez <i>Agrobacterium</i> et <i>Rhizobium</i>	89
3. Conséquences de la transposition d'éléments mobiles dans le génome d' <i>Agrobacterium</i>	90
4. Hypothèse de transposition dans les populations de plasmides Ti	91
CONCLUSION	93
 CONCLUSION GENERALE	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	98
ANNEXES	



## Résumé

*Agrobacterium* est une bactérie saprophyte du sol. Les souches pathogènes d'*Agrobacterium* sont caractérisées par la présence du pTi, plasmide conjugatif support du pouvoir tumorigène. La structure génétique des populations naturelles d'*Agrobacterium* a été étudiée à partir d'une épidémie de crown gall sur peuplier afin de préciser le rôle de la dissémination des plasmides Ti sur le maintien des souches tumorigènes dans le sol.

L'épidémie étudiée concernait les pépinières d'Orléans origine de l'épidémie, et de Peyrat plantée en boutures de peuplier en provenance d'Orléans. Cette étude de la structure génétique des populations d'*Agrobacterium* nécessitait de prendre en compte les plasmides Ti et les fonds chromosomiques. La méthode de PCR-RFLP offre la possibilité de cibler, d'une part les fonds chromosomiques (opéron ribosomique), et d'autre part les plasmides Ti (région de virulence et T-DNA) par le choix d'amorces spécifiques de ces deux compartiments du génome. L'analyse de l'opéron ribosomique par la méthode de PCR-RFLP permet une discrimination au niveau de l'espèce par le polymorphisme du gène 16S, et au niveau infraspécifique par le polymorphisme de l'intergène entre les gènes 16S et 23S (définissant les ribotypes). L'analyse du polymorphisme de la région comprise entre les gènes *tmr* et *nos* du T-DNA a permis l'identification des plasmides Ti en cause dans l'épidémie étudiée.

L'identité des types de plasmides Ti et des ribotypes détectés dans les différentes populations d'*Agrobacterium* issues des deux pépinières étudiées a permis de confirmer le lien épidémiologique entre celles-ci. Les populations d'*Agrobacterium* sont caractérisées par la présence de différents génotypes d'abondances relatives variées. Cette complexité est déjà observable à l'échelle de la tumeur, avec des isolats de différentes espèces, types chromosomiques et types plasmidiques. Ces résultats ont permis de montrer l'intérêt de l'outil PCR-RFLP pour l'étude des populations d'*Agrobacterium*. La présence d'une population d'*Agrobacterium* majoritaire transmise par la plante ou par le sol, indique une prolifération des plasmides Ti par multiplication clonale des *Agrobacterium* tumorigènes prépondérante en conditions naturelles. Par ailleurs, il apparaît que les populations tumorales ayant été en contact avec le sol sont plus diverses. Cette diversité est due à la présence de différents génotypes minoritaires spécifiques à la pépinière de Peyrat hébergeant des types plasmidiques détectés dans la pépinière d'Orléans. Ce résultat, et le fait que différents fonds chromosomiques soient associés à un même type de plasmide Ti, suggèrent l'existence de transferts de plasmides Ti par conjugaison vers les *Agrobacterium* indigènes du sol.

D'autre part, un nouvel élément d'insertion, IS292, a été caractérisé dans les populations de plasmides Ti. Son rôle dans la diversité des plasmides Ti des populations d'*Agrobacterium* étudiées a été suggéré. La détection de cet élément dans différents génotypes composant les populations étudiées pose la question de l'importance d'événements de transposition dans la stabilité des génomes composant les populations naturelles d'*Agrobacterium*.

## LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES

## Partie I. Etude bibliographique

Figure 1	Exemple théorique illustrant les concepts de richesse et d'équitabilité.	7
Figure 2.	Cycle biologique d' <i>Agrobacterium</i> et mode de prolifération des plasmides Ti.	10
Tableau 1.	Caractéristiques biochimiques permettant la détermination des biovars du genre <i>Agrobacterium</i> .	11
Figure 3.	Arbre phylogénétique de la famille des <i>Rhizobiacées</i> dérivé des séquences du gène 16S.	12
Figure 4.	Schéma général de l'infection des cellules végétales par <i>Agrobacterium</i> .	13
Figure 5.	Carte génétique du pTiC58 à nopaline.	14
Tableau 2.	Liste et comparaison des principaux gènes de la région de virulence.	14
Tableau 3.	Liste et comparaison des principaux gènes du T-DNA.	14
Figure 6.	Organisation génétique de la région <i>vir</i> des plasmides Ti à octopine et à nopaline.	15
Figure 7.	Organisation génétique du T-DNA.	16
Figure 8.	Mécanismes impliqués dans le processus de transposition.	17
Figure 9.	Excision et inversion des éléments répétés par recombinaison.	18
Tableau 4.	Liste et principales caractéristiques des éléments d'insertion connus chez <i>Agrobacterium</i> .	19
Figure 10.	Modèle de transposition des IS867 et IS866 dans les plasmides Ti et les chromosomes des souches à octopine/cucumopine.	19

## Partie II. Matériel et Méthodes

Figure 11.	Plan du dispositif piège installé dans la pépinière de Peyrat.	29
Tableau 5.	Caractéristiques des sols des deux pépinières.	30
Tableau 6.	Nombre de tumeurs à l'origine des isolats de biovar 1 et 2 pour chaque population.	31
Tableau 7.	Liste des souches d' <i>Agrobacterium</i> de collection.	33
Tableau 8.	Liste des amorces utilisées pour les réactions d'amplification.	34
Figure 12.	Localisation des amorces d'amplification.	34
Figure 13.	Carte de restriction de la région du T-DNA contenant l'insertion.	40
Figure 14.	Stratégie de clonage utilisée pour le séquençage des extrémités de l'insertion et la comparaison des plasmides Ti 2177 et 292.	41
Figure 15.	Matériel utilisé pour le clonage et le séquençage de l'insertion.	41
Tableau 9.	Liste des amorces utilisées pour les réactions de séquençage.	41



Figure 16.	Histogramme représentant la variabilité des séquences ribosomiques entre deux souches de <i>Frankia</i> .	46
Figure 17.	Cartes de restriction du gène 16S obtenues avec les enzymes <i>NdeII</i> , <i>TaqI</i> et <i>HaeIII</i> .	48
Tableau 10.	Sites de restriction <i>NdeII</i> , <i>TaqI</i> , et <i>HaeIII</i> du gène 16S.	48
Figure 18.	Profils de restriction du gène 16S obtenus avec les enzymes <i>NdeII</i> , <i>TaqI</i> et <i>HaeIII</i> .	48
Figure 19.	Amplification avec les amorces FGPS6 et FGPL132'.	49
Figure 20.	Exemples de profils de restriction de la région 16S6-23S132 de souches de collection d' <i>A. tumefaciens</i> , <i>A. rhizogenes</i> et <i>A. vitis</i> obtenus avec l'enzyme <i>TaqI</i> .	49
Tableau 11.	Estimation des distances génétiques entre les séquences 16S8-23S132.	50
Figure 21.	Dendrogramme représentant les relations entre les séquences de la région 16S6-23S132 des souches de collection basé sur l'analyse UPGMA.	50
Tableau 12.	Résultats d'amplification obtenus avec les amorces FGP <i>virA</i> 2275/FGP <i>virB</i> 2164 et FGP <i>tmr</i> 530/FGP <i>nos</i> 975.	52
Figure 22.	Carte de restriction de la région <i>virA</i> 2275- <i>virB</i> 2164 illustrant les trois groupes VIR1, VIR2 et VIR3.	52
Figure 23.	Hybridation des produits d'amplification avec le fragment d'ADN de 3600pb de la souche C58 comme sonde.	53
Figure 24.	Profils de restriction de la région <i>tmr</i> 530- <i>nos</i> 975 obtenus avec les enzymes <i>TaqI</i> , <i>DdeI</i> et <i>RsaI</i> .	53
Tableau 13.	Identification des plasmides Ti à nopaline d'après leurs profils de restriction des régions <i>tmr</i> 530- <i>nos</i> 975 et <i>virA</i> 2275- <i>virB</i> 2164.	53

#### Partie IV. Etude de la structure génétique des populations d'*Agrobacterium*

Tableau 14.	Nombre de tumeurs, d'isolats et de plasmides Ti analysés dans chaque population.	59
Figure 25.	Représentation schématique des profils de restriction de la région 16S6-23S132 obtenus avec l'enzyme <i>TaqI</i> , correspondant aux ribotypes de biovar1.	61
Figure 26.	Exemples de profils de restriction de la région 16S6-23S132: ribotypes d'isolats de biovar1 isolés de tumeur (digestion par <i>TaqI</i> ).	61
Figure 27.	Exemples de profils de restriction de la région 16S6-23S132: ribotypes d'isolats de biovar1 isolés du sol de Peyrat (digestion par <i>TaqI</i> ).	61
Figure 28.	Représentation schématique des profils de restriction de la région 16S6-23S132 obtenus avec l'enzyme <i>HaeIII</i> , correspondant aux ribotypes de biovar2.	61
Figure 29.	Exemples de profils de restriction de la région 16S6-23S132: ribotypes d'isolats de biovar2 isolés de tumeur (digestion par <i>HaeIII</i> ).	61

Figure 30.	Représentation schématique des différents profils de restriction de la région <i>tmr530-nos975</i> de 3600pb obtenus avec les enzymes <i>DdeI</i> et <i>TaqI</i> .	62
Figure 31.	Exemples de profils de restriction de la région <i>tmr530-nos975</i> .	62
Tableau 15.	Evaluation de la diversité intra et inter-tumorale.	63
Tableau 16.	Evaluation de la diversité intra et inter-clones pour la population de biovar1.	63
Figure 32.	Fréquence des différents génotypes des populations tumorales de biovar1.	64
Figure 33.	Fréquence des différents génotypes des populations tumorales de biovar2.	64
Figure 34.	Répartition des différents types de plasmide Ti associés aux populations de biovars 1 et 2 des deux pépinières.	64
Tableau 17.	Fréquence des différents ribotypes détectés dans la population isolée du sol de Peyrat avant la contamination.	66
Tableau 18.	Evaluation de la richesse des populations: nombre de types et indices de Margalef.	66
Tableau 19.	Indices de Shannon (H') des populations d' <i>Agrobacterium</i> de tumeurs et dusol.	67
Tableau 20.	Test du nombre de paires: valeurs de NP* des populations de biovar1.	68
Figure 35.	Distribution des génotypes majoritaires des populations tumorales de biovar1.	68
Tableau 21.	Test du nombre de paires: valeurs de NP* des populations de biovar2.	69
Figure 36.	Distribution des génotypes majoritaires des populations tumorales de biovar2.	69
Tableau 22.	Répartition des ribotypes minoritaires des populations de biovar 1 et 2.	69
Tableau 23.	Test t de comparaison des indices de diversité H' des différentes populations.	69

## Partie V. Description d'un élément d'insertion: implications sur les populations de plasmides Ti

Figure 37.	Comparaison des profils de restriction de la région <i>tmr530-nos975</i> des plasmides pTi2177 et pTi292 obtenus avec les enzymes <i>RsaI</i> , <i>TaqI</i> et <i>DdeI</i> .	80
Figure 38.	Localisation de l'insertion: restriction des fragments <i>tmr530-nos975</i> et <i>6b486-nos975</i> par <i>HindIII</i> , <i>SaII</i> et <i>RsaI</i> .	80
Figure 39.	Structure de l'élément d'insertion: séquences des extrémités et du site d'insertion.	81
Figure 40.	Séquence nucléotidique de l'IS292 et du site d'insertion dans le pTi292.	81
Figure 41.	Localisation et étendue des ORFs de l'IS292.	81
Figure 42.	Comparaison des séquences nucléotidiques des extrémités des éléments d'insertion IS292, IS66, IS866, IS1131, ISR1/1 et ISRm1.	82
Figure 43.	Comparaison des séquences protéiques des éléments IS292 et ISR1/1.	83
Figure 44.	Comparaison de la région <i>6b489-nos975</i> de plusieurs pTi292.	84
Figure 45.	Séquences nucléotidiques partielles des T-DNA 2177 et 292.	85
Tableau 24.	Nombre de bandes communes entre les profils de la région <i>tmr530-nos975</i> du pTi292 par rapport aux autres types de pTi.	85
Tableau 25.	Détection de séquences de type IS292 dans les différents génotypes d' <i>Agrobacterium</i> des populations étudiées.	86



ANNEXE I. Liste des isolats d'*Agrobacterium* analysés répartis par tumeur.

- I.1. Population de la pépinière d'Orléans isolée des boutures de peuplier de 2 ans en 1985.
- I.2. Population de la pépinière de Peyrat isolée des boutures de peuplier de 2 ans en 1987.
- I.3. Population de la pépinière de Peyrat isolée des jeunes boutures de peuplier en 1988.
- I.4. Population de la pépinière de Peyrat isolée des plants de peuplier issus de culture *in vitro* du clone 709.3.

ANNEXE II. Liste des isolats d'*Agrobacterium* isolés du sol de la pépinière de Peyrat.

ANNEXE III. Enzymes de restriction et marqueurs de poids moléculaire.

ANNEXE IV. Taille et nombre des fragments de restriction.

- IV.1. Fragments de restriction du gène 16S.
- IV.2. Fragments de restriction de la région 16S6-23S132.
- IV.3. Fragments de restriction de la région *virA2275-virB2164*'.
- IV.4. Fragments de restriction de la région *tmr530-nos975*.

ANNEXE V. Fréquence des ribotypes dans les quatre populations tumorales.

ANNEXE VI. Fréquence des types plasmidiques dans les quatre populations tumorales.

ANNEXE VII. Fréquence des génotypes dans les quatre populations tumorales.

ANNEXE VIII. Comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques.

## LISTE DES ABREVIATIONS

Aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
AMPPD	3-(2'-spiroadamatane)-4-méthoxy-4-(3"-phosphoryloxy)-phényl-1,2-dioxetane
ARN	acide ribonucléique
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DO	densité optique
EDTA	éthylène diamine tétra acétate
IGS	intergenic spacer (région intergénique)
IS	insertion sequence (sequence d'insertion)
ITS	internal transcribed spacer
kb	kilo base
pb	paire de base
MPN	most probable number (nombre le plus probable)
NP	nombre de paires
nt	nucléotide
ORF	open reading frame (cadre ouvert de lecture)
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyéthylène glycol
pTi	plasmide Ti
PVPP	poly-vinyl-polypyrrolidone
RFLP	restriction fragment length polymorphism (polymorphisme de la taille des fragments de restriction)
SDS	dodécyl sulfate de sodium
T-DNA	ADN transféré
Tris	tris hydro méthyl amino méthane
UPGMA	unweighted pair-group method with arithmetic means
UV	rayons ultra-violet



## INTRODUCTION GENERALE

## INTRODUCTION GENERALE

La maladie de la tumeur du collet (ou "crown gall") se traduit par la formation d'une tumeur au niveau du collet ou sur les racines de nombreuses plantes. L'agent pathogène appartient au genre *Agrobacterium*, bactérie à gram négatif, identifiée en 1907 par Smith et Townsend. DeCleene et DeLey (1976) indique qu'un spectre d'essences végétales comprenant au moins 140 genres, la plupart étant des Dicotylédones, sont sensibles à *Agrobacterium*. Les effets néfastes de cette maladie sont principalement ressentis dans les pépinières d'arbres fruitiers, ornementaux et forestiers, ainsi que sur la vigne.

Le processus tumoral est induit par les substances émises par la plante lors d'une blessure. Le caractère plasmidique de la pathogénie a été mis en évidence par Van Larebecke *et al.* (1974) avec la découverte d'un plasmide d'environ 200kb dans les souches tumorigènes d'*Agrobacterium*. Le plasmide est désigné pTi pour "tumor inducing". Lors du processus infectieux une partie de ce plasmide Ti (ADN de transfert ou T-DNA) est transférée dans la cellule végétale infectée, et intégrée au génome de la plante (Chilton *et al.* 1977). L'expression des gènes portés par le T-DNA est responsable, d'une part, du caractère tumoral lié à la synthèse de phytohormones, et d'autre part, de la production de molécules spécifiques, les opines, qui seront catabolisées par les *Agrobacterium* pathogènes hébergeant un plasmide Ti. La production d'opines par les cellules végétales transformées par le T-DNA crée une niche écologique favorable aux agrobactéries pathogènes. La production de phytohormones est un mécanisme permettant d'amplifier le nombre de cellules végétales sécrétrices d'opine et ainsi d'optimiser la niche écologique.

Le genre *Agrobacterium* comprend des bactéries adaptées au sol, tumorigènes ou non tumorigènes. Depuis leur découverte, la biologie et la génétique des bactéries appartenant au genre *Agrobacterium*, et de leur plasmide Ti ont été largement étudiées. Cependant, de nombreux aspects de leur écologie et notamment celle du plasmide Ti restent à découvrir. Deux modes de propagation des plasmides Ti peuvent être envisagés: un processus dit "vertical" qui résulte de la multiplication clonale des bactéries, et un processus dit "horizontal" résultant du transfert des plasmides Ti entre les *Agrobacterium*. La tumeur constitue le site privilégié de prolifération des *Agrobacterium* tumorigènes. En effet, la présence d'opine dans la tumeur favorise la multiplication clonale des bactéries hébergeant le plasmide Ti. En outre, les opines sont également inductrices du transfert conjugatif des plasmides Ti favorisant ainsi leur prolifération horizontale. La tumeur apparaît donc comme le réservoir principal de souches tumorigènes.

La tumeur est à l'origine de la population d'*Agrobacterium* tumorigènes amenée à être libérée dans le sol à partir de la tumeur. Or, le maintien du potentiel tumorigène dans les sols

peut être expliqué, d'une part par la persistance des souches tumorigènes dans le sol, et d'autre part par le transfert des plasmides Ti à la population indigène du sol. La relation entre la population tumorigène introduite et les *Agrobacterium* non tumorigènes présents dans le sol, en terme d'échanges de plasmides Ti, est un point essentiel pour comprendre le comportement des *Agrobacterium* dans l'environnement sol. La première étape permettant de comprendre l'écologie des agrobactéries et de leur plasmide Ti consiste en une meilleure connaissance de la complexité des populations naturelles d'*Agrobacterium* tumorigènes et non tumorigènes dans les réservoirs que sont la plante et le sol. Cet aspect nécessite une caractérisation des génotypes impliqués dans le développement de la maladie, ainsi que ceux composant les populations indigènes du sol. Il apparaît nécessaire d'aborder cette question en étudiant des populations d'*Agrobacterium* en tenant compte de la diversité des fonds chromosomiques et des plasmides Ti.

Les épidémies de crown gall sont en général sporadiques de par les différents facteurs influant sur la fréquence des attaques (Moore 1976). Dans de nombreux cas les infections sont latentes et ne se déclenchent que sous certaines conditions dépendant de la plante-hôte, du génotype des souches d'*Agrobacterium*, de la saison, du cycle du végétal, et du climat. Dans tous les cas l'historique cultural et sanitaire du site est d'importance sur l'apparition du crown gall. Les nombreux cas de crown gall recensés à travers le monde laissent supposer que *Agrobacterium* est présent dans la plupart des sols cultivés. De plus, la facilité de dissémination des *Agrobacterium* tumorigènes (par l'eau, les outils, les plants, le sol...) et les occasions multiples de blessures des végétaux (par les animaux, les greffes, la taille, les gelées, ...) montrent l'utilité de la prophylaxie afin de minimiser la dissémination des *Agrobacterium* tumorigènes. Ces dernières années une extension importante des fréquences de crown gall a été observée dans les pépinières forestières françaises, notamment chez les peupliers appartenant à la section *Leuce*. Suite à ces manifestations importantes de crown gall, une étude visant à caractériser les populations d'*Agrobacterium* impliquées dans les épidémies des pépinières forestières d'Orléans et de Peyrat-le-Château a été entreprise. Ces populations constituent un modèle intéressant pour l'étude de l'écologie des *Agrobacterium* et des plasmides Ti. En effet, il s'agit d'une contamination naturelle sur le site de Peyrat sans antécédent connu de crown gall. De plus, les pratiques culturales sont assez bien maîtrisées, surtout en ce qui concerne les espèces et les génotypes des peupliers et l'historique cultural.

Après une introduction à l'étude des populations bactériennes, la partie bibliographique de cette étude a été consacrée aux connaissances actuelles concernant la diversité chromosomique et plasmidique d'*Agrobacterium*, et de leur prise en compte pour les études de populations naturelles. Le modèle épidémiologique utilisé pour notre étude a ensuite été décrit.

Dans la première partie de l'étude expérimentale nous avons mis au point et validé la méthode de PCR-RFLP pour l'identification des fonds chromosomiques et des plasmides Ti d'*Agrobacterium*. Cette approche a ensuite été appliquée à l'étude de la diversité chromosomique et plasmidique des populations naturelles d'*Agrobacterium* impliquées dans l'épidémie étudiée. L'étude de la stabilité de la structure des populations naturelles d'*Agrobacterium* a été abordée en

considérant des fluctuations quantitatives de la fréquence des génotypes, et des fluctuations qualitatives dues à la variabilité des génomes. Ce dernier point repose sur d'éventuels transferts de plasmide Ti au sein de la tumeur et dans le sol. Nous avons également considéré la présence d'éléments d'insertion dans les génotypes d'*Agrobacterium*, en tant que facteur pouvant influencer sur leur stabilité et leur adaptation.

Dans la conclusion générale nous mettrons l'accent sur l'apport de notre étude le rôle de la tumeur dans la génèse de la diversité, et la stratégie adoptée par les *Agrobacterium* pour le maintien du pouvoir tumorigène dans le sol.

**PARTIE I.**

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



---

## CHAPITRE I. INTRODUCTION A L'ETUDE DES POPULATIONS BACTERIENNES

---

### 1. Populations ou peuplements bactériens?

Une population est définie par un ensemble d'individus en interaction, appartenant à une même espèce et occupant la même portion d'un écosystème (Lamotte et Bourlière 1969, Magurran 1988), alors que le peuplement est l'ensemble des espèces en interaction occupant le même biotope. Ces définitions ont été formulées initialement dans le cadre de l'écologie des animaux et des végétaux supérieurs. Chez les animaux supérieurs, les concepts d'individu et d'espèce sont souvent assez évidents et posent donc peu de problème pratique. Chez les végétaux, le concept d'individu est plus flou du fait de la multiplication clonale, alors que la notion d'espèce reste le plus souvent valable. Dans le cas des espèces bactériennes, les concepts de population et de peuplement ne sont pas clairs et demandent à être précisés en fonction de l'étude écologique considérée. En effet, la limite de l'espèce bactérienne est définie sur la base de la similarité des génomes, se traduisant par la notion d'espèce génomique. Cependant, des bactéries appartenant à des taxons éloignés sont capables d'échanger des informations génétiques par conjugaison, transformation ou transduction. *Agrobacterium* représente un exemple de genre bactérien pour lequel plusieurs espèces (au sens de Sawada *et al.* 1993) peuvent héberger des plasmides (pTi) identiques, transférables par conjugaison. Ces plasmides ne sont cependant pas susceptibles d'être transmis à toutes les espèces bactériennes d'un même biotope. C'est pourquoi, pour des études concernant l'écologie des plasmides Ti, il semble légitime de parler de populations d'*Agrobacterium* plutôt que de peuplement, bien que différentes espèces génomiques soient impliquées. La capacité de propagation des plasmides Ti suggère l'étendue du concept de population aux plasmides Ti eux-mêmes.

Toute population peut être caractérisée par son degré d'organisation. C'est-à-dire par la distribution des abondances des génotypes, qui correspond au spectre des fréquences relatives du groupe le plus abondant au groupe le plus rare (Daget 1976). L'analyse de la structure des populations bactériennes considère la densité, la richesse et la diversité de la dite population. Le recensement du nombre de groupes d'individus appartenant à une même population permettra d'évaluer sa richesse. La diversité d'une population sera évaluée afin de rendre compte de l'inégale répartition des individus dans ces différents groupes.

## 2. Intérêt de l'étude des populations bactériennes

L'activité biologique des bactéries dans un biotope donné peut être réalisée soit par un peuplement, soit par une population bactérienne. Cet ensemble d'individus est rarement homogène mais plutôt constitué de groupes de fréquences et de capacités variées. Dans un premier temps, l'étude des populations bactériennes d'un environnement donné est descriptive. Cette étude vise à connaître les génotypes qui les composent afin d'évaluer leur complexité. Dans un deuxième temps, il s'agira de rechercher les causes et les conséquences en terme d'avantages adaptatifs relatifs à cette complexité.

La structure des populations bactériennes a été abordée notamment dans le cadre d'études de bactéries présentant une activité biochimique particulière (*Nitrobacter*), une capacité symbiotique (*Rhizobium*, *Frankia*) ou une capacité pathogène (*Salmonella*, *Listeria*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*). Un exemple est donné par les études concernant l'activité nitrifiante dans un environnement dûe aux bactéries appartenant au genre *Nitrobacter* (Navarro, 1992). La présence de génotypes différents en fonction de l'eau et des sédiments suggère que la diversité des populations de *Nitrobacter* répond à des adaptations à des environnements différents (Navarro, 1992).

La bactérie du sol en interaction avec la plante la plus étudiée au niveau populationnel est *Rhizobium*, du fait de son intérêt agronomique résultant de la fixation symbiotique de l'azote. Divers travaux ont été axés sur la recherche de souches de *Rhizobium* ou de *Bradyrhizobium* efficaces pour la nodulation et la fixation d'azote. De ce fait, ces travaux ont pris en compte la diversité des espèces présentes (Hartmann et Amarger 1991, Leung *et al.* 1994b, 1994c, Minamisawa *et al.* 1992). L'autre aspect développé fut l'étude des paramètres conditionnant l'organisation des populations et leur stabilité en conditions naturelles. Dans une population équilibrée les modifications de structure sont en général progressives. Une variation brutale de la diversité correspond soit à un changement soudain de la composition de la population (arrivée ou disparition de certains types), soit à un phénomène affectant les fréquences relatives des groupes. Cependant, la stabilité s'entend également au niveau individuel par la plasticité du génome résultant de mutations, de délétions et d'insertions. Différents facteurs semblent affecter la composition des populations de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium*. Un effet de la plante sur la diversité de *R. leguminosarum* a été mis en évidence (Harrison *et al.* 1987, Young *et al.* 1987, Leung *et al.* 1994a), suggérant une sélection de la population nodulante par la plante-hôte (Demezas et Bottomley 1986). Les caractéristiques physico-chimiques du sol semblent avoir également un effet sur la diversité des populations de *Rhizobium* (Harrison *et al.* 1989, Shishido et Pepper 1990). Cependant, une certaine stabilité dans le temps de la complexité des populations a été constatée au niveau des nodules, avec une dominance des mêmes génotypes sur quatre années (Leung *et al.* 1994a), et au niveau du sol avec une persistance de la population sur deux ans avec cependant une diminution de la diversité sur cette période (Kosier *et al.* 1993). D'autre part, la stabilité génomique corrélée avec un maintien de la capacité symbiotique a été observée sur plusieurs années pour des souches de *R. leguminosarum* ou de *Bradyrhizobium japonicum* introduites dans le sol (Gibson *et al.* 1991, Brunel *et al.* 1988). Par contre, Geniaux *et*

*al.* (1993) ont observé un réarrangement au niveau des plasmides de souches de *R. leguminosarum*. La plasmidicité des génomes a également été abordée par la mise en évidence du potentiel de transfert du plasmide symbiotique pSym (Demezas *et al.* 1991, Schofield *et al.* 1987). Cependant cette notion reste à préciser pour le genre *Rhizobium* et ne semble pas être généralisable (Young et Wexler 1988).

Dans le cas de bactéries pathogènes, la connaissance de l'organisation des populations en cause constitue la base de toute étude épidémiologique. Elle a permis de retracer l'histoire de la dissémination d'agents pathogènes d'intérêt médical tels que *Salmonella* sp. (Beltran *et al.* 1988), *Listeria* sp. (Bibb *et al.* 1990, Boerlin et Piffaretti 1991, Norrung et Skovgaard 1993), *Escherichia coli* (Selander *et al.* 1986). Ces études ont permis de dégager la notion de population clonale à l'origine d'épidémies chez l'Homme ou les animaux. Une telle approche a également été utilisée pour l'étude des bactéries phytopathogènes, comme *Xanthomonas* sp. (Leach *et al.* 1992) ou *Pseudomonas* sp. (Denny *et al.* 1988). *Agrobacterium*, bactérie phytopathogène du sol qui est en outre un saprophyte naturel, apparaît comme un modèle adéquat pour une étude de structure et de stabilité de populations en conditions naturelles, considérant d'une part un aspect épidémiologique et d'autre part le flux génique à l'intérieur de ces populations par la présence du plasmide Ti conjugatif.

### 3. Méthodes d'étude des populations bactériennes

L'approche idéale pour étudier la structure d'une population dans un milieu serait celle qui donnerait à un moment donné une image fidèle de la population occupant une unité d'espace définie (Lamotte et Bourlière 1969). Cette approche nécessite:

- 1) un plan d'échantillonnage adapté en fonction de l'espèce considérée.
- 2) une méthode d'identification des individus dont la résolution sera déterminée par l'espèce bactérienne et l'optique de l'étude.
- 3) une méthode quantitative de dénombrement des individus et une méthode qualitative d'évaluation de la richesse et de la diversité.

#### 3.1. Echantillonnage

Le but de l'échantillonnage est d'obtenir une image représentative de la réalité à partir d'une surface aussi restreinte que possible. Le problème posé par l'échantillonnage est d'être suffisamment important pour pouvoir être interprétable, c'est-à-dire permettre de traiter les résultats statistiquement. La taille de l'échantillon influe sur sa richesse. Cependant, la taille de l'échantillon permettant d'obtenir la diversité maximale est difficile à estimer *a priori*. Une évaluation de la taille nécessaire peut être obtenue en recherchant le nombre d'espèces nouvelles apportées par chaque nouveau prélèvement (Gauvin *et al.* 1956, Ferry 1976). Lorsque la courbe

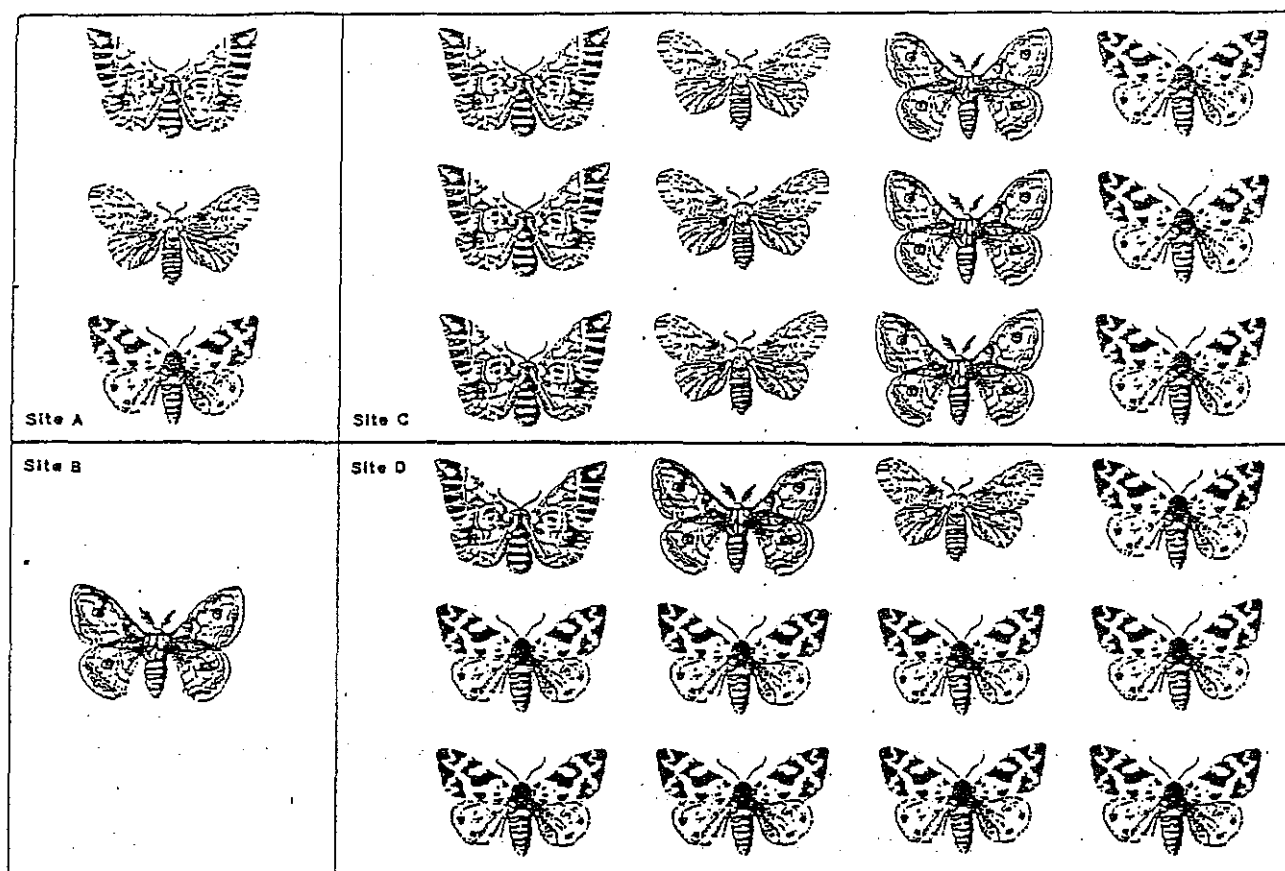


Figure 1. Exemple théorique illustrant les concepts de richesse et d'équitabilité.  
 (explications dans le texte) (d'après Magurran 1988)

du nombre d'espèces *S* apportées par les *K* premiers prélèvements atteint un palier, on considère que la totalité des espèces présentes a été recensée.

L'échantillonnage est effectué soit de façon aléatoire, soit de façon systématique. Dans ce dernier cas, il s'agit de relevés à intervalle régulier, avec une maille la plus faible possible afin de tenir compte de l'hétérogénéité du milieu. Le plan d'échantillonnage peut être établi selon un recensement en quadrats (divisions de parcelle) ou selon un recensement linéaire (transect). Cependant, dans le cas d'*Agrobacterium*, l'échantillonnage devra souvent être réalisé en fonction de l'opportunité de l'apparition des cas de crown gall. L'unité d'échantillonnage sera dans ce cas la tumeur.

D'autre part, la structure des populations bactériennes provenant d'un milieu aussi complexe que le sol doit prendre en compte l'hétérogénéité dans l'espace et la compartimentation de la localisation des bactéries. Dans le cas d'*Agrobacterium*, l'isolement peut être effectué à partir des tumeurs et/ou à partir du sol.

### 3.2. Méthodes d'évaluation de la diversité

Magurran (1988) dans son ouvrage intitulé "Ecological diversity and its measurement" a répertorié les différents indices utilisés pour évaluer le degré de diversité des communautés (ou peuplements) d'organismes supérieurs, ainsi que leurs caractéristiques. Ces données sont résumées dans ce paragraphe. Les termes utilisés concernent un peuplement composée d'un ensemble d'espèces, mais nous pensons pouvoir les extrapoler à une population composée de plusieurs groupes d'individus présentant le même génotype. Le terme d'espèce, utilisé dans les paragraphes suivants, doit ainsi être pris dans le sens plus général de génotype qui est plus adapté concernant les populations de bactéries.

La diversité comprend deux composantes: le nombre d'espèces présentes, et leurs abondances relatives (ou équitabilité). En général, les communautés sont composées d'espèces représentées à des fréquences inégales: quelques espèces sont très abondantes, un certain nombre sont moyennement représentées, la majorité sont des espèces rares. La figure 1 donne une image des concepts de "richesse" et d'"équitabilité". Le site A apparaît plus divers que le site B étant donné que celui-ci ne comprend qu'une seule espèce (notion de richesse). Les sites C et D comprennent chacun quatre espèces, cependant dans le site D une espèce est particulièrement abondante, les autres étant rares. Bien que les sites C et D aient la même richesse, l'équitabilité supérieure du site C indique qu'il est plus divers que le site D.

Les indices utilisés pour estimer la diversité peuvent être répartis en trois catégories:

- 1) indices de richesse spécifique: mesurent le nombre d'espèces recensées
- 2) modèles d'abondance spécifique: analysent la distribution des abondances spécifiques
- 3) indices basés sur l'abondance proportionnelle des espèces: considèrent les deux informations, richesse et abondance spécifique.



### *Indices de richesse:*

La richesse étant dépendante de la taille de l'échantillon, les indices de richesse combinent S (nombre d'espèces recensées) et N (nombre total d'individus échantillonnés). L'indice de Margalef (Clifford et Stephenson 1975) est défini par  $D_{Mg} = (S-1)/\ln S$ . L'indice de Menhinick (Wittaker 1977) est défini par  $D_{Mn} = S/\sqrt{N}$ . La richesse est la mesure de diversité la plus souvent utilisée dans l'étude de populations bactériennes.

### *Modèles d'abondance spécifique:*

La distribution inégale des effectifs dans les différentes espèces a amené le développement des modèles d'abondance spécifique. Cette analyse ne peut être effectuée de façon valable que dans le cas d'un grand nombre d'espèces (supérieur à 10). Une représentation du nombre d'individus en fonction du nombre d'espèces a permis de proposer quatre modèles: distribution log normale, distribution en séries géométriques, distribution en séries logarithmiques, distribution selon le modèle de Mc Arthur. Les séries géométriques concernent des peuplements pour lesquelles peu d'espèces dominant et de nombreuses espèces sont rares. Les séries log normales sont caractérisées par une importance des espèces moyennement représentées. Le modèle de Mc Arthur constitue le cas extrême pour lequel les espèces sont également abondantes.

### *Indices basés sur les proportions d'abondance*

Peet (1974) a désigné ce genre d'indices par "mesure de l'hétérogénéité", étant donné qu'ils prennent en compte la richesse et la fréquence de chaque espèce du peuplement. On distingue les indices à information statistique (indice de Shannon), des mesures de dominance (indice de Simpson). L'évaluation de la diversité par l'indice de Shannon présente l'avantage de pouvoir être testé statistiquement par un test t (Hutcheson 1970).

L'indice de Shannon est donné par la formule:  $H' = -\sum p_i \ln p_i$  où  $p_i$  est la proportion d'individus appartenant à la  $i^{\text{ème}}$  espèce. En pratique on ne peut avoir accès qu'à une estimation de  $p_i$  donnée par  $n_i/N$  (avec  $n_i$  nombre d'individus composant l'espèce  $i$  et  $N$  le nombre total d'individus analysés). L'indice de Shannon suppose que les individus sont échantillonnés au hasard à partir d'une population infiniment grande (Pielou 1975) et que toutes les espèces soient représentées dans l'échantillon. L'erreur due à cette dernière contrainte n'est cependant pas significative en pratique. L'indice  $H'$  varie de 0, si une seule espèce est présente, à  $\ln S$  (avec  $S$ , nombre d'espèces) si toutes les espèces ont la même abondance (dans le cas d'une répartition équitable). Les valeurs de  $H'$  sont en général comprises entre 1,5 à 3,5 et dépassent rarement 4,5 (Margalef 1972). Il faudrait  $10^5$  espèces pour avoir une valeur de  $H'$  supérieure à 5 (May 1975). Mpepereki et Wollum (1991), en utilisant l'indice de Shannon, ont montré des différences au niveau de la diversité sérologique de populations de *Bradyrhizobium japonicum* en fonction des sites de provenance.

L'indice de Simpson (Simpson 1949) est pondéré en fonction de l'abondance des espèces les plus communes, il est moins sensible à la richesse spécifique. L'indice de Simpson ( $D$ ) correspond à la probabilité qu'ont deux individus, pris au hasard dans une communauté infiniment grande, d'appartenir à la même espèce:  $D = \sum p_i^2$  avec  $p_i$ , proportion d'individus

appartenant à la  $i^{\text{ème}}$  espèce. Dans le cas de peuplements finis il est calculé par la formule:  $D = \sum [(n_i(n_i-1)/N(N-1))]$ , avec  $n_i$  le nombre d'individus de la  $i^{\text{ème}}$  espèce et  $N$  le nombre total d'individus. L'indice  $D$  varie de 1, si une seule espèce est présente, à  $S$  si toutes les espèces ont la même abondance.

Etant donné que les indices  $H'$  et  $D$  dépendent de  $S$ , la richesse spécifique, et de la répartition des effectifs dans les différentes espèces, des peuplements différents peuvent avoir le même indice de diversité (Barbault 1981). Pielou (1969) propose de calculer l'équitabilité en rapportant la diversité observée à la diversité maximale théorique ( $H'_{\text{max}}$  ou  $D_{\text{max}} = \ln S$ ) selon la formule:  $E_H = H'/\ln S$  (ou  $E_D = D/\ln S$ ). Les valeurs de l'équitabilité ( $E$ ) varient de 0 (lorsque la majorité des effectifs sont concentrés sur une espèce) à 1 (lorsque toutes les espèces ont la même abondance).

Trois critères sont à considérer pour l'utilisation des mesures de diversité: la capacité de discriminer différents peuplements, la dépendance vis-à-vis de la taille de l'échantillon et la composante de la diversité prise en compte. Les indices de diversité doivent permettre de détecter de faibles différences entre les sites. Taylor (1978) a classé les mesures en fonction de leur pouvoir comparatif: indice  $\alpha$  des séries log, indice  $H'$  de Shannon, indice  $S$  de richesse, indice  $\lambda$  de la série log normale et indice  $D$  de Simpson. L'indice de Shannon est plus affecté par les espèces rares donc par la richesse. L'indice de Simpson est plus sensible aux variations de la fréquence de l'espèce majoritaire.

### 3.3. Méthodes d'identification

L'identification des individus constitue une des plus grandes contraintes de l'étude des populations bactériennes. En effet, il est nécessaire d'une part d'isoler les bactéries et d'autre part de les caractériser individuellement, en discriminant éventuellement les chromosomes des plasmides présents. Dans le cas d'*Agrobacterium*, l'isolement est relativement aisé par l'utilisation de milieux spécifiques (Brisbane et Kerr 1983).

Deux catégories de méthodes ont été développées pour caractériser les bactéries: les méthodes ciblant des traits phénotypiques (sérologie, profils de protéines, patrons de résistance aux antibiotiques, ...) et celles permettant d'analyser plus ou moins directement le génome (profils d'ADN, isoenzymes, RFLP, PCR-RFLP, ...). La tendance fut de rechercher des techniques d'identification des souches permettant une précision, c'est-à-dire un pouvoir discriminant, de plus en plus importante. Le seuil ultime jamais atteint étant de différencier les clones bactériens. Les approches génomiques présentent l'avantage d'analyser les populations en considérant les relations phylétiques entre les taxons identifiés. Par ailleurs, l'analyse génomique permet de s'affranchir de l'expression des gènes qui n'est pas toujours aisée à obtenir au laboratoire (comme c'est le cas pour les gènes portés par le plasmide  $Ti$ ). Dans le cas d'*Agrobacterium* la nécessité de caractériser les souches par leurs chromosomes et leurs plasmides  $Ti$  constitue une contrainte contre laquelle les approches génotypiques apparaissent plus adaptées.

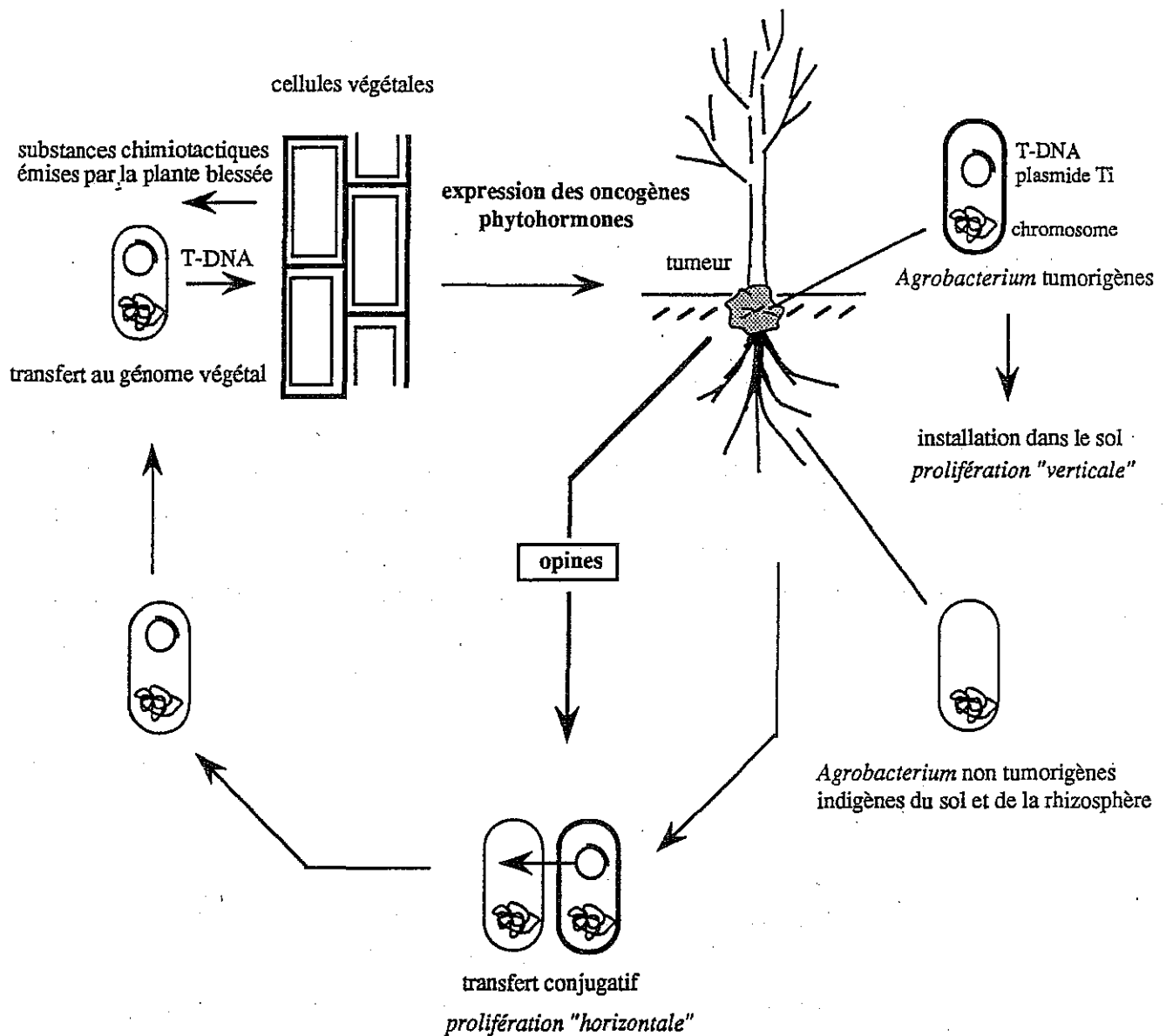


Figure 2. Cycle biologique d'*Agrobacterium* et mode de prolifération des plasmides Ti.

*Agrobacterium* est attiré par les composés émis par les cellules végétales lors d'une blessure. Ces composés induisent le régulon *vir* porté par le pTi permettant le transfert du T-DNA dans le génome de la plante. L'expression du T-DNA conduit à la synthèse d'opines et de phytohormones engendrant le développement de la tumeur. La tumeur constitue une niche écologique favorisant la multiplication des *Agrobacterium* tumorigènes qui pourront soit être disséminés dans le sol et la rhizosphère des plantes-hôte, soit transférer le plasmide Ti aux *Agrobacterium* indigènes présents dans sol et la rhizosphère.

---

## CHAPITRE II. LES POPULATIONS D'*AGROBACTERIUM*

---

### Introduction: Rappels sur la biologie d'*Agrobacterium*

Les agrobactéries vivent à l'état saprophytique dans la majorité des sols et la rhizosphère de nombreuses plantes. Les *Agrobacterium* peuvent être non pathogènes, ou pathogènes lorsqu'ils hébergent le plasmide Ti support du pouvoir tumorigène. Ces derniers peuvent se maintenir également dans les sols et sont capables d'induire la formation de tumeur. La tumeur constitue un lieu privilégié de multiplication des *Agrobacterium* pathogènes par la présence d'opines. Le potentiel pathogène peut également être disséminé via le transfert des plasmides Ti entre les souches d'*Agrobacterium*. Ce cycle biologique d'*Agrobacterium* est schématisé dans la figure 2 (selon les revues de Melchers et Hooykaas 1987, Ream 1989).

Brièvement, le processus infectieux se présente comme une série d'événements impliquant quatre partenaires: la bactérie, le plasmide Ti, la plante et le sol. La blessure de la plante provoque l'émission de substances chimiotactiques vis-à-vis d'*Agrobacterium*. Ce type de composé a également une action inductrice des gènes *vir* du plasmide Ti. L'expression de ces gènes de virulence permet le transfert du T-DNA porteur des oncogènes dont l'expression dans la cellule végétale conduit au développement de la tumeur. L'ADN transféré comporte également les gènes de synthèse d'opines, molécules spécifiques des tumeurs, substrat pour les *Agrobacterium* pathogènes, qui favorisent également le transfert conjugatif des plasmides Ti. La biologie des bactéries appartenant au genre *Agrobacterium* est donc modulée par les deux compartiments de l'information génétique, les chromosomes et les plasmides Ti.

Le cycle biologique d'*Agrobacterium* est régulé par la phase de vie tellurique des souches pathogènes multipliées dans les tumeurs et des souches non pathogènes indigènes du sol. La question des relations entre les populations d'*Agrobacterium* pathogènes disséminées à partir des tumeurs et les populations non pathogènes dans le sol est primordiale pour comprendre l'écologie d'*Agrobacterium*.

Caractéristiques	<i>A. tumefaciens</i>			<i>A. radiobacter</i>		<i>A. rhizogenes</i>	<i>A. rubi</i>
	Biovar 1	Biovar 2	Biovar 3	Biovar 1	Biovar 2	Biovar 2	
Croissance à:							
35°C	+	-	d	+	-	-	d
28°C	+	+	+	+	+	+	+
Sur le milieu sélectif de Schroth <i>et al.</i> (1965)	+	-	-	+	-	-	
Sur le milieu de New et Kerr (1971)	-	+	-	-	+	+	
En présence de NaCl 2%	+	-	+	+	-	-	
Production de 3-cétolactose	+	-	-	+	-	-	-
Formation d'acide à partir de							
meso-érythritol	-	+	-	-	+	+	+
melezitose	+	-	-				
ethanol	+	-	-	+	-	-	-
Formation d'ammoniaque à partir de							
malonate de Na	-	+	+	-	+	+	+
L-tartrate de Na	d	+	+				
propionate de Na	d	-	-				
citrate de Simmon (0,0005% d'extrait de levure)	-	+		-	+	+	-
Réaction du lait tournesolé							
alcaline	+	-	+	+	-	-	+
acide	-	+	-	-	+	+	-
Formation d'une pellicule en solution de citrate d'ammonium ferrique	+	-	d	+	-	-	-
Nécessité de facteurs de croissance							
biotine et/ou acide L-glutamique	-	+		-	+	+	
acide L-glutamique et extrait de levure	-	-		-	-	-	+
Phytopathogénie							
formation de tumeurs	+	+	d	-	-	+	+
formation du chevelu racinaire	-	-	-	-	-	+	-
Lysine et ornithine décarboxylase	-	-		-	-	-	-
Phénylalanine déaminase	-	-		-	-	-	-
Hydrolyse de la caséine, du Tween80, et de la gélatine	-	-		-	-	-	-
Deoxyribonucléase	-	-		-	-	-	-
Uréase	+	d		+		+	
β-galactosidase	d	+		d	+	+	
Test de l'oxidase:							
méthode de Kovacs (1956)	+	-		+	-	-	-
méthode de Holmes et Roberts (1981)	+	+		+	+	+	+
Formation d'indole	-	-		-	-	-	-
Formation de H <sub>2</sub> S:							
méthode de l'agar-acier-trois sucres	-	-		-	-	-	-
méthode du papier d'acétate	+	-		+	-	-	-
Fluorescence sur milieu King B	-	-		-	-	-	-
Réduction des nitrates et des nitrites	d	-		d	-	-	
Production d'acide à partir de :							
D-glucose, D-fructose, L-arabinose, D-xylose, adonitol, mannitol, lactose, maltose, sucrose, cellobiose, tréhalose, salicine, L-rhamnose	+	+		+	+	+	+
Glycérol, dulcitol, sorbitol, inositol, raffinose	+	+		+	+	+	
Volatilisation du glucose	-	-		-	-	-	-
Hydrolyse de l'esculine	+	d		+	+	d	
Production d'un précipité blanc à partir de glycérophosphate	d	-		d	-	-	
Croissance sur:							
milieu de Lippincott et Lippincott (1969) + sucrose	+	-		+	-	-	-
L-sorbose	d	+		d	+	+	
L-ornithine, L-lysine, β-hydroxybutyrate	+	+		+	+	+	+
Benzoate de Na, oxalate de Na, L-phénylalanine, L-tryptophane	-	-	-	-		-	-
Présence de plasmides spécifiques de la virulence:							
type inducteur de tumeur (pTi)	+	+		-	-		+
type chevelu racinaire (pRi)			+			+	
%G+C du DNA (Tm)	57-63	57-63		58-62	58-61	59-63	57-58

Tableau 1. Caractéristiques biochimiques permettant la détermination des biovars du genre *Agrobacterium* (d'après Kersters et De Ley 1984). d: réponse variable



## 1. Diversité chromosomique et plasmidique

### 1. 1 Diversité des fonds chromosomiques

#### *Définition du genre Agrobacterium*

Le genre *Agrobacterium* a été établi par Conn (1942). Il est classé dans la famille des Rhizobiacées qui comprend également les genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Phyllobacterium* (Kerstens et DeLey 1984). La plupart des membres de la famille des Rhizobiacées sont caractérisés par la capacité d'induire des hypertrophies corticales sur les plantes (Kerstens et DeLey 1984). Les genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* rassemblent des bactéries capables d'induire des nodules racinaires sur certaines plantes légumineuses et de fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec leur plante-hôte. Les bactéries appartenant au genre *Phyllobacterium* induisent la formation de nodules sur les feuilles de certaines plantes appartenant aux familles des Myrsinocées et des Rubiacées. Selon le Bergey's Manual (1984) le genre *Agrobacterium* est divisé en quatre espèces tenant compte de critères de pathogénie: *A. tumefaciens* induit le développement de tumeurs (crown gall) sur de nombreuses essences végétales, *A. rubi* induit le développement de tumeurs aériennes sur *Rubus* sp., *A. rhizogenes* induit le développement anormal de racines (chevelu racinaire), et *A. radiobacter* est l'espèce comprenant les souches non pathogènes.

La plupart des gènes impliqués dans le processus tumorigène ou de développement désorganisé de racines sont localisés sur les plasmides Ti et Ri ( pour "tumor inducing" et "root inducing") respectivement (revue de Bevan et Chilton 1982). La discrimination des espèces ne pouvant pas être fondée uniquement sur des caractéristiques de pathogénie d'origine plasmidique, des études phénotypiques et génotypiques portant sur des traits chromosomiques ont été menées afin de définir le genre *Agrobacterium* et sa position taxonomique par rapport aux genres les plus proches. Une clarification de la nomenclature des espèces a été donnée récemment par Ophel et Kerr (1990) et Sawada *et al.* (1993).

#### *Définition des espèces: le biovar correspond à l'espèce pour Agrobacterium*

D'après les pourcentages d'hybridation ADN/ADN (Heberlein *et al.* 1967) la similarité des souches d'*A. tumefaciens*, d'*A. radiobacter* et d'*A. rubi* varie entre 70% et 100%. Les souches d'*A. rhizogenes* présentent des pourcentages plus faibles, de 44% à 93% de l'ordre de ceux obtenus avec des souches de *Rhizobium meliloti* ou de *Rhizobium leguminosarum*. Les analyses numériques à l'aide de critères biochimiques (Keane *et al.* 1970, White 1972, Kersters et DeLey 1973, Holmes et Roberts 1981) ont permis de définir des biovars (tableau 1) à l'intérieur du genre *Agrobacterium*, sans corrélation avec la phytopathogénie. Les trois biovars sont corrélés à une appartenance à trois groupes génomiques déterminés par les tests d'hybridation ADN/ADN (DeLey *et al.* 1973) et pourraient ainsi être considérés comme des

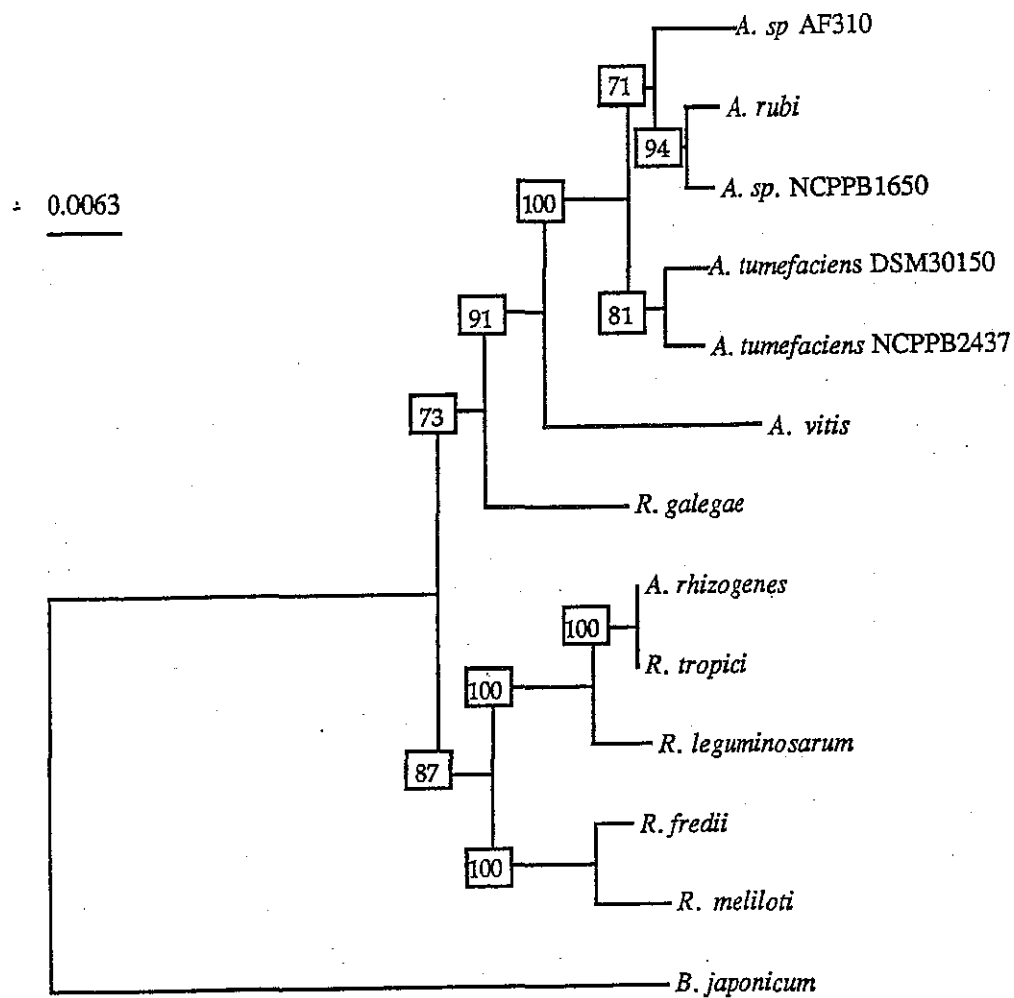


Figure 3. Arbre phylogénétique des espèces de la famille des Rhizobiacées dérivé des séquences du gène 16S (d'après Nesme, non publié).  
La précision des principaux embranchements est donné par les chiffres encadrés (%).

espèces distinctes (Holmes 1988, Holmes et Roberts 1981). Les espèces *A. radiobacter*, *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes* sont réparties dans les biovars 1 et 2, l'espèce *A. rubi* n'est pas classée dans ces biovars, le biovar 3 (Kerr et Panagopoulos 1977) constitue un groupe particulier rassemblant les souches isolées de vigne. Récemment, les souches de biovar 3 ont été classées dans une nouvelle espèce, *Agrobacterium vitis* (Ophel et Kerr 1990).

Sawada *et al.* (1993) ont proposé une révision du genre *Agrobacterium* sur la base des données existantes et des séquences du gène ribosomique *rrs* (16S), visant à définir la position taxonomique des biovars 1 et 2. Les séquences nucléotidiques du gène 16S des souches type des biovars 1 et 2 sont nettement différentes. D'autre part, les pourcentages d'homologies (de l'ordre de 80%) révélés par hybridation ADN/ADN entre les souches des espèces *A. radiobacter* et *A. tumefaciens* de biovar1 sont suffisamment élevés pour pouvoir placer ces souches dans la même espèce (De Ley *et al.* 1973, Sawada *et al.* 1993). Ainsi Sawada *et al.* (1993) (selon les directives de Wayne *et al.* 1987) proposent que les souches appartenant au biovar1 définissent l'espèce *A. radiobacter* et que les souches appartenant au biovar2 définissent l'espèce *A. rhizogenes*. Cependant, la désignation d'*A. tumefaciens* pour les souches de biovar1 semble plus appropriée (Bouzar 1994) étant donné que l'espèce type du genre *Agrobacterium* a été nommée *A. tumefaciens* et approuvée en tant que telle (Skerman *et al.* 1980). Nous utiliserons donc la terminologie d'*A. tumefaciens* comme espèce regroupant les isolats de biovar1. L'arbre phylogénétique classant les différentes espèces d'*Agrobacterium*, de *Rhizobium* et des genres proches en fonction des séquences du gène 16S est indiqué dans la figure 3. Les souches d'*Agrobacterium* sont réparties en deux groupes principaux: le premier rassemble les espèces *A. tumefaciens* (biovar1), *A. rubi*, *A. vitis* (biovar3), et comprend également *Rhizobium galegae*; le second différencie l'espèce *A. rhizogenes* (biovar2) et comprend aussi *R. tropicii*, *R. leguminosarum*, *R. meliloti* et *R. fredii*.

Parmi les souches analysées par les différentes approches citées ci-dessus, certaines sont difficilement affiliables à une des quatre espèces décrites. C'est notamment le cas des souches NCPPB1650, K-Ag-3 et Ch-Ag-4 (Sawada *et al.* 1993) qui se distinguent par leurs caractéristiques phénotypiques ainsi que par la séquence du gène *rrs*. D'autre part, cinq espèces d'*Agrobacterium* isolés de l'eau ont été décrites comme des subdivisions génotypiquement distinctes du genre *Agrobacterium* (Rüger et Hölfe 1992). De même, les souches d'*Agrobacterium* isolées de *Ficus* présentant des propriétés opiniques et plasmidiques particulières (Vaudequin-Dransart *et al.*, soumis) sont suffisamment différentes des autres espèces sur la base des séquences du gène *rrs* pour pouvoir être considérées comme appartenant à une espèce particulière (Nesme, communication personnelle). De plus, plusieurs auteurs ont indiqué l'existence d'isolats d'origines diverses ne présentant pas les caractéristiques biochimiques permettant de les classer dans un des trois biovars (Bell et Ramey 1991, Du Plessis *et al.* 1984, Süle 1978). Leur statut taxonomique reste à déterminer et pourra sans doute être défini par l'utilisation de méthodes génotypiques telles que les hybridations ADN/ADN et le séquençage du gène *rrs*.

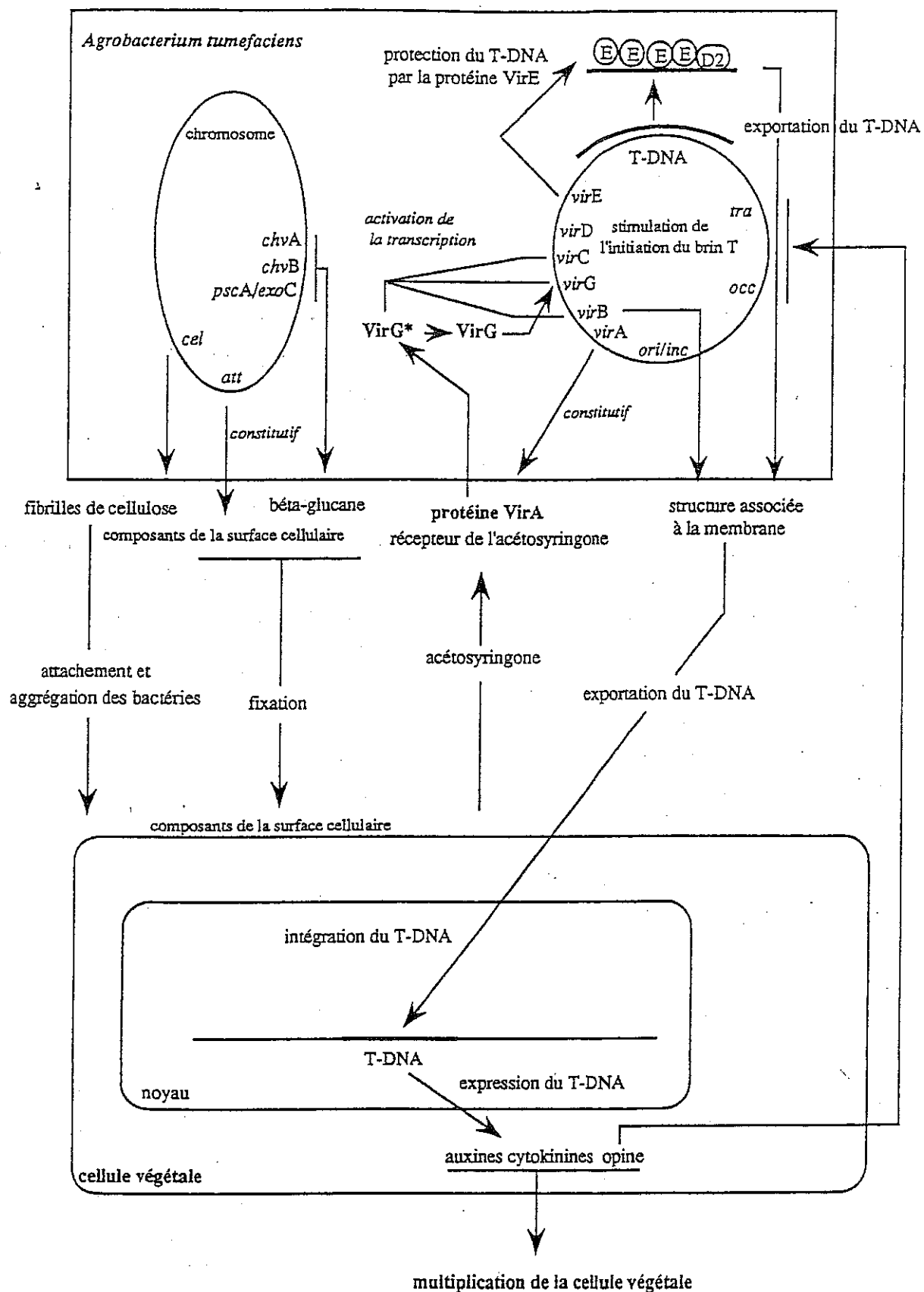


Figure 4. Schéma général de l'infection des cellules végétales par *Agrobacterium*.  
(d'après Ream 1989)

La concordance de l'analyse des séquences du gène ribosomique *rrs* avec la définition des biovars montrent l'intérêt du polymorphisme nucléotidique du gène *rrs* pour la caractérisation des souches d'*Agrobacterium*, suggérant l'existence de sites de restriction spécifiques permettant de différencier les espèces par la méthode de PCR-RFLP.

### *Caractérisation des souches*

De nombreuses méthodes, telles que l'analyse biochimique et physiologique (Anderson et Moore 1979, Bouzar et Moore 1987b, Holmes et Roberts 1981, Kersters et DeLey 1973), la sérologie, les patrons de résistance aux antibiotiques (Michel *et al.* 1990, Nesme *et al.* 1987), les profils protéiques totaux, les profils de digestion d'ADN total (Alarçon *et al.* 1987, Bouzar et Moore 1987, Michel *et al.* 1990, Nesme *et al.* 1987), ou le typage par les phages (Beadsley 1955), ont été utilisées pour caractériser *Agrobacterium* au niveau infraspécifique. En général, ces approches sont basées sur des caractères codés par le chromosome et ne donnent aucune information précise sur les plasmides Ti présents dans les souches.

La méthode de RFLP s'est avérée efficace pour caractériser les génotypes chromosomiques et plasmidiques (Bouzar *et al.* 1993, Michel *et al.* 1990, Nesme *et al.* 1992) de populations d'*Agrobacterium*. Cependant, cette approche est longue et par conséquent incompatible avec l'analyse de nombreuses souches, nécessaire pour l'étude de la structuration génétique des populations naturelles. Une amélioration de l'identification des isolats d'*Agrobacterium* pourrait être obtenue par la méthode de PCR-RFLP qui s'est avérée efficace pour l'étude de populations bactériennes naturelles (Navarro *et al.* 1992).

## **1. 2 Diversité des plasmides Ti**

### **1.2.1 Organisation générale des plasmides Ti de différents types opiniques**

Les plasmides Ti et Ri sont le support du pouvoir tumorigène des souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis* et *A. rubi*. Ils rassemblent les gènes codant pour les différentes voies métaboliques impliquées dans le processus tumoral (figure 4) (revue de Melchers et Hooykaas 1987). Ils sont composés de deux régions majeures:

- le T-DNA, transféré à la cellule végétale, codant pour l'oncogénie et la synthèse et l'excrétion des opines. Les oncogènes induisent la transformation des cellules végétales par surproduction de phytohormones (auxines et cytokinines qui permettent la multiplication cellulaire).

- la partie hors T-DNA, comprenant des fonctions du pouvoir tumorigène (régions de virulence et de catabolisme des opines) et des fonctions communes à tous les plasmides conjugatifs (origine de répllication et de transfert conjugatif).

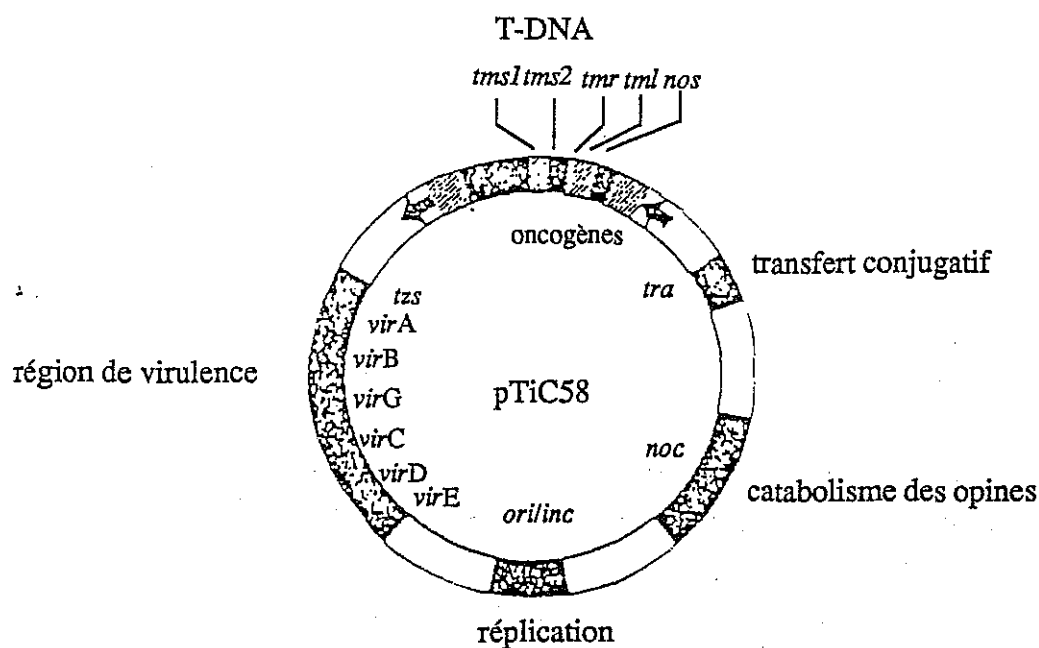


Figure 5. Carte génétique du pTiC58 à nopaline (d'après Melchers et Hooykaas 1987).

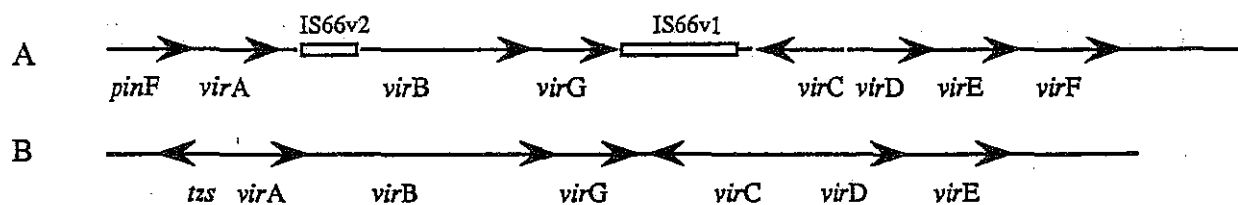


Figure 6. Organisation génétique de la région *vir* des plasmides Ti à octopine (A) et à nopaline (B). (d'après Winans 1992)

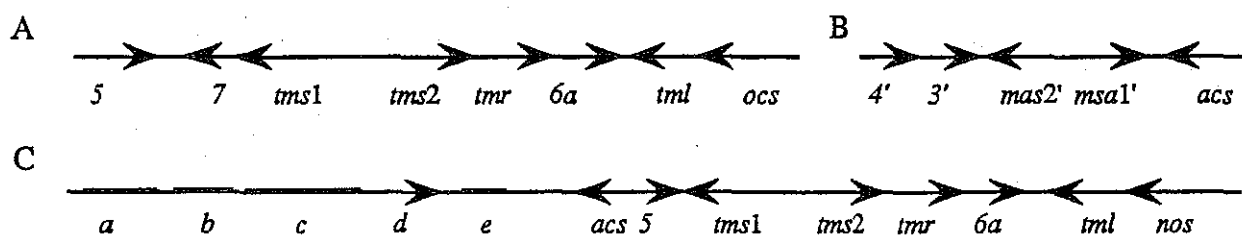


Figure 7. Organisation génétique du T-DNA.

(A): TL-DNA des plasmides Ti à octopine, (B): TR-DNA des plasmides Ti à octopine  
(C): T-DNA des plasmides Ti à nopaline. (d'après Winans 1992).



Gène	PTi	(a)	Taille (nt)	Variabilité - Rôle	Références
régulon	pTiC58	n	28600		Rogowsky <i>et al.</i> 1990
<i>tzs</i>	pTiT37	n	1413	<i>tzs</i> du pTiC58: homologie avec le gène <i>tmr</i> de pTi15955 55%, avec des pics de 85 à 93%)	Akyioshi <i>et al.</i> 1985
<i>virA</i>	pTiAg162	o	2730	<i>virA</i> est variable (Yanofsky <i>et al.</i> 1985)	Leroux <i>et al.</i> 1987
	pTiA6	o	2715		Leroux <i>et al.</i> 1987
<i>Protéine membranaire activée par les substances émises par la plante et inductrice du gène virG</i>					
<i>virB</i>	pTi15955	o	9741	<i>virB</i> est conservé (Powell <i>et al.</i> 1987, Yanofsky <i>et al.</i> 1985, Wabiko <i>et al.</i> 1989) (d'après les comparaisons entre pTiAg162 et pTiA6)	Melchers <i>et al.</i> 1988 Thompson <i>et al.</i> 1988
	pTiA6	o		<i>Transfert du T-DNA: protéine interagissant avec la membrane bactérienne</i>	Ward <i>et al.</i> 1988
<i>virG</i>	pTi15955	o	1088	<i>virG</i> est conservé (Powell <i>et al.</i> 1987, Yanofsky <i>et al.</i> 1985, Wabiko <i>et al.</i> 1989)	Melchers <i>et al.</i> 1986
<i>Inducteur du régulon vir</i>					
<i>virC</i>	<i>Transfert du T-DNA: coupure du brin T</i>				
<i>virD</i>	pTiA6	o	6155	<i>virD</i> est conservé (Yanofsky <i>et al.</i> 1985, Wabiko <i>et al.</i> 1989)	Jayawsal <i>et al.</i> 1987 Porter <i>et al.</i> 1987
<i>Transfert du T-DNA: coupure du brin T</i>					
<i>virF</i>	pTi15955	o	2952	capacités de virulence différentes entre les pTi à nopaline et à octopine dues à <i>virF</i>	Melchers <i>et al.</i> 1990
<i>Rôle inconnu</i>					
<i>virE</i>	pTiA6	o	2442	<i>virE</i> est conservé (Yanofsky <i>et al.</i> 1985, Wabiko <i>et al.</i> 1989)	Winans <i>et al.</i> 1987
<i>Transfert du T-DNA: protéine de fixation sur le T-DNA</i>					

Tableau 2. Liste des principaux gènes de la région de virulence: rôle et variabilité nucléotidique.

(a): type opinique, o: octopine, n: nopaline.

Les plasmides Ti ont été classés en fonction de leur capacité à coder pour la synthèse et le catabolisme d'opines spécifiques (revue de Dessaux *et al.* 1992). On distingue les types nopaline, octopine, succinamopine, agropine, mannopine, lippia (Ünger *et al.* 1985), octopine/cucumopine, vitopine. Cette liste n'est pas exhaustive étant donné que de nouvelles opines sont décrites (Vaudequin-Dransart *et al.* soumis). Une représentation de l'organisation générale du pTiC58 à nopaline est donnée dans la figure 5.

Le rôle des opines est double. Elles sont utilisées comme source de carbone et d'énergie, et parfois d'azote, par les agrobactéries (Tempé *et al.* 1979), et certaines favorisent le transfert du pTi par conjugaison en activant les gènes *tra* (Genetello *et al.* 1977). Les différents types de pTi sont retrouvés en association avec des fonds chromosomiques appartenant à différents biovars. Ils sont généralement impliqués dans le crown gall sur diverses plantes-hôte. Les plasmides Ti à octopine/cucumopine et à vitopine toujours associés à *A. vitis* sont par contre spécifiques de la vigne (Burr *et al.* 1986). La gamme d'hôte est également déterminée par le plasmide Ti, notamment au niveau du T-DNA (gène *tmr*) et de la région de virulence (gènes *virA* et *virC*) (Yanofsky *et al.* 1985).

### 1.2.2 Polymorphisme des régions du plasmide Ti

L'observation d'une diversité des phénotypes tumoraux a conduit à s'intéresser à l'origine génétique de cette diversité. Ainsi, les plasmides Ti de différents types opiniques, spectres d'hôte (large ou étroit), phénotypes tumoraux et présentant des propriétés de virulence différentes ont été caractérisés plus précisément.

Currier et Nester (1976) ont étudié les relations existant entre des plasmides Ti de types opiniques variés, associés à des souches d'origines différentes, par la méthode d'hybridation ADN/ADN. Ces travaux ont permis de montrer l'existence de deux groupes majeurs: les plasmides Ti homologues au pTiA6 à octopine, et les plasmides Ti homologues au pTiC58 à nopaline. Certains plasmides Ti présentant des degrés de similitude trop éloignés n'ont pas pu être classés par cette approche.

L'analyse des profils de restriction et la construction des cartes génétiques a permis une meilleure compréhension du polymorphisme des plasmides Ti. La plupart des travaux ont été axés sur l'analyse des plasmides à octopine (pTi15955 et pTiAch5) et à nopaline (pTiC58 et pTiT37). Les plasmides Ti à octopine forment un groupe homogène d'après leur profils de restriction, alors que les plasmides Ti à nopaline sont plus hétérogènes (Sciaky *et al.* 1978). Cependant, des régions conservées sont partagées par ces deux types de pTi (Chilton *et al.* 1978, Depicker *et al.* 1978, Engler *et al.* 1981). Le polymorphisme des plasmides Ti est dû, d'une part à des mutations ponctuelles, et d'autre part à différentes organisations des gènes pouvant découler de réarrangements impliquant des délétions, des insertions et des recombinaisons.

Les séquences nucléotidiques des principaux gènes du plasmide Ti localisés dans le T-DNA et dans la région de virulence qui sont disponibles sont listées dans les tableaux 2 et 3. Les comparaisons indiquées dans ces tableaux permettant une analyse du polymorphisme ont été réalisées par hybridation, restriction ou séquençage. Globalement, la comparaison des séquences

Gène	PTi	(a)	Taille (nt)	Variabilité - Rôle	Références
T-DNA	pTi15955 pTiC58	o n	22874	Inzé non publié (dans Brasileiro, thèse)	Barker <i>et al.</i> 1983
TL-DNA	pTiAch5	o	13637		Gielen <i>et al.</i> 1984
<i>tms1</i>	pTiA6 pTi Tm4	o o/c	2591	<i>tms</i> du pTi542 (leucinopine): homologue au gène <i>tms</i> des pTi à octopine (Komari <i>et al.</i> 1986) <i>tms1</i> des pTi82139 et pTiC58: homologues sur environ 300pb	Klee <i>et al.</i> 1984 Bonnard <i>et al.</i> 1991 Brasileiro (thèse)
<b>Biosynthèse d'auxine: tryptophane monooxygénase</b>					
<i>tms2</i>	pTiA6 pTiA6 pTiTm4	o o o/c	1728 2161	<i>tms</i> du pTi542 (leucinopine) homologue au gène <i>tms</i> des pTi à octopine (Komari <i>et al.</i> 1986) <i>tms2</i> des pTi82139 et pTiC58: homologues sur environ 300pb	Klee <i>et al.</i> 1984 Sciaky <i>et al.</i> 1984 Bonnard <i>et al.</i> 1991 Brasileiro (thèse)
<b>Biosynthèse d'auxine: indoleacétamide hydrolase</b>					
<i>tmr</i>	pTiT37 pTiC58 pTi82 139 pTiAch5 pTiA6 pTiAg162 pTiA6 pTiTm4 pTiBo542	n n n o o o o o/c a	1983 1988 1296	<i>tmr</i> du pTi542 non homologue au gène <i>tmr</i> des pTi à octopine (Komari <i>et al.</i> 1986) <i>tmr</i> des pTiC58 et pTi82139: homologues à 89% pTiTm4, pTiAg162, pTi15955: homologues à 90% et 77% dans les régions codante et non codante (Bonnard <i>et al.</i> 1989a) pTi LHR (pTiAg162) et WHR (pTiA6): homologie sur environ 200nt de l'extrémité 3' (la région 5' est hétérologue)	Goldberg <i>et al.</i> 1984 Brasileiro (thèse) Brasileiro (thèse) Heidekamp <i>et al.</i> 1983 Lichtenstein <i>et al.</i> 1984 Yanofsky <i>et al.</i> 1985 Yanofsky <i>et al.</i> 1985 Bonnard <i>et al.</i> 1989a Strabala <i>et al.</i> 1989
<b>Biosynthèse de cytokinine: isopentenyl transférase</b>					
<b>6a</b>	<b>Excrétion des opines</b>				
<b>6b</b>	pTiC58 pTi82 139 pTiAch5	n n o		gène <i>6b</i> des pTiC58 et pTi82139: 62% gène <i>6b</i> des pTiC58 et pTiAch5: 95%	Brasileiro (thèse) Brasileiro (thèse) Spanier <i>et al.</i> 1989
<b>Morphogénèse de la tumeur: ratio auxine/cytokinine</b>					
<i>nos</i>	pTiT37 pTiC58 pTi82139	n n n	2521 2338	les gènes <i>nos</i> des pTi82139, pTiT37, pTiC58 sont homologues	Depicker <i>et al.</i> 1982 Bevan <i>et al.</i> 1983 Monneuse et Rouzé 1987 Brasileiro (thèse)
<b>Biosynthèse de nopaline</b>					
<i>ocs</i>	pTiAch5	o	1629	les gènes <i>ocs</i> des pTiAch5 et pTi15955 sont homologues	De Greve <i>et al.</i> 1982
<b>Biosynthèse d'octopine</b>					

Tableau 3 . Liste des principaux gènes du T-DNA: rôle et variabilité nucléotidique.

(a): type opinique, o: octopine, n: nopaline, o/c: octopine/cucumopine

nucléotidiques montre que les gènes sont conservés par rapport aux régions intergéniques (Bonnard *et al.* 1989a, Brasileiro thèse).

### **Région de virulence**

La région de virulence a une taille d'environ 35kb et comporte environ 25 gènes, regroupés en 6 ou 7 opérons (Stachel et Nester 1986, Winans 1992). Les rôles respectifs de ces opérons *vir* dans la cascade des réactions déclenchant le transfert du T-DNA et aboutissant à la formation de la tumeur ont été synthétisés par Winans (1992). L'organisation génétique des opérons *vir* des plasmides Ti à octopine et à nopaline est schématisée dans la figure 6. L'organisation des régions de virulence des plasmides Ti à octopine et à nopaline est analogue (Rogowsky *et al.* 1987), excepté l'absence du gène *virF* et la présence du gène *tzs* dans les plasmides Ti à nopaline. Les plasmides Ti à octopine ont un opéron *vir* supplémentaire (*virH* ou *pinF*) situé à la même position que le gène *tzs* des plasmides Ti à nopaline. Sur l'ensemble des gènes composant le régulon *vir*, les gènes *virA*, *virC* et *virF* sont les plus variables (tableau 2), les autres gènes de cette région étant assez bien conservés. Les régions de virulence des plasmides Ti à octopine et à nopaline sont fortement conservées, mais comprennent des zones hétérologues dues à des insertions et des délétions ayant eu lieu pendant l'évolution de ces plasmides (Engler *et al.* 1981).

### **ADN de transfert ou T-DNA**

La région T est limitée par des séquences de 24pb en répétition directe, nécessaires au transfert de cette zone du plasmide Ti dans le génome végétal (Yadav *et al.* 1982) sous l'action des gènes *vir* et de gènes chromosomiques (Zambrisky 1988). Le T-DNA est organisé selon trois schémas distincts avec une répartition différente des gènes selon le type de plasmide Ti.

- un unique T-DNA de 22 à 24kb comprenant au moins 13 gènes, pour les plasmides Ti à nopaline et à succinamopine. Les plasmides Ti à nopaline comprennent un seul T-DNA (Lemmers *et al.* 1980). Cependant, Wabiko *et al.* (1991) ont décrit trois domaines distincts. La partie droite, désignée domaine I, a une taille d'environ 12kb. Elle comprend les oncogènes et les fonctions opiniques, et est assez bien conservée (en considérant les cartes de restriction). La partie gauche, désignée domaine II, est très conservée et comprend les gènes a, b, c, d, e. Ces deux régions sont séparées par le domaine III de taille variable selon le plasmide Ti. Aucune fonction n'a été mise en évidence dans les domaines II et III.

- deux T-DNA, TL (pour left) et TR (pour right) séparés par une zone de 1,8kb désignée par TC (pour central), spécifiques des plasmides Ti à octopine à large spectre d'hôte (WHR pour "wide host range"), à leucinopine (Hood *et al.* 1986, Komari *et al.* 1986) et à agropine/mannopine. Le TL-DNA a une taille de 13kb et comprend 8 gènes, dont les oncogènes. Le TR-DNA a une taille moindre de 7kb et comprend 5 gènes dont les fonctions sont inconnues.

- deux T-DNA, TA et TB séparés par une zone de 32kb pour les plasmides Ti à octopine/cucumopine, à vitopine et à octopine à spectre d'hôte étroit (LHR pour "limited host range") (Buchholz et Thomashow 1984, Yanofsky *et al.* 1985). Pour ce qui concerne les plasmides Ti associés aux *Agrobacterium* isolés de la vigne, les gènes du processus tumoral sont

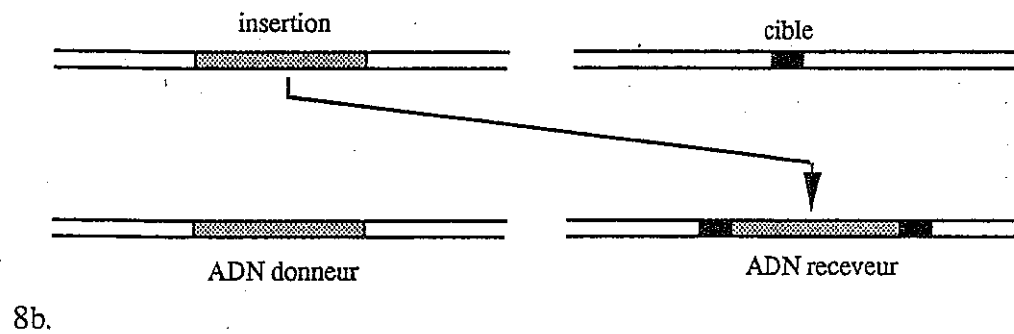
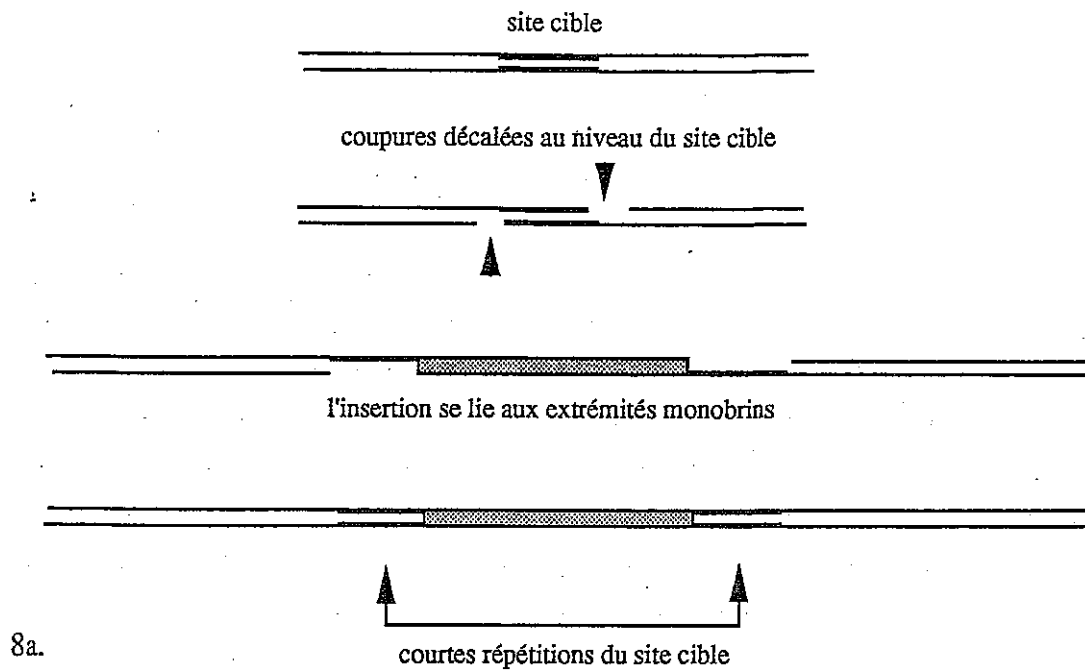


Figure 8. Mécanismes impliqués dans le processus de transposition (d'après Lewin 1988).

a. duplication du site d'insertion. b. transposition répliative.

répartis sur les deux T-DNA, TA et TB (Knauf *et al.* 1984, Paulus *et al.* 1989b). Le TA-DNA comprend une partie des gènes responsables de l'oncogénie. Les souches à large spectre d'hôte contiennent un TA-DNA de taille plus importante que les souches à spectre d'hôte étroit. Le TB-DNA est très conservé entre les souches à octopine/cucumopine de biovar3, il comporte les gènes *tms1* et *tms2* (codant pour la synthèse d'auxine).

Individuellement, les gènes du T-DNA (tableau 3) sont plutôt conservés, principalement à l'intérieur d'un type opinique. Les plasmides Ti à nopaline et à octopine comportent une région très conservée d'environ 9kb, appelée "common DNA", essentielle pour le processus tumoral (Depicker *et al.* 1978, Chilton *et al.* 1978, Engler *et al.* 1981) (figure 7). Elle est située dans la partie droite du T-DNA à nopaline, et dans le TL-DNA du plasmide Ti à octopine. Cette zone consensus comprend 6 gènes, identiques par leur taille et l'orientation des transcrits entre les plasmides Ti à nopaline et à octopine (Leemans *et al.* 1983). Cependant, Brasileiro a montré que des réarrangements importants de la région comprise entre les gènes *tmr* et *nos* de la souche 82 139 (Brasileiro, thèse).

Les séquences nucléotidiques de gènes de différents types de plasmides Ti sont disponibles. Les plus étudiées sont celles des gènes constituant les régions de virulence et du T-DNA. Ces données permettent d'estimer le degré de conservation des différents gènes portés par les plasmides Ti, ce qui présente un intérêt pour le choix d'amorces d'amplification permettant d'encadrer et ainsi d'analyser des zones supposées plus polymorphes que sont les espaces intergéniques.

Les réarrangements génétiques des plasmides Ti font intervenir des phénomènes de délétions, d'insertions et de recombinaisons. Or, la présence d'insertions dans certaines zones conservées entraînant une variabilité des propriétés oncogéniques ont été reportées (Holsters *et al.* 1980, Garfinkel et Nester 1980, Ooms *et al.* 1980). Wabiko (1992) a montré l'importance des éléments mobiles répétés du génome sur la stabilité du T-DNA des plasmides Ti à nopaline d'une même population.

### 1.2.3 Les éléments d'insertion: moteurs du polymorphisme des plasmides Ti

#### *Les éléments d'insertion: généralités*

Les séquences répétées sont très répandues dans les génomes (Lupski et Weinstock 1992, Stern *et al.* 1984). Les éléments d'insertion (ou IS, pour "insertion sequence") constituent un cas particulier de cette catégorie, possédant la capacité d'être mobiles. Les séquences d'insertion ont été découvertes dans les années soixante chez *E.coli* (Shapiro 1969), puis leur ubiquité chez les bactéries a été montrée. Un certain nombre d'articles répertorient les connaissances actuelles sur les caractéristiques et les propriétés des éléments d'insertion (Calos et Miller 1980, Campbell 1981, Doolittle et Sapienza 1980, Galas et Chandler 1989, Grindley et Reed 1985, Iida *et al.* 1983). L'ensemble des connaissances se rapportant à la description et aux

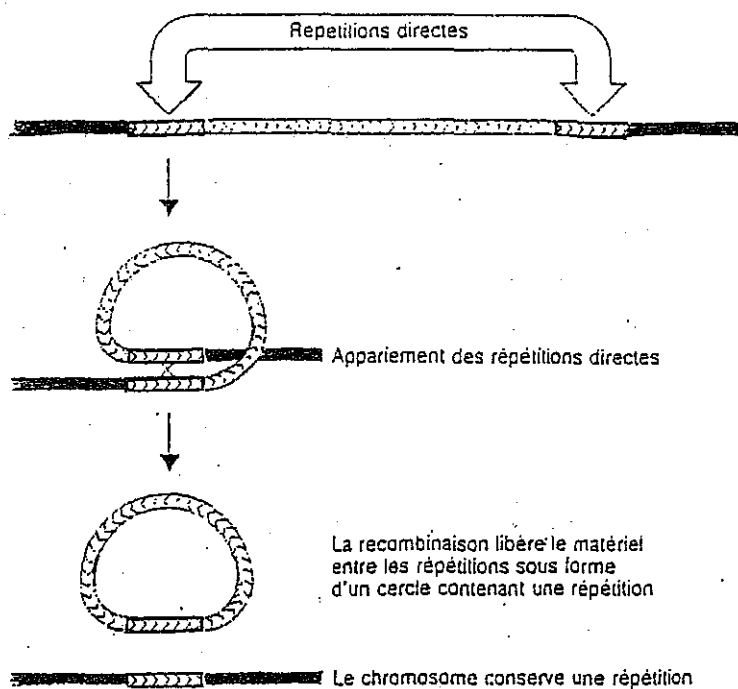


Figure 9a . Excision par recombinaison entre les répétitions directes (d'après Lewin 1988).

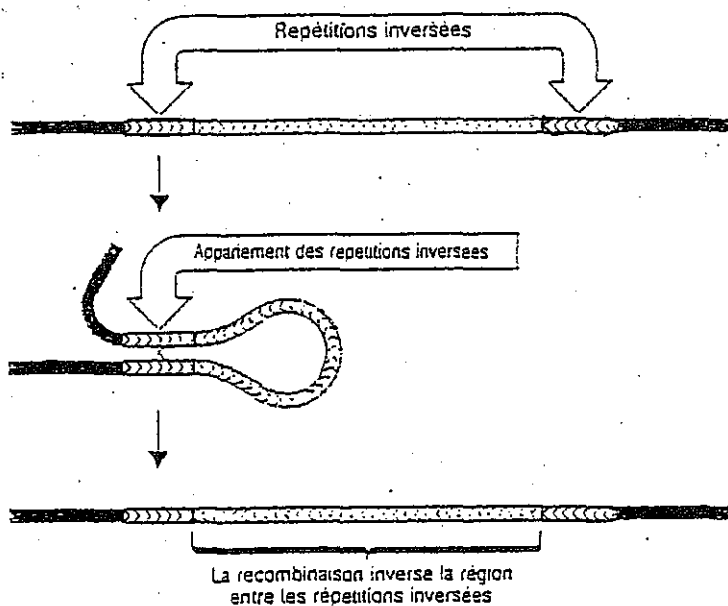


Figure 9b . Inversion par recombinaison entre les répétitions inversées (d'après Lewin 1988).

conséquences de la distribution des IS dans les genres *Agrobacterium* et *Rhizobium* sont développées dans les articles de Flores *et al.* (1987), Martinez *et al.* (1990), Otten *et al.* (1992).

Les éléments d'insertion sont de courts segments d'ADN (750 à 2500pb en moyenne). Ils sont présents en nombre variable dans les différents compartiments du génome. Leur déplacement d'un site à un autre ne met pas en jeu une relation spécifique entre les sites donneur et receveur mais se fait de façon apparemment aléatoire. Cependant, certains auteurs ont indiqué une localisation préférentielle de certains éléments ("hot-spot") (Engler *et al.* 1981, Ruvkun *et al.* 1982). Ainsi, la région *nif* de certaines souches de *Rhizobium* comporte un grand nombre d'éléments répétés (Kaluza *et al.* 1985).

Une structure particulière caractérise les éléments d'insertion. Chaque IS est composée d'une région centrale comportant tous les gènes nécessaires à sa propre transposition, encadrée par deux courtes séquences inversées et répétées (de 15 à 25 pb en moyenne). Ces deux séquences peuvent être identiques ou présenter une forte homologie. Toutes les copies d'une même IS (définissant une classe d'IS) comportent les mêmes séquences au niveau de leurs extrémités. Le site d'insertion composé d'une courte séquence d'ADN est dupliqué de façon directe et encadre l'IS.

### *Propriétés des éléments d'insertion*

Chaque IS peut être considérée comme une unité autonome, qui porte les gènes nécessaires à sa propre transposition. Le **processus de transposition** est une recombinaison, effectuée par une enzyme, la transposase. Celle-ci agit en *cis*, sur la matrice d'ADN à partir de laquelle elle a été transcrite et traduite. La recombinaison s'effectue grâce à l'homologie des séquences inversées des extrémités et crée une duplication du site d'insertion de part et d'autre de l'IS (figure 8a). La recombinaison transpositionnelle est régulée par différents mécanismes agissant en *trans*: quantité de transposase, activité de gènes de régulation (Escoubas *et al.* 1991, Weinreich et Reznikoff 1992). La transposition nécessite des facteurs de l'hôte et des protéines codées par l'IS (Schöner et Schöner 1981). Différents auteurs ont émis l'hypothèse d'une régulation de la transposition par la souche hôte (Bisercic et Ochman 1993a, Gibert *et al.* 1990, Lam et Roth 1983).

Deux modèles de mécanisme de transposition ont été proposés: le modèle conservatif et le modèle réplcatif. Que l'on considère l'un ou l'autre modèle, à aucun moment une molécule libre d'IS n'est engendrée. Dans le cas de la transposition conservative, la séquence d'insertion se transpose sans réplication, il y a perte de l'IS de l'ADN donneur au profit de l'ADN receveur. Dans le cas de la transposition réplcative, la séquence d'insertion se réplique: une copie reste sur l'ADN donneur et une copie s'insère sur le site receveur, ce qui entraîne une augmentation du nombre de copies de l'IS (figure 8b). Cette propriété de réplication indépendante entraînant une accumulation est caractéristique des IS (Campbell 1981). Les séquences d'insertion peuvent ainsi coexister dans une même cellule bactérienne en multiple copies (de quelques-unes à 30 pour ISH51 de *Halobacterium volcanii* (Hofman *et al.* 1986)), localisées sur les chromosomes, les plasmides ou les phages. La recombinaison transpositionnelle s'initie dans



IS	Souche	Taille (pb)	Opine	Localisation (a) (b)		(c) (pb)	Site (pb)	ORF principales (pb)	Homologies (d) (e)	Présence dans d'autres souches	Référence
IS66	A66 <i>A. tum.</i>	2458	o	2 copies	1 copie, <i>iaaH</i> 2 copies, <i>vir</i>	20	8	4 405, 489, 774	T37 IS51 Tc-DNA 15955		Binns <i>et al.</i> 1982 Machida <i>et al.</i> 1984
IS426	T37 <i>A. tum.</i>	1313	n	+	1 copie entre <i>6a</i> et <i>6b</i>	32/30	9	3 477, 582, 585	IS66, Transposase IS Rm1 (54%), IS2 Tc-DNA 15955	AtN11R1 C58F	Van Der Leyden <i>et al.</i> 1986 Fortin <i>et al.</i> 1993
IS427	T37 <i>A. tum.</i>	1271	n	+?	3 copies (localisation nd)	16	2	4 243, 279, 294, 411	IS426, IS426, IS66, IS51, IS52, IS1.5, Transposase	A208 A114 C58	De Meirsmen <i>et al.</i> 1989 De Meirsmen <i>et al.</i> 1990
IS1131	PO22 <i>A. tum.</i>	2773	n	-	6 copies, T-DNA	12	8	4 306, 522, 537, 639	IS66, IS866, IS426 (46-50%), IS427 (46-48%), Tc-DNA 15955 (46-48%)	PO31 PyTE1 et T37	Wabiko 1992
IS292	X88.292 <i>A. tum.</i>	2494	n	nd	<i>6b</i>	21	10	8 345, 369, 433, 498, 501, 516, 573, 687	Transposase ISR11 IS <i>Agrobacterium</i> , IS GenBank	TC-DNA 15955	cette étude
IS866	Tm4 <i>A. vitis</i>	2716	o/v	1 copie	1 copie, <i>iaaH</i>	27	8	5 429, 462, 471, 702, 966	IS66, IS426, IS51, IS52 Transposase	IS53 virE C58 80%	Bonnard <i>et al.</i> 1989b Paulus <i>et al.</i> 1989a
IS867	Tm4 <i>A. vitis</i>	2716	o/v	+	2 copies 1 à 600pb de <i>ocs</i>	27	nd	nd	IS866 75%, IS53	CG1041, 2654, 2655, AB/73	Bonnard <i>et al.</i> 1989b Paulus <i>et al.</i> 1989a

Tableau 4. Liste et principales caractéristiques des éléments d'insertion connus chez *Agrobacterium*

(a):localisation chromosomique, (b): localisation plasmidique, (c) : séquences inversées et répétées, (d): pas d'homologie détectée au niveau nucléotidique, (e): homologie détectée au niveau nucléotidique. o: octopine; n: nopaline; o/v: octopine/vitopine; nd: non déterminé.

un cas de stress qui peut être dû aux variations des conditions environnementales (Soby *et al.* 1993). Selon ces auteurs, l'insertion sera active uniquement si elle est requise par la cellule pour s'adapter à un stress de l'environnement. Les réarrangements génétiques dus à l'activité des éléments mobiles pourraient ainsi jouer un rôle sur l'adaptation des souches aux conditions environnementales (Priefer *et al.* 1981, Gaffney et Lessie 1987).

Le processus inverse de la transposition peut amener les éléments d'insertion à être excisés (figure 9a) ou inversés (figure 9b). L'événement d'excision est cependant plus rare que la transposition (Stanley *et al.* 1991). L'accumulation de séquences d'insertion dans un génome serait illimitée si ces mécanismes n'étaient pas soumis à une régulation (Ajioka *et al.* 1989). L'excision des IS peut être imparfaite, entraînant une modification de la séquence nucléotidique de l'ADN hôte au niveau du site d'insertion.

La fréquence de transposition varie selon la classe de l'IS, le génotype de l'hôte, la séquence ciblée et les conditions physiologiques (Arber *et al.* 1981, Calos et Miller 1980, Galas et Chandler 1989, Read et Jaskunas 1980). La fréquence de transposition a été estimée de  $10^{-3}$  à  $10^{-7}$  par élément et par génération d'*E. coli* en conditions de laboratoire (Bisercic et Ochman 1993b). Green *et al.* (1984) ont analysé le contenu en éléments d'insertion de deux isolats d'*E. coli* conservés séparément pendant 50 ans, et ont estimé la fréquence de transposition à  $10^{-2}$  par élément et par année. L'ISR1 détectée en nombreuses copies chez *R. lupini* (Priefer *et al.* 1989) a un taux de transposition de  $10^{-1}$  à  $10^{-2}$  par génération (Priefer *et al.* 1981). L'observation d'une variabilité du nombre et de la localisation des éléments d'insertion suggère qu'ils transposent régulièrement dans l'hôte (Bisercic et Ochman 1993b, Lawrence *et al.* 1992). Certaines classes d'éléments présentent des sites d'insertion de taille variable. Ce phénomène a été attribué à des mutations du gène dont le produit est impliqué dans la réaction de clivage, ce qui peut affecter le taux de la transposition (Bisercic et Ochman 1993b).

#### *Mutations causées par les éléments d'insertion*

L'intégration d'un élément d'insertion dans un génome peut entraîner différents phénomènes moléculaires et génétiques. Diverses conséquences de la présence d'éléments d'insertion ont été montrées pour différentes bactéries. Barran *et al.* (1991) n'ont observé aucune corrélation entre la distribution de l'ISRm1 et les propriétés symbiotiques de souches de *Rhizobium meliloti*. Par contre, des modifications du pouvoir pathogène de souches de *Xanthomonas campestris* ont été attribuées à la présence de l'IS476 (Kearney et Staskawicz 1990). Les éléments d'insertion peuvent également entraîner une activation (Scordilis *et al.* 1987, Glandsdorf *et al.* 1980), une répression (Saedler *et al.* 1974) ou une surexpression (Sawyer *et al.* 1987) des gènes. Dans le cas d'une insertion à l'intérieur d'un gène, la conséquence est le plus souvent l'inactivation de celui-ci (Wabiko *et al.* 1991, Binns *et al.* 1982, Machida *et al.* 1984). D'autre part, la présence de nombreuses copies dans un génome favorise les réarrangements impliquant des délétions, des recombinaisons (Dybvig 1993, Lawrence *et al.* 1992, Saedler *et al.* 1980). La présence d'un nombre important d'éléments transposables dans un génome pose donc

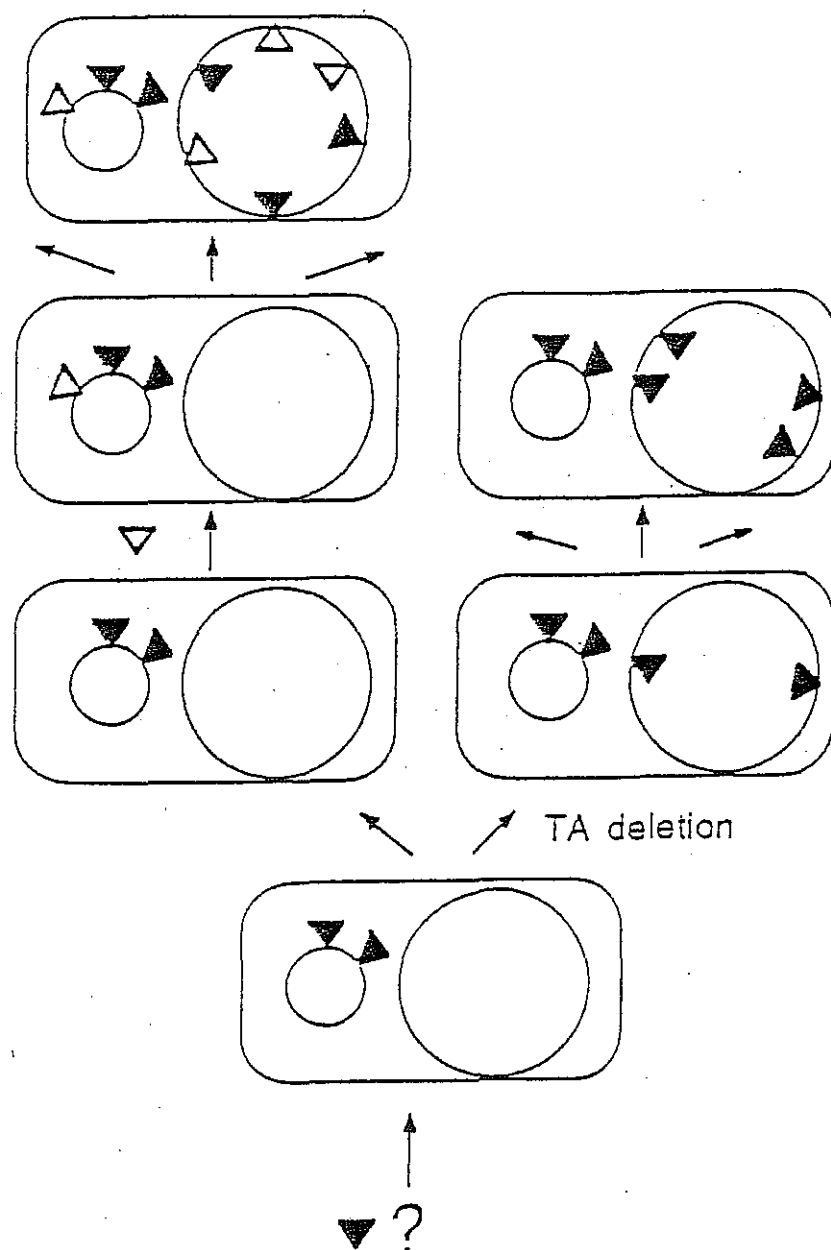


Figure 10. Modèle de transposition des IS867 et IS866 dans les plasmides Ti et les chromosomes des souches à octopine/cucumopine (d'après Otten *et al.* 1992).

La souche originale contenait deux copies de l'IS867 sur le pTi. Lors d'une voie évolutive (sur la droite), la région TA du T-DNA a subi une déletion (voie détaillée dans Otten *et al.* 1992). L'IS867 s'est ensuite propagée en différentes localisations du plasmide. Lors d'une deuxième voie évolutive (sur la gauche), la région TA a subi la transposition de l'IS866, puis les deux éléments IS867 et IS866 se sont multipliés en diverses positions du pTi. Les IS867 et IS866 sont représentées respectivement par des triangles noirs ou blancs.

le problème de la stabilité de celui-ci. Ce critère est donc à considérer lors de l'étude de la stabilité de la structure génétique des populations bactériennes.

### *Variabilité des plasmides Ti due aux éléments d'insertion*

La localisation sur les composants transférables du génome (plasmides, phages) favorise la dissémination des éléments d'insertion par transfert horizontal. L'analyse de la distribution des différentes copies d'IS dans les génomes, permet de reconstruire l'histoire et l'incidence du transfert des IS (Bisercic et Ochman 1993b).

Différents éléments d'insertion ont été détectés dans des souches d'*Agrobacterium*, contenant des plasmides Ti de types opiniques variés. La liste des séquences d'insertion décrites chez *Agrobacterium*, ainsi que leurs principales caractéristiques, sont données dans le tableau 4. Un certain nombre de ces éléments sont localisés dans le T-DNA et/ou dans la région de virulence des plasmides Ti.

La contribution des éléments d'insertion à la variabilité des plasmides Ti a été approfondie dans le cas des souches isolées de la vigne (Huss *et al.* 1989, Bonnard *et al.* 1989a, 1989b, 1991, Paulus *et al.* 1989a, 1989b, 1991a, 1991b). Les différences existant entre ces plasmides Ti sont presque exclusivement dues aux IS, comme le suggère le degré important de conservation des séquences plasmidiques en dehors des séquences d'insertion (Otten *et al.* 1992). Six éléments distincts ont été détectés, deux d'entre eux, IS866 et IS867, ont été étudiés en détail (Paulus *et al.* 1989a, 1989b). Leur présence et leur distribution dans diverses souches d'*A. vitis* ont permis de comprendre les mécanismes à l'origine des différentes structures du T-DNA observées (Otten *et al.* 1992). Un schéma interprétatif de l'évolution du T-DNA des souches isolées de vigne a ainsi pu être élaboré (figure 10).

Parmi les différentes séquences d'insertion décrites chez *Agrobacterium*, un certain nombre ont été détectées dans des souches à nopaline (tableau 4). Les relations entre ces éléments et leur génome hôte ne sont pas actuellement aussi bien connues que dans le cas des souches isolées de la vigne. Cependant, plusieurs travaux ont montré que l'activité des séquences d'insertion pourrait avoir des conséquences sur la structure des plasmides Ti à nopaline. Une instabilité génétique de la souche C58F en présence d'acétosyringone a été montrée par Fortin *et al.* (1992). Ces mutants étaient altérés au niveau de l'induction de la région de virulence. La comparaison entre les mutants C58F et la souche parentale C58 (Fortin *et al.* 1993) a permis d'impliquer la distribution de l'IS426 (Vanderleyden *et al.* 1986) dans les modifications phénotypiques observées.

Wabiko *et al.* (1989, 1991, 1992) ont montré une diversité au niveau du T-DNA de souches à nopaline, appartenant au trois biovars, isolées de pommier, poirier et peuplier sur un même site. Ces plasmides Ti ont été classés en quatre catégories selon la structure de leur T-DNA. La diversité mise en évidence est essentiellement due à la variabilité de taille du domaine III du T-DNA (Wabiko *et al.* 1991). Une analyse plus fine de cette zone a permis de détecter diverses séquences d'insertion: ISA, ISB et ISC (ou IS1131) (Wabiko 1992) responsables des

différences observées. Sur un autre modèle, les souches à nopaline C58 et T37 possèdent une insertion de 1,5kb (Fortin *et al.* 1992, Vanderleyden *et al.* 1986, Willmitzer *et al.* 1983) située également dans le domaine III, alors que le reste de leur T-DNA est fortement similaire. Ces données montrent donc que certaines souches à nopaline possèdent des éléments d'insertion distincts, certains d'entre eux comportant cependant des homologies. La comparaison du contenu en séquences d'insertion de ces souches a permis de montrer que la souche PO22 isolée de peuplier pourrait dériver de la souche PO31 en conséquence d'une transposition de l'élément IS1131 (Wabiko 1992).

Etant donné la présence de différentes séquences d'insertion dans le domaine III des plasmides Ti à nopaline, Wabiko *et al.* (1991) ont suggéré l'existence d'un "hot spot" d'insertion. Cependant, bien que les IS semblent s'accumuler dans cette zone ne contenant pas les gènes essentiels à l'oncogénie, des transpositions peuvent avoir lieu dans les autres domaines engendrant un désavantage sélectif pour les souches (Wabiko *et al.* 1991). L'abondance des éléments d'insertion dans cette partie centrale du T-DNA à nopaline est à mettre en parallèle avec le TC-DNA des plasmides Ti à octopine pour lequel un phénomène identique a été remarqué. Cette région comporte en effet des homologies au niveau nucléotidique avec différentes séquences d'insertion d'*Agrobacterium* (IS66 (Machida *et al.* 1984), IS426 (Vanderleyden *et al.* 1986), IS1131 (Wabiko 1992), ainsi qu'avec l'IS51 de *Pseudomonas savastanoi* (De Meirsmen *et al.* 1987, Yamada *et al.* 1986) et une partie du plasmide RL300 de *Rhizobium leguminosarum* (Yun *et al.* 1987).

Les éléments d'insertion sont communément associés aux génômes d'*Agrobacterium*, et notamment aux plasmides Ti. L'étude de la distribution des IS a permis de retracer les modifications génétiques ayant eu lieu au cours de l'évolution des plasmides Ti associés aux souches d'*A. vitis* et d'expliquer la variabilité de certains plasmides Ti à nopaline. Les exemples décrits jusqu'alors semblent indiquer une certaine spécificité des séquences d'insertion vis-à-vis de groupes de souches d'*Agrobacterium*. Les séquences d'insertion pourraient ainsi être considérées comme des marqueurs phylétiques et épidémiologiques. Il apparaît donc nécessaire de tenir compte de la présence, de l'origine et de la transposition des IS dans l'étude de la stabilité des populations naturelles de plasmides Ti.

## 2. Populations naturelles d'*Agrobacterium*: abondance et diversité

### 2.1 Densité de populations

Les agrobactéries sont retrouvées communément dans de nombreux sols cultivés ou non. En général les *Agrobacterium* non tumorigènes dominent en nombre par rapport aux *Agrobacterium* tumorigènes (Moore 1976). Cependant, les niveaux de populations totales sont très variables selon les sites, de  $10^3$  à  $10^8$  agrobactéries par gramme de sol (Bouzar *et al.* 1993).

Le type de sol peut influencer sur la multiplication bactérienne et le maintien des souches (Dickey 1961). Lynch et Ebben (1986) ont montré qu'une texture limoneuse favorise la multiplication et la propagation des bactéries par sa capacité de rétention d'eau. Inversement, un sol de pH acide réduit la survie de souches d'*Agrobacterium* introduites en l'absence de la plante-hôte (Dickey 1961). Cet effet négatif de l'acidité des sols a également été démontré pour des populations de *Rhizobium* (Dughri et Bottomley 1983), bactérie très proche d'*Agrobacterium*.

Les *Agrobacterium* sont également des bactéries rhizosphériques, en interaction étroite avec la plante. Différents travaux ont montré le rôle primordial de la présence de la plante-hôte dans le maintien et les niveaux des populations d'*Agrobacterium*. Cette influence découle d'une part de l'effet rhizosphérique non spécifique agissant sur les populations d'*Agrobacterium* tumorigènes ou non. D'autre part, la formation de tumeurs sur la plante-hôte constitue un réservoir d'*Agrobacterium* tumorigènes. La présence de la plante-hôte a donc un impact sur le ratio entre les isolats tumorigènes et non tumorigènes (Bishop *et al.* 1988, Macrae *et al.* 1988). L'effet rhizosphérique de la plante-hôte a été étudié plus précisément pour les isolats d'*A. vitis* spécifiques de la vigne. Ceux-ci n'ont jamais été détectés dans des sols n'ayant pas un historique viticole (Burr *et al.* 1986). Bishop *et al.* (1988) ont montré une décroissance de la quantité des isolats d'*A. vitis* dans un sol en friche ou planté en espèces végétales autres que la vigne, alors que ce type d'isolat persiste dans la rhizosphère de la vigne (Ophel et Kerr 1987). En outre, les taux de population d'*A. vitis* sont plus importants dans la rhizosphère que dans le sol non rhizosphérique (Bishop *et al.* 1988).

Les *Agrobacterium* peuvent se maintenir sur les racines des plantes (Bouzar *et al.* 1993), mais il semble que les souches pathogènes inoculées dans un sol dépourvu de plante-hôte ne se maintiennent pas à des taux très élevés (Bishop *et al.* 1988, Dickey 1961). La souche d'*Agrobacterium* C58 se maintient à un niveau de  $10^4$  b/g en microcosme de sol non stérile (Richaume *et al.* 1992). Cependant, Bouzar *et al.* (1993) ont étudié la population d'*Agrobacterium* présente dans un sol resté en friche pendant cinq années après arrachage des plants atteints de crown gall. Ces auteurs ont estimé la microflore d'*Agrobacterium* à  $3.10^7$  cfu/g de sol, dont environ un tiers correspond à des isolats tumorigènes. Les *Agrobacterium* tumorigènes peuvent donc persister pendant de nombreuses années dans un sol (Cochran 1941, Schroth *et al.* 1971), environnement pour lequel ils semblent parfaitement adaptés.

Les *Agrobacterium* peuvent également se maintenir dans le système vasculaire de certaines plantes. Ce fait a été montré pour la vigne (Bishop *et al.* 1988, Burr *et al.* 1986, 1989, Goodman *et al.* 1987, Tarbah et Goodman 1986) avec des taux de  $8.10^2$  à  $2.10^3$  *Agrobacterium* par millilitre de sève, et pour le rosier (Lopez, communication personnelle). Une infection systémique des plants de vigne a été obtenue artificiellement suite à des inoculations de  $10^6$  *Agrobacterium*/g de sol, en dix semaines. Des inoculations moindres (de  $10^2$  à  $10^4$  bactéries /g) n'ont pas abouti à une colonisation du système vasculaire de la plante (Bishop *et al.* 1988). Les populations d'*Agrobacterium* du sol peuvent donc jouer le rôle d'inoculum et entraîner le développement de tumeurs et la contamination systémique des plantes, qui peut perdurer pendant des années (Burr *et al.* 1989).

## 2.2 Structure génétique des populations d'*Agrobacterium*

Les premiers travaux de caractérisation des *Agrobacterium* impliqués dans les cas de crown gall prenaient en compte l'appartenance à un biovar, et l'opine utilisée. La plupart de ces études ont considéré des ensembles de souches d'origines variées pour ce qui concerne la plante-hôte et la localisation géographique. Lopez *et al.* (1988) ont étudié 115 isolats d'*Agrobacterium* issus de tumeurs récoltées sur 13 espèces végétales (essentiellement des arbres fruitiers) provenant de 47 sites en Espagne. Tous les isolats ont été assignés à un des trois biovars, avec cinq patrons d'utilisation des opines (nopaline, octopine, acide mannopinique, octopine/nopaline et nopaline/acide mannopinique). La distribution des isolats dans les trois biovars n'est pas homogène: le biovar 2 est représenté majoritairement, les biovars 1 et 3 étant moyennement représentés. Le type opinique nopaline est dominant sur l'ensemble des isolats et également dans chacun des trois biovars. Cette approche a mis en évidence une complexité parmi les isolats d'*Agrobacterium*, mais reste très globale et dépendante de l'hôte végétal considéré. En outre, aucune donnée n'est disponible sur l'âge des plants et des tumeurs au moment de l'isolement des bactéries.

L'étude du crown gall de la vigne a permis de montrer que les *Agrobacterium* impliqués forment un groupe particulier, par leur spécificité d'hôte (Burr *et al.* 1986) et leur appartenance majoritaire au biovar 3 (*A. vitis* (Ophel et Kerr 1990)). Les proportions entre les biovars 1 et 3 des populations présentes dans le système vasculaire de la plante et dans les tumeurs ne sont pas identiques (Thies *et al.* 1991). Burr *et al.* (1989) ont montré une prépondérance d'isolats de biovar 3 dans les vaisseaux de la vigne, alors que la population tumorale était composée d'isolats de biovar 1 et de biovar 3 en proportion équivalente. Les plasmides Ti sont de type octopine/cucumopine ou vitopine, et semblent en association stable avec leur chromosome-hôte (Paulus *et al.* 1989a), ce qui minimise les probabilités de transfert entre souches. L'étude par des méthodes moléculaires, en particulier par l'étude de la distribution d'éléments répétés, a permis de caractériser plus précisément les souches d'*Agrobacterium* isolées de la vigne (Bonnard *et al.* 1989a, 1989b, Paulus *et al.* 1989a, 1991b) et de comprendre les mécanismes ayant amené une variabilité des plasmides Ti.

Une analyse de populations d'*Agrobacterium* restreinte à un seul site, et considérant trois espèces végétales (pommier, poirier et peuplier) a été menée par Wabiko *et al.* (1989). Les tumeurs sur peuplier et pommier contiennent des isolats appartenant aux biovars 1 et 2, alors que les isolats de tumeurs sur poirier sont de biovar 2 ou 3. Une caractérisation selon le biovar, le type opinique, le pouvoir tumorigène, les profils plasmidiques et l'analyse de restriction du T-DNA a permis de déterminer dix groupes parmi cette population (Wabiko *et al.* 1989). De plus, une diversité au niveau du T-DNA a également été montrée (Wabiko *et al.* 1989, 1991, Wabiko 1992) et mise en relation avec la spécificité d'hôte des isolats.

Les *Agrobacterium* tumorigènes peuvent coloniser des sols cultivés et causer des épidémies. Or, les agrobactéries saprophytes indigènes de ces sols sont susceptibles de devenir tumorigènes suite à l'acquisition du plasmide Ti conjugatif présent dans les souches tumorigènes (Van Larebeke *et al.* 1974). Il est donc apparu nécessaire d'étudier les *Agrobacterium* résidents dans les sols dans l'objectif de préciser leurs relations avec les isolats disséminés à partir des tumeurs. Bouzar et Moore (1987a) ont analysé la population indigène d'un sol de prairie. Cette population est composée majoritairement d'isolats appartenant au biovar2, avec trois sous-groupes, et d'isolats de biovar indéterminé. Les isolats de biovar 1 et de biovar intermédiaire sont minoritaires dans cette population. Lors d'une étude sur un sol en friche (précédemment planté d'arbres fruitiers) Bouzar *et al.* (1993) mettent également en évidence une population indigène complexe, composée équitablement d'isolats de biovar 1 et 2 tumorigènes ou non. Des méthodes discriminantes (RFLP, profils de protéines, Biolog) ont permis de définir cinq groupes chromosomiques pour le biovar1 et un unique groupe chromosomique pour le biovar2. Parmi ces différents groupes certains dominent quantitativement, mettant en évidence une structuration de cette population. Les isolats non tumorigènes ont été placés dans un même groupe d'après les critères considérés. D'autre part, les plasmides Ti sont répartis dans les deux types opiniques nopaline et octopine, chacun étant associé à un type chromosomique particulier. La présence de ces différents groupes d'*Agrobacterium* phénotypiquement différents suggère une colonisation de ce sol et une stabilité avec apparemment peu ou pas d'échanges de plasmide Ti (Bouzar *et al.* 1993).

Ces études portant sur les populations naturelles d'*Agrobacterium* issue du sol montrent l'existence d'une diversité des fonds chromosomiques et des plasmides Ti. Cependant, peu d'informations sont disponibles concernant le maintien des populations de plasmides Ti en association avec les fonds chromosomiques dans le sol. D'autre part, peu de travaux ont été axés sur l'étude de populations provenant d'une seule espèce végétale sur un seul site permettant d'étudier réellement la composition génétique des populations d'*Agrobacterium*. Nous nous proposons d'aborder ces points en utilisant une épidémie de crown gall développée sur peuplier dans deux pépinières forestières expérimentales. Ce modèle permet en outre une comparaison des populations d'*Agrobacterium* en cause et donc un suivi de la population de plasmide Ti.

## 2.3 Description du modèle épidémiologique étudié

L'ensemble des résultats concernant les études effectuées sur ces deux sites forestiers est une synthèse des travaux de Nesme *et al.* 1987, Michel *et al.* 1990, Nesme *et al.* 1990 et Nesme *et al.* 1992, ainsi que des thèses de T. Beneddra et A.C.M. Brasileiro.

### 2.3.1 Le crown gall du peuplier

Le peuplier appartient au genre *Populus*, de la famille des *Salicacées*. Le genre *Populus* a été divisé en cinq sections (Chardenon *et al.* 1982): *Turanga* Bunge, *Leuce* Duby,



*Aigeiros* Duby, *Tacamahaca* Spach et *Leucoïdes* Spach, selon des critères botaniques et géographiques. La section *Leuce* Duby est partagée en deux sous-sections: *Trepidae* (trembles) avec trois espèces: *P. tremula*, *P. tremuloïdes* et *P. grandidentata*; et *Albidae* (peupliers blancs) avec une seule espèce: *P. alba*.

Les hybrides de *P. tremula* et *P. alba* présentent une grande facilité de croissance sur les sols difficiles peu utilisés pour l'agriculture et pour lesquels les clones de peuplier euro-américains sont mal adaptés (Collin 1982). Le programme français d'amélioration des peupliers a abouti à la sélection de clones d'hybrides *P. tremula* x *P. alba* pour leur croissance rapide et leur capacité de se développer sur des sols hydromorphes. Cependant ils se sont avérés sensibles aux attaques par le pathogène *Agrobacterium*. La conséquence de la maladie est une diminution de la vigueur des plants lorsque les tumeurs sont localisées au niveau du collet. Par contre, aucun effet notable n'a été observé lorsque les tumeurs sont strictement localisées au niveau des racines (Nesme *et al.* 1990).

Les premières attaques de crown gall en France ont été observées en 1981 dans la pépinière de l'INRA d'Orléans sur des peupliers grisards en cours de multiplication. La maladie a très rapidement pris de l'extension, avec des taux avoisinant 12% de plants atteints sur certaines parcelles de cette même pépinière (Michel *et al.* 1985). La multiplication végétative des peupliers par bouturage des racines favorise la dissémination de l'agent pathogène. Ainsi, à partir de la pépinière mère, la maladie s'est propagée avec la diffusion des boutures, dans les pépinières de l'INRA (Orléans, Angers, Nantes), du CEMAGREF (Les Barres) et du Fond Forestier National (Peyrat-le -Château) (Nesme *et al.* 1990).

### 2.3.2 Etude des attaques de crown gall sur le site d'Orléans

Depuis 1973, la station d'amélioration des arbres forestiers de l'INRA d'Orléans cultive plusieurs espèces forestières comme le merisier, le noyer, le peuplier et différents conifères. Les peupliers appartiennent aux trois sections *Leuce*, *Aigeiras* et *Tacamahaca*, et sont utilisés pour la recherche d'hybrides adaptés aux sols hydromorphes et ayant la capacité de produire rapidement. Le crown gall s'est développé dans cette pépinière depuis les années 80 et concerne plus particulièrement le merisier et les peupliers de la section *Leuce*. Le développement de la maladie a été accentué par les campagnes de bouturage successives.

#### *Distribution et fréquence d'apparition du crown gall*

Suite au développement important des cas de crown gall en pépinière forestière, des études ont été entreprises visant à mesurer les fréquences et la distribution des apparitions de crown gall. Une des premières expérimentations fut de considérer le développement de la maladie sur une parcelle plantée en peupliers provenant de semis hybrides sur une période de quelques mois (Juillet 1984 à Février 1985). A la date d'observation, globalement 14% des plants étaient porteurs de tumeurs. Les fréquences d'apparition du crown gall ont été étudiées en fonction des clones de peuplier et de leur répartition dans l'espace. Il a été montré que tous les clones ne réagissent pas de façon identique à l'attaque par *Agrobacterium*. Le pourcentage de crown gall

observé varie en effet de 3 à 67% selon le clone considéré. Cette analyse a permis d'envisager une utilisation de cette différence de sensibilité dans un but de sélection d'hybrides plus résistants, bien que la section *Leuce* soit très sensible comparée aux autres cultivars de peuplier (Beneddra, thèse). Cependant, il faut noter que le facteur dose d'inoculum n'est pas contrôlé dans le cas de crown gall déclaré en conditions naturelles, rendant l'interprétation difficile. D'autre part, en mesurant la fréquence de crown gall sur des divisions de la parcelle, un effet significatif de la position dans l'espace a été mise en évidence. Une variation de plus ou moins 14% a été observée selon la position topographique. Cette hétérogénéité de la distribution dans l'espace reflète certainement celle de la localisation des *Agrobacterium* dans le sol. Ces deux effets, clone et position, ont été validés par le fait qu'ils ne soient pas congruents (Nesme *et al.* 1987).

Ces données représentent un argument permettant de mettre en cause le sol de la pépinière d'Orléans dans la contamination des peupliers par *Agrobacterium*. Les manifestations récurrentes du crown gall dans cette pépinière sont dûes d'une part à un apport d'inoculum par le sol et d'autre part au mode de multiplication des plants de peuplier par bouturage racinaire favorisant la propagation du pathogène.

#### *Populations d'Agrobacterium en cause*

Lors des campagnes de bouturage successives, un grand nombre de tumeurs ont été prélevées sur les peupliers atteints de crown gall. Une série d'isolement a été réalisée à partir des tumeurs récoltées de 1982 à 1988. En considérant l'ensemble des échantillonnages effectués, un total de 700 isolats d'*Agrobacterium* a été analysé par les méthodes biochimiques et sérologiques. Les *Agrobacterium* impliqués dans le crown gall du peuplier appartiennent aux biovars 1 et 2 et sont de type nopaline. Le biovar1 est représenté à une fréquence supérieure (79% des tumeurs sur l'échantillonnage de l'année 1987) par rapport au biovar2 (21% des tumeurs). L'approche sérologique a permis d'appréhender la composition de la population d'*Agrobacterium* présente dans les tumeurs. Quatre sérogroupes (1a, 1b, 1c et 1d) ont été déterminés pour les isolats de biovar1 et deux sérogroupes (2ac et 2al) pour le biovar2. Les sérogroupes caractérisant les isolats de biovar1 ont été retrouvés dans d'autres pépinières (Beneddra, 1990). Sur l'ensemble de la population analysée, le séro groupe 1b apparaît de façon majoritaire, représentant 50% des isolats. A l'intérieur d'une même tumeur, 1 à 3 sérogroupes peuvent coexister, appartenant à l'un ou l'autre des biovars 1 et 2. L'étude sérologique fait apparaître une structuration de la population d'*Agrobacterium*, avec la présence de sous-populations dominantes. Une comparaison des fréquences de distribution des différents sérogroupes pour l'année 1985 (avec 129 isolats) et l'année 1986 (avec 120 isolats) a permis de mettre en évidence une stabilité de cette structure dans le temps.

La structure de la population d'*Agrobacterium* a également été analysée en utilisant d'autres méthodes de caractérisation. L'analyse des patrons de résistance aux antibiotiques engendre les mêmes regroupements que ceux obtenus par sérologie. Cette approche basée sur le

test de 18 substances antibiotiques ou inhibitrices a également fait apparaître une plus grande variabilité parmi les isolats de biovar1. Cette concordance des résultats de caractérisation par sérologie et par les patrons de résistance aux antibiotiques a également été décrite pour des souches de *Rhizobium* (Kingsley et Ben Bohlool 1983). D'autre part, les profils de protéines membranaires totales indiquent une grande dissimilarité entre les profils des isolats de chacun des deux biovars (Michel *et al.* 1990). L'analyse des profils protéiques ou de résistance aux antibiotiques permet un classement des isolats d'*Agrobacterium*, mais reste difficilement applicable à une identification précise pour l'étude épidémiologique.

Ces résultats préliminaires d'estimation de la complexité des populations d'*Agrobacterium* obtenus par des approches phénotypiques sont rapidement apparus insuffisants par le manque d'information concernant le plasmide Ti. Une caractérisation par une approche génotypique a donc été effectuée. Un sous échantillon de quatre souches type de biovar1 (2516, 2517, 2518, 2177), et deux souches type de biovar2 (2519, 2520), appartenant aux différents sérogroupes, a été testé par la méthode d'hybridation ADN-ADN. Les sondes comprenaient, d'une part des fragments clonés au hasard à partir du chromosome de la souche de référence C58 (de biovar1), et d'autre part trois régions du plasmide Ti (région de virulence, région de réplication et T-DNA). Les souches de biovar 1 et 2 ont donné des réponses radicalement différentes: aucune souche de biovar2 n'a permis l'hybridation avec les sondes chromosomiques, alors que cette approche a permis de différencier les quatre souches type de biovar1 (Michel *et al.* 1990, Nesme *et al.* 1992). Le regroupement des souches de biovar1 correspond à la discrimination par les approches phénotypiques de patrons de résistance aux antibiotiques et de sérologie. L'utilisation de sondes plasmidiques a révélé un polymorphisme faible pour les régions de virulence et de réplication. Pour ce qui concerne le T-DNA, la partie gauche est conservée, alors que la partie droite s'est avérée variable.

Sur la base de leurs profils chromosomiques obtenus par la méthode de RFLP (polymorphisme de la taille des fragments de restriction) le regroupement des isolats d'*Agrobacterium* est identique à celui obtenu par sérologie. D'autre part, deux types de plasmide Ti (pTi2516 et pTi2177) ont été identifiés pour l'ensemble des isolats testés. Le pTi2516 est associé aux types chromosomiques 2516, 2517 et 2519, alors que le pTi2177 est associé exclusivement au type chromosomique 2177. Les types 2518 et 2520 correspondent à des souches non pathogènes.

### 2.3.3 Etude des attaques de crown gall sur le site de Peyrat

Dans la pépinière de Peyrat, aucun cas de crown gall ne s'était déclaré jusqu'à l'introduction des boutures de peuplier en provenance de la pépinière d'Orléans. Suite à cette implantation des cas de crown gall ont été observés régulièrement sur les peupliers âgés de deux ans, malgré l'élimination systématique des plants malades lors des campagnes de bouturages. Le délai habituel avant l'arrachage est de deux ans dans la pratique de propagation végétative des peupliers. Cependant, des tumeurs ont également été observées sur le système racinaire de

boutures de deux mois, sous serre, avant leur implantation en pépinière. Ceci s'est vérifié sur des jeunes boutures obtenues une dizaine d'années après la première introduction de peupliers dans la pépinière de Peyrat.

Les populations d'*Agrobacterium* isolées des tumeurs développées sur les peupliers de la pépinière de Peyrat sont composées d'isolats de biovars 1 et 2 à nopaline appartenant aux mêmes sérogroupes que les isolats provenant d'Orléans. De plus, la structure de la population d'Orléans est retrouvée, avec dominance du séro groupe 1b.

La méthode de RFLP a été appliquée à la caractérisation d'échantillons provenant de la pépinière de Peyrat isolés de tumeurs sur les jeunes plants de peupliers. Les génotypes chromosomiques et plasmidiques détectés se sont avérés identiques à ceux de la pépinière d'Orléans. L'analyse génotypique des isolats indique donc une similitude entre les populations d'*Agrobacterium* en cause dans le crown gall des pépinières d'Orléans et de Peyrat.

Cette épidémie de crown gall déclarée dans les pépinières d'Orléans et de Peyrat constitue un modèle pour l'étude des populations d'*Agrobacterium* en conditions naturelles. Elle permettra d'étudier, le devenir d'une population contaminante d'*Agrobacterium* tumorigènes introduite dans un nouvel environnement (pépinière de Peyrat), et ses relations avec la population indigène du sol de cette pépinière.

## CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La première partie de cette étude bibliographique portait sur la démarche à suivre pour une étude de populations bactériennes. Le premier point critique est la détermination de la taille de l'échantillon permettant d'avoir une représentation exhaustive de la réalité. Le deuxième point concerne l'identification des génotypes composant les populations d'*Agrobacterium*. Dans l'objectif de suivre simultanément des populations d'*Agrobacterium* et leurs plasmides Ti supports conjugatifs du pouvoir tumorigène, une méthode rapide caractérisant indépendamment les chromosomes et les plasmides Ti s'impose. La caractérisation des génomes d'*Agrobacterium* devra prendre en compte la variabilité due aux mutations ponctuelles, mais également le polymorphisme engendré par la présence éventuelle d'éléments d'insertion. Les méthodes de caractérisation génotypiques semblent particulièrement bien adaptées en ce sens, cependant les approches d'hybridation ou de RFLP sont difficilement applicables en routine. Il nous est donc apparu nécessaire de mettre au point un outil d'identification des isolats d'*Agrobacterium* rapide et efficace. La connaissance de la séquence nucléotidique de différents gènes du plasmide Ti et de la région ribosomique permet la définition d'amorces d'amplification encadrant les régions hypervariables nécessaires à l'utilisation de la méthode de PCR-RFLP. L'identification des différents taxons (notion de richesse) et leur fréquence déterminera la structure des populations. L'estimation de la diversité par l'indice de Shannon H' permettra en outre de comparer statistiquement les populations.

Les données sur l'écologie d'*Agrobacterium* et du plasmide Ti ne sont pas abondantes, il est néanmoins connu que les *Agrobacterium* pathogènes ou non persistent dans le sol. Cette survie dans le sol est modulée par divers paramètres dont la présence de la plante-hôte ou le type de sol. De plus, bien que les conditions du transfert de plasmide Ti *in vitro* soit bien établi, son importance sur la structure génétique et la persistance des plasmides Ti dans les populations est mal connue. En outre, le lien entre les échanges de plasmides Ti et le maintien des souches d'*Agrobacterium* dans le sol n'a pas été montré.

L'étude de l'épidémie modèle permettra d'étudier la structure des populations d'*Agrobacterium* et de connaître les paramètres influant sur sa stabilité. La première partie de ce travail concerne la mise au point de la méthode de PCR-RFLP pour l'analyse des populations d'*Agrobacterium* en cause dans cette épidémie. La deuxième partie concerne la structure génétique de ces populations et leurs modifications, en considérant les fluctuations quantitatives au sein des génotypes des populations, et la variabilité individuelle des génomes. Ce dernier point prend en compte le rôle d'éventuels transferts de plasmides Ti au sein de la population, mais également la transposition d'éléments mobiles du génome qui sera développée dans la troisième partie.

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

Une partie des résultats présentés dans les parties III et V ont fait l'objet de publications:

Ponsonnet, C. et Nesme, X. 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. Arch Microbiol. 161:300-309.

Ponsonnet, C., Normand, P., Pilatte, G., Chapelon, C., et Nesme, X. Characterization of IS292, a novel insertion sequence from *Agrobacterium*.. soumis à Microbiology (J. G. M.).

**PARTIE II.**

**MATERIEL ET METHODES**





---

## 1. ECHANTILLONNAGE DES ISOLATS D'AGROBACTERIUM

---

### 1.1 Matériel végétal

#### 1.1.1 Pépinière d'Orléans:

La pépinière d'Orléans (INRA) comprend plusieurs parcelles où sont produits, multipliés et étudiés les peupliers hybrides de *Populus tremula* x *P. alba*. Les plants hybrides utilisés pour cette étude ont été plantés en juillet 1984 et arrachés en février 1985. Les tumeurs ont été récoltées sur 34 plants malades à raison de une tumeur par plant, choisie au hasard. Cet échantillon constitue la série ORL 2A, comprenant des plants issus de boutures de racines arrachés après 2 ans et ayant été en contact prolongé avec le sol.

#### 1.1.2 Pépinière de Peyrat:

La pépinière de Peyrat a reçu les premiers plants de peuplier en provenance de la pépinière d'Orléans en 1977. Ce matériel a ensuite été multiplié à Peyrat suivant le protocole classique de bouturage de racine. La parcelle étudiée (parcelle D) a été plantée en boutures racinaires de peuplier appartenant à 4 clones différents, en 1985 soit 8 ans après l'introduction depuis la pépinière d'Orléans (ce qui correspond à 4 campagnes de multiplication biannuelles). Une centaine de boutures ont été plantées sur 2 lignes parallèles traversant toute la parcelle (figure 11). Deux ans après leur plantation, en 1987, l'ensemble des plants de peupliers du transect ont été arrachés. Les tumeurs ont été récoltées après arrachage de manière aléatoire sur 94 plants à raison de une tumeur par plant. Cet échantillon constitue la série PEY 2A.

D'autre part, des boutures de racines ont été réalisées à partir de plants de la pépinière de Peyrat exempts de tumeurs appartenant aux clones 712.2, 712.8 et 717.1. Ces boutures ont été plantées en substrat horticole (Motte Melfert) sous serre. Les plants issus de ce dispositif ont été arrachés après une durée de 2 mois. Treize tumeurs ont été récoltées (à raison de 3 à 5 par clone) et ont été utilisées pour l'analyse. Cet échantillon constitue la série PEY JT, comprenant des plants issus de boutures de racines, arrachés après deux mois, n'ayant pas eu de contact avec le sol après le bouturage.

Après l'arrachage de la totalité des plants de la parcelle D, terrain a été traité mécaniquement pour éliminer les restes de racines, puis laissé en friche pendant environ six mois. Ensuite, un dispositif piège a été installé ayant pour but de piéger les *Agrobacterium* pathogènes persistant éventuellement dans le sol. Les plants utilisés pour piéger les *Agrobacterium* pathogènes appartenaient tous au clone 709-3 connu pour sa sensibilité au crown gall au champs. Afin de s'assurer de l'absence d'*Agrobacterium* dans les plants utilisés, ceux-ci ont été multipliés par culture *in vitro* et élevés sous serre en Motte Melfert. Ces vitroplants ont été plantés sur trois lignes de 138 plants chacune, à 0,5m d'intervalle. Ces trois lignes recouvraient au mieux la zone

Pépinière		Orléans	Peyrat
Analyse physique			
Argile (< 2µm)	%	9,68	14,4
Limons fins (2 à 20µm)		14,87	14,6
Limons grossiers (20 à 50µm)		6,58	6,8
Sables fins (50 à 200µm)		8,23	16,8
Sables grossiers (200 à 2000µm)		59,88	47,4
Matières organiques		1,71	6,82
Analyse chimique (meq/100)			
pH de l'eau		6,1	5,7
Azote		0,64	nd
Carbone		9,90	nd
Rapport C/N		15,47	14,28
Ca échangeable		0,87	4
K <sup>+</sup>		0,17	0,47
Mg <sup>2+</sup>		0,07	0,21
P <sup>-</sup>		0,34	nd
Na <sup>+</sup>		nd	0,03
Mn <sup>2+</sup>		nd	1,5

Tableau 5. Caractéristiques du sol des deux pépinières

préalablement plantée en clones 712.2, 712.8 et 717.1 utilisés pour faire les boutures de la série PEY JT. Le dispositif comportait 4 blocs de 100, 105, 101 et 105 plants. Trois tumeurs provenant des plants des blocs 1 et 3 (premier arrachage, février 1989), et 20 tumeurs provenant des plants des blocs 2 et 4 (deuxième arrachage, octobre 1989) ont été utilisées pour l'analyse. Les isolats d'*Agrobacterium* de ces deux échantillonnages ont été rassemblés pour l'analyse. Cet échantillon constitue la série PEY VP, comprenant des isolats issus de tumeurs de quelques mois développées sur vitroplants par une contamination par le sol.

Un essai témoin de contrôle (PEY TP) a été installé dans une autre parcelle de la même pépinière située à environ 200m d la parcelle du dispositif piège. Cette parcelle a eu sensiblement le même passé cultural que la parcelle expérimentale, excepté le fait qu'elle n'ait jamais été plantée avec des peupliers *Leuce*. Un ensemble de 100 plants issus de culture *in vitro* a été planté en même temps que ceux du dispositif piège.

## 1.2. Caractéristiques des sols des pépinières

Les caractéristiques physico-chimiques des sols des deux pépinières sont présentées dans le tableau 5. Ces deux sols ont une texture limoneuse-sableuse et ont des pH comparables.

## 1.3. Matériel bactérien

### 1.3.1 Isolement à partir des tumeurs

Les tumeurs ont été lavées à l'eau et des fragments d'environ 3mm ont été prélevés dans les tissus non nécrotiques superficiels, puis ont été broyés dans 500µl d'eau stérile additionnée de PVPP (à 1% final) en microtubes (Eppendorf), à l'aide de broyeurs de Poters (Pistons Pellet, Polylabo Paul Block & Cie). Après décantation, une goutte de surnageant a été étalée sur les deux milieux de Brisbane et Kerr (1983) en boîte de Pétri. Le milieu BK1 (3,04g/l d'arabitol comme source de carbone) est sélectif pour les *Agrobacterium* de biovar 1, alors que le milieu BK2 (3,04g/l d'érythritol comme source de carbone) est sélectif pour les *Agrobacterium* de biovar2. Après 48h de croissance à 28°C, les colonies ont été prélevées de façon arbitraire et mises en suspension dans 1ml d'eau stérile, selon leur aspect: colonies circulaires et muqueuses, avec concentration du colorant présent dans chacun des deux milieux sélectifs (Violet cristal pour le BK1 et Vert de Malachite pour le BK2) au centre de la colonie. Trois passages sur milieu LPGa solide (extrait de levure 5g/l; Bacto-peptone 5g/l; glucose 10g/l; Bacto-agar 15g/l; Difco) ont ensuite été effectués pour la purification de chaque isolat.

### 1.3.2 Isolement à partir du sol

Deux échantillons aléatoires de sol (F4 et F8) en bordure de la parcelle D mais dans une zone non contaminée de la pépinière de Peyrat ont été utilisés pour l'obtention d'isolats d'*Agrobacterium* indigènes au sol de Peyrat. L'isolement a été effectué à partir de 10g de sol

Pépinière	Echantillon	Origine	Plants	Année	Biovar 1	Biovar 2	Total
ORLEANS	ORL 2A	tumeur	boutures de racines (2 ans dans le sol)	1985	20	12	26
PEYRAT	PEY 2A	tumeur	boutures 2 ans (2 ans dans le sol)	1987	29	19	>35
	PEY JT	tumeur	boutures 2 mois (2 mois en substrat horticole)	1988	13	-	13
	PEY VP	tumeur	vitroplants (tumeurs de quelques mois) (moins de 1 an dans le sol)	1989	4, 18	4, 10	24
	PEY TP	tumeur	témoin piège (2ans dans le sol)	1989	2	-	2
	PEY SOL	sol	sol témoin	1991	-	-	-
Total					84	45	>98

Tableau 6. Nombre de tumeurs à l'origine des isolats de biovar 1 et 2 pour chaque population.

tamisé, mis en suspension dans 100ml d'eau distillée et stérile. Le mélange a été dispersé pendant 1 heure sous agitation. La suspension de sol a ensuite été diluée dans de l'eau distillée et stérile et les dilutions étalées sur les milieux BK1 et BK2. L'isolement a été effectué de la même manière que dans le cas des isolats issus de tumeurs. La liste des isolats provenant du sol est donnée dans l'annexe II.

### 1.3.3 Identification des isolats

Les principaux tests biochimiques nécessaires à la détermination du genre *Agrobacterium* ont été effectués sur l'ensemble des isolats obtenus. Les isolats répondant positivement aux tests de présence de la  $\beta$ -glucosidase (milieu esculine, méthode de Sneath 1956) et de l'uréase (milieu urée-indol, méthode de Panagopoulos et Psallidas 1973) ont été conservés pour l'étude. Le biovar des isolats d'*Agrobacterium* a été déterminé par le milieu BK à partir duquel ils avaient été isolés et par le test d'oxydation du lactose en 3-cétolactose (Bernaerts et De Ley 1963). Chaque isolat a été répertorié et conservé dans du glycérol à -20°C. A partir de chaque tumeur, 1 à 5 isolats ont été utilisés pour notre étude.

La liste des isolats analysés, répartis par pépinière, par clone et par tumeur se trouve dans l'annexe I. Le tableau 6 répertorie le nombre de tumeurs analysées pour chaque échantillonnage.

## 1.4. Dénombrements bactériens à partir du sol de la pépinière de Peyrat

### 1.4.1 Estimation de la microflore totale du sol de la pépinière de Peyrat:

Deux échantillons de sol, prélevés de façon aléatoire sur la parcelle non contaminée, ont été utilisés pour quantifier la microflore totale. Les suspensions de sol ont été préparées par broyage de 10g de sol dans 100ml d'eau distillée stérile. Après homogénéisation par dispersion sous agitation pendant 1 heure, les suspensions ont été centrifugées à 2000rpm pendant 5 min et les surnageants dilués ont été utilisés pour le dénombrement des bactéries du sol par la méthode de coloration à l'acridine orange modifiée (Recorbet, 1993).

### 1.4.2 Estimation du nombre d'*Agrobacterium* du sol de la pépinière de Peyrat:

Les *Agrobacterium* indigènes au sol de la pépinière de Peyrat ont été dénombrés après marquage par la méthode d'immunofluorescence indirecte. Six sérums polyclonaux ont été utilisés, permettant de détecter les sérotypes 1a, 1b, 1c, 1d, 2ac et 2al décrit par Nesme *et al.* (1987). Ces sérums ont été obtenus à partir de souches-type isolées de tumeurs de la pépinière d'Orléans. Cette méthode ne permet pas de différencier les cellules vivantes des cellules mortes.

Les suspensions de sol ont été obtenues selon le même procédé que pour le marquage à l'acridine orange. Chaque suspension à tester a été filtrée à raison de 1ml par filtre. Chaque sérum dilué dans du NaCl à 0,9% a été déposé sur filtre et laissé en contact pendant 30

minutes avec les bactéries, puis les filtres ont été rincés longuement à l'eau avant d'être séchés. Afin d'éviter les réactions non spécifiques, 500µl de gélatine rhodamine ont été appliqués sur chaque filtre, après 10 minutes de contact la solution a été filtrée. Le conjugué (anti-IgG de lapin) marqué à la fluorescéine, dilué au centième dans du NaCl à 0,9%, a été déposé et laissé en contact pendant 30 minutes, puis les filtres ont été rincés, puis séchés. Le comptage a été effectué de la même manière que pour le dénombrement après coloration à l'acridine orange. La réaction a été considérée comme positive lorsque la fluorescence apparaissait de façon pariétale et forte.

---

## 2. CARACTÉRISATION DES ISOLATS D'*AGROBACTERIUM*

---

### 2.1 Caractérisation sérologique

Les divers isolats d'*Agrobacterium* ont été typés par sérologie. Les sérums utilisés sont ceux décrits pour le marquage en immunofluorescence.

Les cultures (après une croissance de 48h sur du milieu LPGA) ont été mises en suspension dans 5ml d'eau stérile, puis diluées jusqu'à environ  $10^7$  bactéries/ml. La suspension bactérienne a été laissée environ une heure à température ambiante pour permettre l'hydratation des polysaccharides, ceci entraînant un meilleur marquage par les anticorps (Nesme, comm. pers.). Chaque suspension bactérienne devant être testée a été déposée sur lame, à raison de 40µl par puits. Après séchage à température ambiante, les lames ont été immergées dans un bain d'acétone pendant 10min afin de fixer les cellules, puis rincées à l'eau. Chaque sérum à tester (40µl), dilué dans du NaCl 0,9% a été rajouté dans chaque puits et laissé en contact avec les bactéries pendant 30min. Les lames ont ensuite été rincées longuement, puis séchées. Le conjugué, marqué à la fluorescéine dilué au 1/100 dans NaCl 0,9% et contenant du Bleu Evans, a été appliqué, à raison de 40µl par puits. Après un contact de 30min, les lames ont été rincées et séchées.

La lecture des lames a été faite sous microscope à épifluorescence. La réaction a été considérée comme positive lorsque la fluorescence pariétale était intense sur la majorité des cellules bactériennes observées.

### 2.2 Identification des isolats par PCR-RFLP

#### 2.2.1 Matériel testé

Dans un premier temps un ensemble de 41 souches de collection d'*Agrobacterium* ont été testées pour valider la méthode de PCR-RFLP. Ces souches ont été isolées de plantes-hôte

Souches	Type opinique	Plante-hôte	Code et origine
<i>A. tumefaciens</i>			
1903	nopaline	<i>Prunus cerasus</i>	C58
1902	non pathogène	dérivée de C58	C58C1 (sans pTi )
1896	nopaline	dérivée de C58	C58C1 (pTi Hi00α)
1901	nopaline	dérivée de C58	C58C1 (pTi T37)
296	nopaline	<i>Lycopersicon esculentum</i>	111, France
354	nopaline	nd	B10, nd
1904	nopaline	<i>Vitis vinifera</i>	AG90, Grèce
2407	octo/cucumopine	<i>Vitis vinifera</i> cv. "Danom"	France
2410	nopaline	<i>Populus</i> sp.	M22, nd
2411	nopaline	<i>Salix purpurea</i>	CG4, Nelle Zélande
2414	nd	nd	3-24-2, Pays-Bas
2458	nd	nd	M2/1, nd
2177	nopaline	<i>Populus</i> sect. <i>Leuce</i>	France
2516	nopaline	<i>Populus</i> sect. <i>Leuce</i>	France
2517	nopaline	<i>Populus</i> sect. <i>Leuce</i>	France
2518	non pathogène	<i>Populus</i> sect. <i>Leuce</i>	France
CG1028	nd	<i>Prunus</i> cv. "Damil"	U.S.A.
Ach5	octopine	<i>Prunus</i> sp.	U.S.A.
B6	octopine/agropine	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2413, U.S.A.
Bo542	agro/mannopine	<i>Dahlia</i> sp.	Allemagne
<i>A. rhizogenes</i>			
450	nd	<i>Malus</i> cv. "M IX"	France
1804	nopaline	<i>Prunus</i> cv. "GF305"	France
1905	nopaline	<i>Vitis vinifera</i>	AG28, Grèce
1936	nopaline	<i>Rosa</i> sp.	Tahiti
1961	nopaline	<i>Populus bolleana</i>	France
1962	nopaline	<i>Prunus</i> cv. "SL64"	France
2178	nopaline	<i>Prunus</i> cv. "F12-I"	82.139, France
2417	nopaline	<i>Prunus</i> cv. "Colt"	France
2418	nopaline	<i>Prunus</i> cv. "Colt"	France
2419	nopaline	<i>Prunus</i> cv. "Colt"	France
2519	nopaline	<i>Populus</i> sect. <i>Leuce</i>	France
2520	non pathogène	<i>Populus</i> sect. <i>Leuce</i>	France
CG1029	nopaline	<i>Prunus</i> r cv. "Damil"	U.S.A.
CG1030	nopaline	<i>Prunus</i> cv. "Damil"	U.S.A.
CG1031	nopaline	<i>Prunus</i> cv. "Damil"	U.S.A.
<i>A. vitis</i>			
2512	nd	<i>Vitis vinifera</i>	Espagne
2618	octo/cucumopine	<i>Vitis vinifera</i> cv. "Cabernet Sauvignon"	France
2620	nopaline	<i>Vitis vinifera</i>	Australie
2621	nd	<i>Vitis vinifera</i> cv. "Sultana"	Grèce
2622	octo/cucumopine	<i>Vitis vinifera</i> cv. "Sultana"	Grèce
<i>A. rubi</i>			
999TR2	nopaline	<i>Rubus</i> sp.	France

Tableau 7. Liste des souches d'*Agrobacterium* de collection.

agro: agropine, octo: octopine, nd: non déterminé.

Dans la majorité des cas les souches sont disponibles à la Collection Française des Bactéries  
Phytopathogènes, INRA Angers sous leur nom de code à 4 chiffres.

diverses, provenant d'origines géographiques variées. Elles sont réparties dans les espèces *A. tumefaciens* (20 souches), *A. rhizogenes* (15 souches), *A. vitis* (5 souches) et *A. rubi* (1 souche). La plupart de ces souches contiennent un plasmide Ti à nopaline. Quelques souches de type opinique différent (2407, 2618 et 2622 à octopine/cucumopine; B6 à octopine/agropine; Bo542 à agropine/mannopine; Ach5 à octopine) ont été incluses dans l'analyse. De plus, les souches types provenant de la pépinière d'Orléans (2516, 2517, 2518, 2177, 2519 et 2520) ont également été comprises dans l'analyse. La liste de ces souches de collection, ainsi que leurs principales caractéristiques, sont indiquées dans le tableau 7.

Cette méthode de caractérisation des fonds chromosomiques et des plasmides Ti à nopaline a ensuite été appliquée à l'identification de l'ensemble des isolats d'*Agrobacterium* composant les cinq populations échantillonnées à partir des pépinières d'Orléans et de Peyrat.

### 2.2.2 Extraction d'ADN total

L'extraction de l'ADN génomique des souches de collection a été effectué selon le protocole de Dhaese *et al.* (1979) modifié. Les bactéries ont été cultivées sur milieu LPGa pendant 48h à 28°C. Les cultures ont ensuite été récupérées en microtubes et lavées trois fois dans 500µl de tampon TE 7,5 (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,5). Les culots ont été remis en suspension dans 400µl de TES 8 (Tris 20mM, EDTA 50mM, NaCl 150mM, pH 8), puis les cellules lysées par 100µl d'une solution de lysozyme (5mg/ml) pendant 1h à 37 °C et 60µl d'une solution de SDS à 5% pendant 15mn à 65°C. Les ARN ont été hydrolysés par incubation du lysat avec 5µl d'une solution de RNase (10mg/ml) pendant 1h à 37°C et les protéines éliminées par action de la pronase (1mg/40µl) pendant 1h à 37°C. Après deux extractions par un mélange de phénol/chloroforme/acide isoamylique (en proportion volumique 1/1/20), l'ADN a été précipité avec deux volumes d'éthanol absolu conservé à -20°C et 1/10e de volume d'acétate de Sodium 3M. L'ADN, après avoir été séché sous vide, a été remis en suspension dans 50µl d'eau ultrapure et conservé à -20°C.

Etant donné le grand nombre d'isolats devant être traités pour l'étude des populations, il est apparu nécessaire d'utiliser une méthode d'extraction d'ADN total plus simple et donc plus rapide. Le protocole retenu consiste en une lyse des cellules bactériennes par une série de chocs thermiques. Les cultures bactériennes ont été récoltées et mises en suspension dans 1ml de tampon TE 7,5. Les cellules ont ensuite subi trois lavages successifs dans ce même tampon. Le dernier culot a été repris dans 200µl de tampon. Après avoir été homogénéisée, la suspension bactérienne a subi trois chocs thermiques consistant en trois fois 30s d'alternance d'immersions dans un bain d'eau à 90°C et dans un bain d'azote liquide. Après une brève centrifugation (1mn à 7000rpm), le surnageant contenant l'ADN a été transféré dans un nouveau microtube, puis un traitement à la RNase a été effectué pendant 30mn à 37°C. L'ADN a été extrait par un volume de chloroforme et précipité par deux volumes d'éthanol absolu conservé à -20°C et 1/10e de volume



Amorces (a)	Séquence 5' - 3'	Origine	Référence
Chromosome			
FGPS6	GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG	<i>rrs</i> (16S) <i>Frankia</i> sp.	Normand <i>et al.</i> 1992
FGPS1509'	AAGGAGGGGATCCAGCCGCA	<i>rrs</i> (16S) <i>Frankia</i> sp.	Normand <i>et al.</i> 1992
FGPL132'	CCGGGTTTCCCCATTTCGG	<i>rrn</i> (23S) <i>Frankia</i> sp.	Normand <i>et al.</i> 1992
Plasmide Ti			
FGP <i>tmr</i> 530	CCATGTTGTTTGCTAGCCAG	pTiA6, octopine	Yanofsky <i>et al.</i> 1985
FGP <i>tmr</i> 701'	CCTTCGAATCCGTCGAAAGC	pTiA6, octopine	Yanofsky <i>et al.</i> 1985
FGP <i>nos</i> 975	CATAACGTGCATCATGCATG	pTiT37, nopaline	Bevan <i>et al.</i> 1983
FGP <i>nos</i> 1236'	CACCATCTCGTCCTTATTGA	pTiT37, nopaline	Bevan <i>et al.</i> 1983
FGP <i>vir</i> A2275	TCAAAAGGCAAGCAAGCAGATCTGG	pTiC58, nopaline	Rogowsky <i>et al.</i> 1990
FGP <i>vir</i> B2164'	TCAGTGCCGCCACCTGCAGATTG	pTiC58, nopaline	Rogowsky <i>et al.</i> 1990
FGP6 <i>b</i> 489'	CGTCGACTTCTCCTTCCTCA	pTiC58, nopaline	Brasiliero (1992)
FGP6 <i>b</i> 508	TGAGGAAGGAGAAGTCGACG	pTiC58, nopaline	Brasiliero (1992)
FGPis292	TAAGCGGCAAGCTGAC	pTi292, nopaline	cette étude

Tableau 8 . Liste des amorces utilisées pour les réactions d'amplification.

(a) la nomenclature utilisée indique le nom du gène-cible de l'amorce, suivi de la position du premier nucléotide (position 5') de l'amorce dans celui-ci. L'apostrophe signale une amorce d'orientation inverse au sens de transcription.

d'acétate de Sodium 3M. Après avoir été séché sous vide l'ADN a été repris dans 20 à 50µl d'eau ultrapure et conservé à -20°C.

Cette méthode rapide d'extraction d'ADN total a été utilisée pour les isolats de biovar1 mais s'est avérée inadéquate pour les isolats de biovar2. En effet, l'utilisation de celle-ci entraîne une détérioration de l'ADN extrait. Aussi, la méthode décrite pour les souches de collection a-t-elle également été utilisée pour l'extraction d'ADN à partir des isolats de biovar2.

### 2.2.3 Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

#### 1- Amorces d'amplification

La liste, les séquences et l'origine des amorces utilisées sont présentées dans le tableau 8. Leur localisation dans le génome des agrobactéries est schématisée dans la figure 12.

##### *Amorces chromosomiques:*

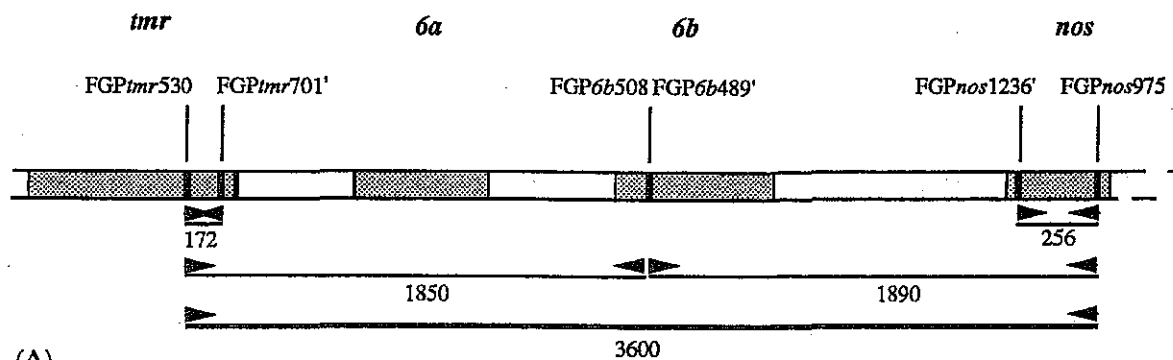
L'opéron ribosomique a été choisi pour l'identification des chromosomes d'*Agrobacterium*. Les amorces FGPS6 et FGPS1509' sont localisées en début et en fin du gène 16S respectivement, elles encadrent un fragment de 1500pb correspondant à plus de 99% de la longueur du gène 16S. L'utilisation de l'amorce FGPS6 et de l'amorce FGPL132' située à 132pb du début du gène 23S permet d'encadrer la zone comprenant le gène 16S et l'intergène entre les gènes 16S et 23S (IGS). La taille de cet intergène est variable selon les genres bactériens et est indéterminée pour *Agrobacterium*. Une estimation a pu en être faite en soustrayant les longueurs des parties 16S et 23S à la taille du fragment obtenu par amplification avec cette paire d'amorces.

##### *Amorces plasmidiques:*

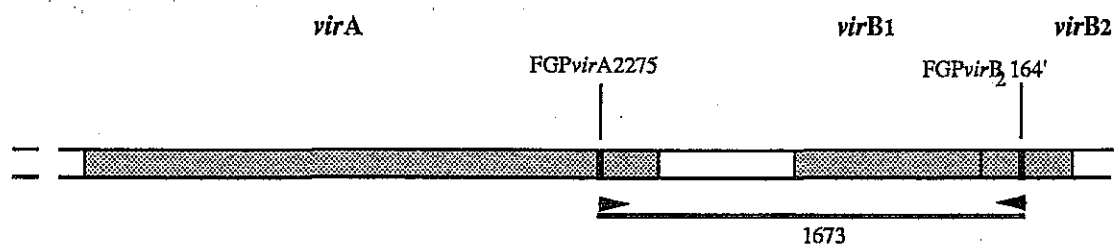
Les amorces utilisées pour l'identification des plasmides Ti ont été choisies dans la région de virulence et dans le T-DNA respectivement. Les amorces FGPvirA2275 et FGPvirB2164' sont localisées respectivement dans les gènes *virA* et *virB2* et encadrent une région de 1673pb pour la souche C58. Leurs séquences ont été déterminées d'après la séquence de l'opéron *vir* entier de la souche C58 publié par Rogowsky *et al.* (1990). Les amorces FGPtrm530 et FGPnos975 sont localisées respectivement dans les gènes *tmr* (codant pour la synthèse de cytokinine) et *nos* (codant pour la nopaline synthase), et encadrent une région d'environ 3600pb pour la souche C58. La séquence de l'amorce FGPnos975 a été choisie selon la séquence du gène *nos* de la souche T37 publiée par Bevan *et al.* (1983). La séquence de l'amorce FGPtrm530 correspond à une zone conservée entre plusieurs séquences du gène *tmr* (Yanofsky *et al.* 1985).

#### 2- Conditions d'amplification

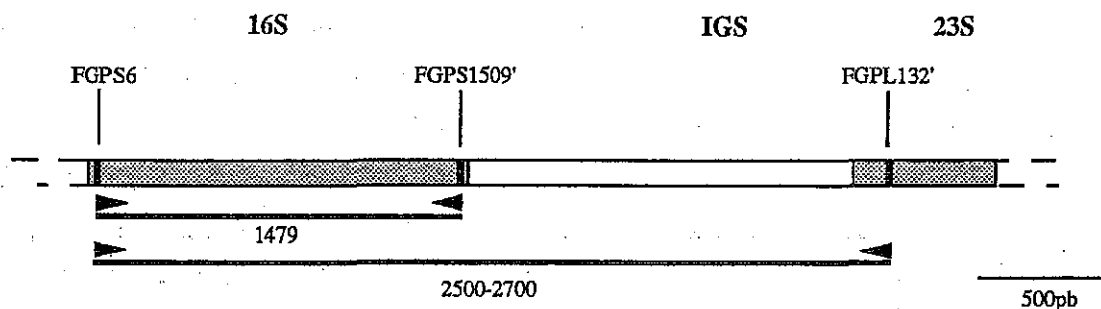
Les réactions d'amplification (Mullis et Faloona 1987) ont été effectuées dans un volume réactionnel de 50µl comprenant: 0,1µg d'ADN génomique, 20µM de chacun des quatre dNTP, 0,1µM de chaque amorce, 2,5 unités de Taq polymérase (Gibco BRL) dans le tampon de



(A)



(B)



(C)

Figure 12 . Localisation des amorces d'amplification.

(A): région du T-DNA comprise entre les gènes *tmr* et *nos*

(B): région de virulence comprise entre les gènes *virA* et *virB2*

(C): région chromosomique de l'opéron ribosomique comprenant le gène 16S et l'intergène entre les gènes 16S et 23S

Les tailles de fragments sont données en pb. Les fragments utilisés pour la méthode de PCR-RFLP sont indiqués par un trait épais.

réaction (Tris-HCl 10mM, pH 8,3, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, gélatine 0,01%). Les réactions d'amplification ont été effectuées sur un thermocycleur Techne2 (PHC-2, Techne Inc, Princeton, NJ, USA). Après une étape initiale de dénaturation pendant 3mn à 95 °C, 35 cycles de chacun 1mn de dénaturation à 95°C, 1mn d'hybridation à 55°C et 2mn d'élongation à 72°C ont été effectués, suivis par 3mn d'extension finale à 72°C.

L'efficacité des réactions a été testée par visualisation de l'ADN amplifié après électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% dans du tampon TBE (Tris borate 89mM, acide borique 89mM, EDTA 2mM, pH8) et révélation au bromure d'ethidium (0,1%).

#### 2.2.4 Vérification de la spécificité des réactions d'amplification

La spécificité des réactions d'amplification a été testée de deux façons. Lorsque la séquence de la région amplifiée était connue, une comparaison entre celle-ci et les profils de restriction du fragment amplifié a été effectuée (fragments 16S6-16S1509 et 16S6-23S132, fragments *virA2275-virB<sub>2</sub>164*). Dans le cas contraire, une vérification par hybridation et par amplification interne a dû être entreprise (fragments *tmr530-nos975*).

##### *Test par hybridation ADN/ADN:*

Il s'agissait de vérifier que les fragments d'ADN amplifiés avec les amorces FGPTmr530 et FGPNos975 étaient effectivement d'origine plasmidique. Les sondes utilisées étaient soit le pTiC58 entier (Sigma), soit le fragment *tmr530-nos975* amplifié à partir de l'ADN de la souche C58. Ces sondes ont été marquées à la digoxigénine selon le protocole de "nick-translation" du kit de détection et de marquage de l'ADN non-radioactif (Boehringer, Mannheim).

Dans un premier temps, une réaction d'hybridation entre l'ADN amplifié à partir de l'ADN total de la souche C58 et le pTiC58 a été réalisée. Puis, les ADN amplifiés à partir de l'ADN total des différentes souches de collection ont été testés par hybridation vis-à-vis de l'ADN amplifié de la souche C58. Les échantillons d'ADN (10µl) à tester ont été dénaturés volume à volume avec une solution de NaOH 1N, et déposés sur une membrane de nylon (Hybond) en dot-blot. Les étapes de préhybridation, hybridation et révélation ont été effectuées selon le protocole du kit nommé précédemment. Le principe de la détection des ADN hybridés est une réaction de chemiluminescence par décomposition d'un substrat, l'AMPPD (Boehringer). Les membranes ont été exposées pendant 5 à 12h sur film Kodak-X-omat.

##### *Test supplémentaire par amplification interne:*

Des réactions d'amplification internes aux fragments *tmr530-nos975* ont été réalisées avec les paires d'amorces situées dans le gène *tmr* d'une part (FGPTmr530 et FGPTmr701'), et dans le gène *nos* d'autre part (FGPNos975 et FGPNos1236').

L'ADN obtenu par amplification avec les amorces FGPTmr530 et FGPNos975 de l'ADN total de la souche 2178, a été purifié par électrophorèse en gel à bas point de fusion

(Nusieve) à 2% contenant du bromure d'éthidium à 1µg/ml. La bande correspondant au fragment d'amplification a été récupérée dans un microtube, dans lequel a été rajouté 500µl d'acétate de sodium 0,3M dans du tampon TE et 750µl de phénol tamponné (Tris HCl pH8). Le mélange a ensuite été chauffé à 65°C pendant 5mn, puis vortexé. La solution d'ADN obtenue après une centrifugation de 10mn à 13000rpm a été purifiée par 750µl de phénol, puis a subi deux extractions par 600µl de chloroforme. L'ADN a ensuite été précipité par deux volumes d'éthanol absolu et 1/100e de volume d'une solution de MgCl<sub>2</sub> 1M, séché puis repris dans 10µl d'eau ultrapure. L'ADN a été dilué 100 fois, puis testé en amplification avec les deux paires d'amorces internes aux gènes *tmr* et *nos*.

## 2.2.5 Analyse de restriction des produits d'amplification (PCR-RFLP)

### 1- Protocole général

Les fragments d'ADN obtenus après amplification (5µl de chaque échantillon) ont été digérés dans un volume final de 15µl avec 10 à 15 unités d'enzyme, selon les conditions préconisées par les fabricants. Les produits de restriction ont été séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose à bas point de fusion (Nusieve) à 3%, contenant 1µg/ml de bromure d'éthidium, dans du tampon TBE (Tris HCl 89mM, EDTA 2mM, pH 7,5). Les marqueurs de poids moléculaire "1kb" et "123pb" (BRL) ont été utilisés comme référence (annexe III). Les migrations électrophorétiques ont été effectuées pendant 3h à 2,5V/cm. Les profils de digestion ainsi obtenus ont été visualisés et photographiés (films Ilford FP4) sous lumière ultraviolette.

Les fragments d'ADN de taille inférieure à 70pb n'ont pas été pris en compte car ils correspondent à la limite de détection du type de gel utilisé.

### 2- Analyse des souches de collection:

#### *Analyse au niveau chromosomique:*

Les fragments d'ADN amplifié par les paires d'amorces FGPS6-FGPS1509' et FGPS6-FGPL132', obtenus à partir des 41 souches de collection, ont été digérés par des enzymes de restriction reconnaissant des sites palindromiques de quatre nucléotides. Les enzymes testés sont les suivants: *Hae*III (BRL), *Nde*II (Appligène) et *Taq*I (England Biolab) pour le 16S seul; *Hae*III, *Nde*II et *Taq*I et *Cfo*I (BRL) pour la région comprenant le gène 16S et l'intergène entre les gènes 16S et 23S.

#### *Analyse au niveau plasmidique:*

Les fragments d'ADN amplifié par les paires d'amorces FGPvirA2275-FGPvirB<sub>2</sub>164' et FGPtrmr530-FGPnos975 ont été digérés par des enzymes de restriction reconnaissant des sites de quatre ou cinq nucléotides. Les enzymes utilisés pour l'analyse de la région vir sont *Cfo*I, *Dde*I (Boehringer), *Hae*III et *Msp*I (Boehringer). Les enzymes utilisés pour

l'analyse de la région du T-DNA sont: *AluI* (BRL), *CfoI*, *DdeI*, *HaeIII*, *MspI*, *NdeII*, *RsaI* (BRL), *TaqI*, *ApyI*, *AvaII* (Boehringer), *BstBUI* (England Biolab), *DsaV* (Boehringer) et *Sau96I* (BRL).

### 3- Analyse des isolats

#### *Identification des fonds chromosomiques*

L'étude systématique des isolats d'*Agrobacterium* de peupliers a été effectuée par l'analyse des profils de restriction obtenus avec un seul enzyme, vu le grand nombre d'isolats devant être traités. L'enzyme utilisé a été choisi d'après les résultats obtenus à partir de l'analyse sur les souches de collection, selon les critères de discrimination maximale et de différenciation des souches isolées de la pépinière d'Orléans 2516, 2177, 2517, 2518, 2519 et 2520.

Les isolats de biovar1 ont été identifiés selon leur profil *TaqI* de la région ribosomique, les isolats de biovar2 ont été identifiés selon leur profil *HaeIII* de la région ribosomique. Pour chaque population l'effectif de chaque profil chromosomique (ribotype) a été répertorié.

#### *Identification des plasmides Ti*

L'analyse des plasmides Ti contenus dans les isolats a été effectuée par les profils de restriction des fragments *tmr530-nos975*. Les ADN amplifiés par les amorces FGPTmr530 et FGPNos975 ont été digérés par les enzymes *DdeI*, *RsaI* et *TaqI*. Pour chaque population l'effectif de chaque type plasmidique a été répertorié.

Le regroupement des résultats de digestion a permis de définir les différents types de plasmides Ti associés aux différents fonds chromosomiques.

### 2.3. Analyse et interprétation des données obtenues par PCR-RFLP:

#### 2.3.1 Validation de la méthode appliquée au genre *Agrobacterium*:

##### Caractérisation des fonds chromosomiques des souches de collection

La comparaison des différents profils obtenus avec les quatre enzymes testés a été utilisée pour définir des relations génétiques existant entre les séquences ribosomiques des souches. Les coefficients de similitudes (F) ont été calculés en répertoriant le nombre de bandes communes entre les profils pris deux à deux, par rapport au nombre total de bandes des deux profils comparés. La formule de Nei et Li (1979) permettant d'évaluer la similitude entre deux profils est la suivante:  $F = 2n_{xy} / n_x + n_y$ , ,

où  $n_{xy}$  représente le nombre de fragments co-migrants (en considérant tous les enzymes testés) et  $n_x$  et  $n_y$  sont les nombres totaux de bandes pour les souches  $x$  et  $y$  respectivement. A partir de ces valeurs de F, une estimation des distances génétiques entre les différentes séquences, a été calculée

par la méthode de Nei (1987). Un dendrogramme a été construit à partir de la matrice des distances par la méthode UPGMA (Sokal et Sneath 1963).

## 2- Caractérisation des plasmides Ti à nopaline des souches de collection

Les plasmides Ti ont été classés en différents types d'après les profils de la région *virA-virB<sub>2</sub>* avec les enzymes *CfoI* et *DdeI* et les profils de la région *tmr530-nos975* obtenus avec les enzymes *DdeI*, *TaqI*, *RsaI*, *MspI*.

### 2.3.2 Analyse de la structure des populations naturelles

Chaque population a été définie par:

- (a) sa richesse, qui correspond aux nombres de ribotypes, de types plasmidiques et de génotypes (ces derniers prenant en compte les données chromosomiques et plasmidiques simultanément)
- (b) les effectifs de chacune de ces catégories, permettant d'évaluer la diversité.

#### 1-Evaluation de la richesse

La richesse de chaque population a été évaluée par l'indice de Margalef (Clifford et Stephenson 1975).

$$D_{Mg} = (S - 1) / \ln N \quad (1)$$

S correspond au nombre de types identifiés, N est le nombre total d'individus analysés.

#### 2-Estimation de la diversité

##### *Calcul des indices de diversité*

Le degré de diversité des différentes populations échantillonnées a été mesuré par l'indice de Shannon (Pielou 1969, 1975) selon la formule:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i \quad (2)$$

On désigne par  $n_i$  l'effectif du type  $i$  et par  $p_i$  l'abondance relative du type  $i$  dans la population ( $p_i = n_i/N$ ), avec N la somme des effectifs des S types identifiés dans la population considérée. La valeur de  $H'$  varie de 0, si un seul type d'isolat compose la population étudiée, à  $\ln S$  si tous les types recensés ont la même abondance.

L'évaluation de la diversité a été effectuée à plusieurs niveaux: en considérant les types chromosomiques, les types plasmidiques ou les génotypes.

##### *Comparaison statistique des indices de diversité*

Le calcul des variances des indices  $H'$  permettent de comparer les indices  $H'$  par un test t, afin de savoir si les différences observées des indices entre les populations sont significatives.

La variance est déterminée par la formule:

$$\text{var } H' = \frac{\sum p_i (\ln p_i)^2 - (\sum p_i \ln p_i)^2}{N} + \frac{S-1}{2N^2} \quad (3)$$

Le test statistique est réalisé par le calcul de la valeur de  $t$  et du nombre de degrés de liberté (Hutcheson 1972):

$$t = \frac{H'_1 - H'_2}{(\text{var } H'_1 + \text{var } H'_2)^{1/2}} \quad (4)$$

$$ddl = \frac{(\text{var } H'_1 + \text{var } H'_2)^2}{(\text{var } H'_1)^2 / N_1 + (\text{var } H'_2)^2 / N_2} \quad (5)$$

avec, d'une part  $H'_1$  et  $H'_2$  les indices de diversité des populations 1 et 2 comparées; et d'autre part  $N_1$  et  $N_2$  le nombre d'individus analysés pour ces deux populations.

### 3-Comparaison de la structure des populations

Les populations ont été comparées deux à deux en utilisant le test statistique du nombre de paires. Ce test constitue une alternative au test du  $\chi^2$  dans le cas de faibles effectifs (limité à 5). Il consiste à tester l'homogénéité d'un tableau à deux colonnes, en calculant le nombre de paires NP (équation 7) de chaque case du tableau, l'espérance  $E(NP)$  et la variance  $V(NP)$  (équations 8). La valeur de NP est alors testée selon une loi normale centrée réduite (équation 9).

(a) *Nombre de paires NP:*

$$NP = \sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^c \frac{y_{ij}(y_{ij} - 1)}{2} \quad (7)$$

c: colonne, l: ligne, y: effectif de la  $j^{\text{ème}}$  colonne et  $i^{\text{ème}}$  ligne

(b) *Espérance  $E(NP)$  et variance  $V(NP)$ :*

Calcul des effectifs des lignes et colonnes de marges

$$\begin{aligned} C_{(2)} &= \sum_{j=1}^c C_j(C_j - 1) \\ C_{(3)} &= \sum_{j=1}^c C_j(C_j - 1)(C_j - 2) \\ L_{(2)} &= \text{id.} \\ L_{(3)} &= \text{id.} \end{aligned} \quad (8)$$



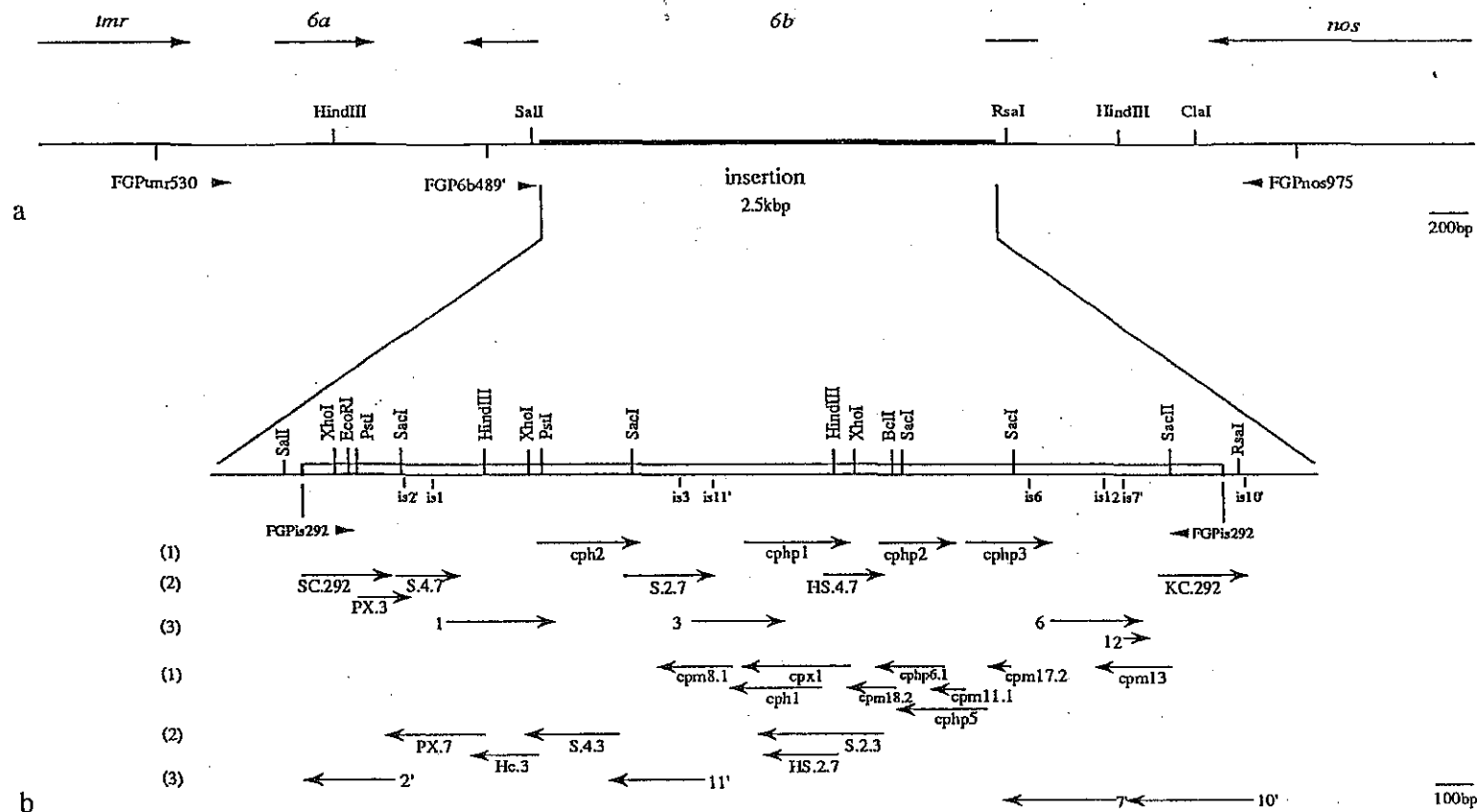


Figure 13 . Carte de restriction de la région du T-DNA contenant l'insertion

(a) Carte de la zone comprenant les gènes *tmr* et *nos*. L'insertion est représentée par un trait épais .

(b) Carte de restriction l'insertion et stratégies de clonage.

Les flèches indiquent l'orientation et la taille de chaque fragment séquencé.

(1) fragments clonés dans les sites *Hpa*II, *Mbo*I, *Hind*III et *Xho*I de M13mp18.

(2) fragments clonés dans les sites *Hind*III, *Pst*I, *Sac*I et *Xho*I de pSK.

(3) fragments obtenus avec les amorces internes.

La position des amorces d'amplification et de séquençage est indiquée sous les cartes.

$$E(NP) = \frac{C_{(2)} L_{(2)}}{2N(N-1)}$$

$$V(NP) = \frac{[(C_{(2)})^2 - 4C_{(3)} - 2C_{(2)}][(L_{(2)})^2 - 4L_{(3)} - 2L_{(2)}]}{4N(N-1)(N-2)(N-3)} + \frac{C_{(3)}L_{(3)}}{N(N-1)(N-2)} + E(NP) - [E(NP)]^2$$

(c) *Test du nombre de paires:*

$$NP^* = \frac{NP - E(NP)}{\sqrt{V(NP)}} \quad (9)$$

Le nombre de paire NP est testé selon une loi normale centrée réduite:  $-1,96 < NP^* < +1,96$  au risque  $\alpha=0,05$ .

### 3. CARACTERISATION D'UNE INSERTION DANS LE T-DNA

#### 3.1. Localisation de l'insertion

Dans un premier temps, l'insertion a été localisée par cartographie sommaire avec les enzymes *Hind*III et *Rsa*I, de la région *tmr530-nos975* amplifiée à partir de l'ADN de l'isolat X88292, avec la souche 2177 comme référence. La zone d'investigation a ensuite été réduite par l'utilisation des amorces FGP6b508 et FGP6b489' situées en fin de gène *6b* (tableau 8). La séquence de ces amorces a été déterminée par comparaison des séquences du gène *6b* des souches C58 et 82 139 (Brasileiro, thèse). Elles sont identiques au niveau de leur séquence mais sont d'orientation inverses l'une par rapport à l'autre. L'amorce FGP6b508 couplée à l'amorce FGPTmr530 encadre une zone d'environ 1850pb pour la souche C58. L'amorce FGP6b489' couplée à l'amorce FGPnos975 encadre une zone d'environ 1890pb pour ces mêmes souches (figure 12). Ces deux paires d'amorces ont été testées sur l'ADN des souches X88292 et 2177 afin d'orienter l'insertion par rapport au site des amorces FGP6b508 et FGP6b489'.

Dans un deuxième temps, une localisation plus précise de l'insertion a été effectuée à partir de l'ADN des souches X88292 et 2177 amplifié avec les amorces FGP6b508 et FGPnos975 et digéré par *Sal*I.

#### 3.2. Caractérisation de l'insertion par séquençage

##### 3.2.1 Stratégies de séquençage

En premier lieu une carte de restriction de la région *6b489-nos975* a été élaborée, afin de connaître les sites encadrant l'insertion et les sites présents dans l'insertion (figure 13a).

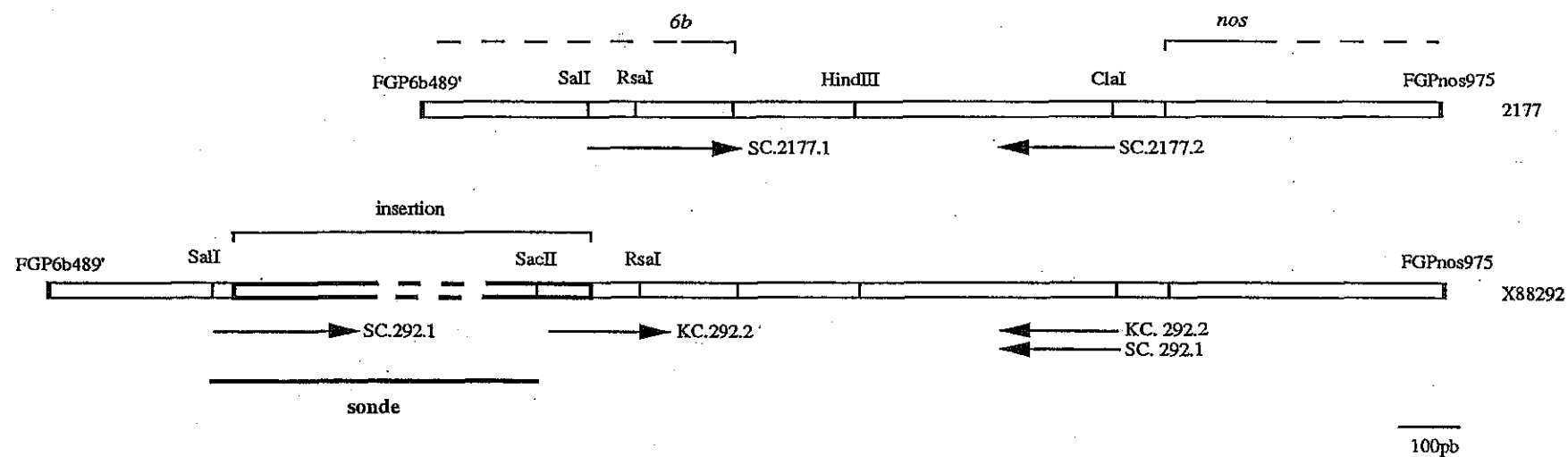


Figure 14 . Stratégie de clonage utilisée pour le séquençage des extrémités de l'insertion et la comparaison entre les plasmides Ti 2177 et 292.

Les clones SC.2177.1, SC.2177.2, SC.292.1, SC.292.2 désignent les fragments *SalI/ClaI* des plasmides Ti 2177 et 292 respectivement; et les clones KC.292.1, KC.292.2 les fragments *SacII/ClaI* du pTi292.

## 1-Séquençage des extrémités et du site d'insertion

Cette première étape de séquençage a été effectuée en parallèle sur les souches 2177 et X88292. Les fragments *Sall/ClaI* et *Sall/SacII* obtenus à partir des fragments d'amplification *6b508-nos975* des plasmides Ti 2177 et X88292 ont été clonés dans le vecteur pBluescriptSK<sup>+</sup> (Stratagène, La Jolla CA). Le fragment *Sall/ClaI* 2177 (environ 800pb) contient le début du gène *6b* et une partie de l'intergène *6b - nos*. Le fragment *Sall/ClaI* 292 (environ 3200pb) correspond à la même zone plus l'insertion. Le fragment *Sall/SacII* 292 (environ 2400pb) correspond à l'extrémité droite de l'insertion plus une partie de l'intergène *6b - nos*.

La localisation des clones séquencés afin de caractériser les extrémités de l'insertion et le site d'insertion est indiquée sur la figure 14.

## 2-Détermination de la séquence nucléotidique complète

Trois étapes successives ont été envisagées pour séquencer entièrement l'insertion:

- clonage au hasard de fragments de restriction de l'insertion dans le phage M13
- clonage dirigé par la carte de restriction de l'insertion dans pBluescriptSK<sup>+</sup>
- détermination d'amorces de séquençage internes à partir des séquences obtenues

(Le matériel utilisé dans ces différents cas est précisé dans la figure 15)

### Clonage dans M13:

Cette étape a été réalisée à partir de l'ADN de la souche X88292 amplifié avec l'amorce FGPis292 encadrant l'insertion et déterminée d'après les séquences des extrémités. Les fragments obtenus par digestion partielle avec les enzymes à site de quatre bases, *HpaII* et *MboI*, ainsi que les fragments *HindIII* et *XhoI* ont été clonés dans le phage M13mp18 (BRL) (Yannish Perron *et al.* 1985)

### Clonage dans pBluescriptSK<sup>+</sup>:

L'ADN obtenu par amplification avec l'amorce FGPis292 à partir de l'ADN du clone SC.292.5 (fragment *Sall/ClaI*) a été digéré avec les enzymes *PstI* et *XhoI*, *HindIII* et *SacI* en digestions doubles; et *SacI*, *HincII* en digestions simples. Les fragments *PstI/XhoI*, *SacI*, *HindIII/SacI* et *HincII* ont été clonés dans le plasmide pBluescriptSK<sup>+</sup>.

### Utilisation d'amorces internes:

Sur la base des parties séquencées, des amorces de 15pb internes à l'insertion ont été déterminées afin de compléter les parties manquantes de la séquence sur le brin complémentaire. Le séquençage à l'aide de ces amorces a été accompli à partir de l'ADN du clone SC.292.5. La liste de ces amorces ainsi que leur séquence sont précisées dans le tableau 9.

La figure 13b. indique la position relative et l'orientation des fragments utilisés pour déterminer la séquence nucléotidique complète de l'insertion, ainsi que la localisation des amorces.

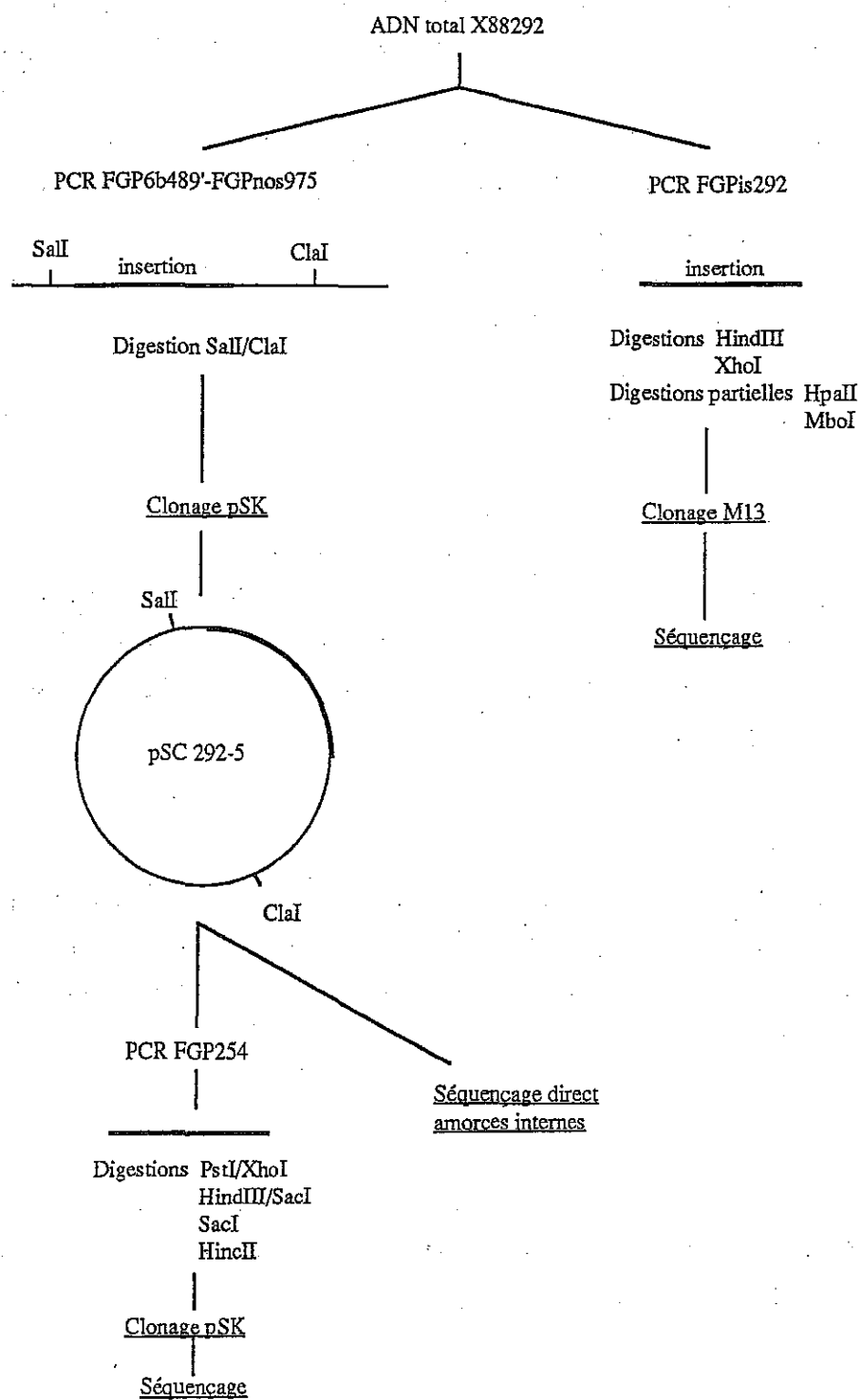


Figure 15. Matériel utilisé pour le clonage et le séquençage de l'insertion.

## 1- Séquençage des extrémités et du site d'insertion

Cette première étape de séquençage a été effectuée en parallèle sur les souches 2177 et X88292. Les fragments *Sall/ClaI* et *Sall/SacII* obtenus à partir des fragments d'amplification 6b508-nos975 des plasmides Ti 2177 et X88292 ont été clonés dans le vecteur pBluescriptSK<sup>+</sup> (Stratagene, La Jolla, CA). Le fragment *Sall/ClaI* 2177 (environ 800pb) contient le début du gène *6b* et une partie de l'intergène *6b - nos*. Le fragment *Sall/ClaI* 292 (environ 3200pb) correspond à la même zone plus l'insertion. Le fragment *Sall/SacII* 292 (environ 2400pb) correspond à l'extrémité droite de l'insertion plus une partie de l'intergène *6b - nos*.

La localisation des clones séquencés afin de caractériser les extrémités de l'insertion et le site d'insertion est indiquée sur la figure 14.

## 2- Détermination de la séquence nucléotidique complète

Trois étapes successives ont été envisagées pour séquencer entièrement l'insertion:

- clonage au hasard de fragments de restriction de l'insertion dans le phage M13
- clonage dirigé par la carte de restriction de l'insertion dans pBluescriptSK<sup>+</sup>
- détermination d'amorces de séquençage internes à partir des séquences obtenues

(Le matériel utilisé dans ces différents cas est précisé dans la figure 15)

### Clonage dans M13:

Cette étape a été réalisée à partir de l'ADN de la souche X88292 amplifié avec l'amorce FGPis292 encadrant l'insertion et déterminée d'après les séquences des extrémités. Les fragments obtenus par digestion partielle avec les enzymes à site de quatre bases, *HpaII* et *MboI*, ainsi que les fragments *HindIII* et *XhoI* ont été clonés dans le phage M13mp18 (BRL) (Yannish-Perron *et al.* 1985)

### Clonage dans pBluescriptSK<sup>+</sup>:

L'ADN obtenu par amplification avec l'amorce FGPis292 à partir de l'ADN du clone SC.292.5 (fragment *Sall/ClaI*) a été digéré avec les enzymes *PstI* et *XhoI*, *HindIII* et *SacI* en digestions doubles; et *SacI*, *HincII* en digestions simples. Les fragments *PstI/XhoI*, *SacI*, *HindIII/SacI* et *HincII* ont été clonés dans le plasmide pBluescriptSK<sup>+</sup>.

### Utilisation d'amorces internes:

Sur la base des parties séquencées, des amorces de 15pb internes à l'insertion ont été déterminées afin de compléter les parties manquantes de la séquence sur le brin complémentaire. Le séquençage à l'aide de ces amorces a été accompli à partir de l'ADN du clone SC.292.5. La liste de ces amorces ainsi que leur séquence sont précisées dans le tableau 9.

La figure 13b. indique la position relative et l'orientation des fragments utilisés pour déterminer la séquence nucléotidique complète de l'insertion, ainsi que la localisation des amorces.

Amorce	Séquence 5' - 3'	Position (a)
is 1	GCAAAGTCGTCTGCC	360 - 374
is 2'	TTTCTGACCGACGGC	285 - 270
is 3	TGCCCCGCCTCAATGA	1037 - 1051
is 6	ATCGATGGTCGCCAG	1986 - 2001
is 7'	CAATTGCGCGTCGCA	2255 - 2241
is 10'	AGAGCTGGTCTATGT	2544 - 2529
is 11'	AGCGAAGTTCCGTGT	1140 - 1126
is 12	CGAGGCATCACGACG	2192 - 2206

Tableau 9 . Liste des amorces utilisées pour le séquençage.

(a): position nucléotidique par rapport au début de l'insertion

L'apostrophe signale une amorce d'orientation inverse.

### 1- Réaction de ligation:

L'ADN purifié et l'ADN du vecteur (M13mp18 ou pBluescriptSK<sup>+</sup>) ont été vérifiés sur gel d'agarose à 0,8% avant d'être soumis à digestion par les enzymes de clonage selon les indications des fournisseurs. Après 1 heure de réaction, les mélanges de digestion ont été soumis à une température de 70°C pendant 10mn pour inactiver les enzymes, puis rassemblés et précipités à l'éthanol absolu. Le culot a été repris dans 9µl d'H<sub>2</sub>O ultrapure auxquels ont été ajoutés 1µl de tampon ligase et 1 unité de ligase T4 (Boehringer). La réaction de ligation a été réalisée pendant une nuit à 20°C. Le mélange de ligation a été conservé à +4°C avant son utilisation pour la transformation. L'efficacité de la réaction a été vérifiée par une migration sur gel d'agarose 0,8% de 1µl du mélange avant et après la réaction de ligation.

### 2- Obtention de cellules compétentes:

La souche d'E.coli DH5αF' (BRL) a été mise en préculture pendant une nuit à 37°C sous agitation dans 10ml de milieu LB (extrait de levure 5g/l; Bactopepetone 10g/l; NaCl 5g/l). La préculture (1ml) a été utilisée pour inoculer 100ml de milieu LB, afin d'obtenir une culture présentant une DO<sub>600</sub> comprise entre 0,2 et 0,5 (ce qui correspond à au moins 10<sup>7</sup> cellules/ml). La suspension bactérienne a été refroidie dans la glace avant d'être centrifugée pendant 5mn à 5000rpm à +4°C. Le culot a été remis en suspension délicatement avec le reste de milieu, puis 40ml de solution de transformation (CaCl<sub>2</sub> 50mM, Tris 10mM, pH8) ont été ajoutés. Le mélange a été maintenu dans la glace pendant au moins 20mn, puis centrifugé pendant 5mn à 5000rpm à +4°C. Le culot a été repris dans 3ml de solution de transformation et incubé dans la glace pendant 3 à 24h avant la transformation.

### 3- Transformation:

Chaque ADN transformant (4µl de chaque mélange de ligation) a été ajouté à 200µl de la suspension de cellules compétentes. Le mélange de transformation a ensuite été placé à +4°C pendant 30mn. Les cellules ont alors subi un choc thermique par immersion dans un bain à 42°C pendant 2mn.

### 4- Obtention des clones pBluescriptSK<sup>+</sup>:

A chaque échantillon a été rajouté 1ml de milieu LB puis les bactéries ont été incubées pendant 90mn à 37°C sous agitation. Les suspensions bactériennes ont été étalées sur milieu selectif (LB, X-Gal (60µg/ml), IPTG (800µg/ml), ampicilline (50mg/ml)) et incubées pendant une nuit à 37°C. Les bactéries ayant été transformées par un vecteur SK recombinant (ayant intégré le fragment d'ADN à cloner) forment des colonies blanches, alors que les autres forment des colonies bleues.



#### 5- Extraction de l'ADN plasmidique par la méthode de lyse alcaline (selon Maniatis *et al.* 1982)

Les colonies blanches ont été repiquées sur du milieu LB solide contenant de l'ampicilline afin de vérifier leur pureté. Chaque clone ainsi obtenu a été mis en culture dans 5ml de milieu LB liquide contenant de l'ampicilline à 37°C pendant une nuit sous agitation. Chaque culture a été centrifugée pendant 1mn à 13000rpm à +4°C, et le culot repris dans 100µl de tampon GTE (Tris-HCl 25mM pH8, EDTA 10mM, glucose 50mM). La suspension a été maintenue à température ambiante pendant 5mn, puis 200µl de solution lytique (NaOH 0,2N, SDS 1%) ont été rajoutés. Après une lyse de 5mn dans la glace, les protéines ont été précipitées par 150µl de solution de précipitation (acétate de K, CH<sub>3</sub>COOH glacial). La solution a été vortexée puis incubée dans la glace avant d'être centrifugée pendant 5mn à 13000rpm à +4°C. L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant a été purifié par un volume du mélange phénol/chloroforme et précipité par deux volumes d'éthanol absolu. L'ADN de chaque clone a été repris dans 50µl de TE pH8 contenant 20µg/ml de RNase.

La quantité et la taille des plasmides ainsi extraits ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%. Un aliquot de cet ADN a été digéré par les enzymes de clonage afin de libérer l'insert et de vérifier sa taille.

#### 6- Obtention des clones M13:

La souche DH5α a été mise en culture dans 10ml de milieu LB à 37°C afin de servir de tapis bactérien. Les cellules transformées ont été déposées sur boîte de Pétri contenant du milieu LB, puis 3ml de mélange top-agar (3ml de milieu LB, 40µl de cellules de tapis, 40µl d'IPTG, 40µl de X-gal) ont été versés et répartis sur toute la surface de la boîte. Les boîtes ont été incubées pendant une nuit à 37°C. Les bactéries ayant été transformées par un vecteur M13 recombinant (ayant intégré le fragment d'ADN à cloner) forment des plages turbides, alors que les autres forment des colonies bleues.

#### 7- Extraction de l'ADN phagique et vérification des clones M13 (M13 Strategies Manual, BRL):

Les plages turbides ont été prélevées et mises en culture dans 3ml de milieu LB liquide contenant de l'ampicilline (50mg/ml) à 37°C pendant une nuit sous agitation. Chaque culture (un aliquot de 1,5ml) a été centrifugée pendant 5mn à 13000rpm, 1,2ml du surnageant a été transféré dans un microtube contenant 300µl de PEG 20% NaCl 2,5M et vortexé. La précipitation des particules phagiques s'est effectuée pendant 20mn à température ambiante. La solution a été centrifugée pendant 10mn à 13000rpm et le surnageant éliminé entièrement. Le culot a été repris dans 100µl de tampon TE 7,5 et vortexé. L'ADN a ensuite été extrait par 50µl d'un mélange de phénol/chloroforme. Le surnageant après centrifugation a été ajouté à 9µl d'acétate de Sodium 3M pH 5, précipité avec 100ml de propanol-2 et centrifugé 30mn à 13000rpm. L'ADN des clones recombinants ainsi obtenu a été repris dans 10µl de TE 7,5. La quantité et la taille des plasmides ainsi extraits ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%.

---

#### 4. TEST DU POUVOIR TUMORIGÈNE

---

Les tests de pouvoir tumorigène ont été réalisés selon le protocole de Brasiliero *et al.* (1992). Les inoculations ont été effectuées sur des plants de peuplier issus de micropropagation du clone 717-1B4 (*P. tremula* x *P. alba*), maintenus sur milieu MS (Murashige et Skoog 1962) à 2% de sucrose sans hormone. Les souches d'*Agrobacterium* ont été cultivées sur milieu MYA solide à 27°C. Une suspension a été préparée à partir de chaque culture et ajustée à une densité correspondant à une DO<sub>660</sub> de 0,3.

Les plants âgés de six semaines ont été infectés par blessure avec une pince trempée dans la suspension bactérienne, en utilisant la souche C58 T139 comme référence. Pour chacun des 10 isolats testés, 10 plants ont été inoculés aux deuxièmes et quatrièmes internoeuds à partir de l'apex. Un mois après l'inoculation, les tumeurs de taille supérieure ou égale à 3mm ont été excisées et décontaminées pendant 16h sous agitation dans du milieu MS (contenant de la tétracycline à 25mg/l). Après un lavage intensif, les tumeurs ont été transférées sur milieu MS solide sans hormone contenant les bactériostatiques Cefotaxine (500mg/l) et Ticarcilline (250mg/l). Les observations ont été faites régulièrement pour suivre le développement des tumeurs et de leur morphologie.

**PARTIE III.**

**CARACTERISATION DES *AGROBACTERIUM* AU NIVEAU  
CHROMOSOMIQUE ET PLASMIDIQUE PAR LA METHODE DE PCR-RFLP**

## INTRODUCTION

Toute étude de population nécessite une méthode d'identification des individus, conjugant les qualités de fiabilité et de rapidité. De plus, l'orientation de l'étude déterminera le degré de précision adéquat: genre, espèce, souche. Dans le cas d'*Agrobacterium*, nous avons envisagé une caractérisation des souches portant sur les fonds chromosomiques et les plasmides Ti de façon indépendante. L'approche devra permettre une discrimination suffisante pour appréhender la structure des populations d'agrobactéries à l'échelle infraspécifique.

L'analyse du polymorphisme des fragments de restriction de fragments d'ADN amplifiés par PCR a été développée dans le but de caractériser des micro-organismes appartenant à des genres variés (Cubeta *et al.* 1991, Gurtler *et al.* 1991, Jamann *et al.* 1993, Navarro *et al.* 1992, Regnery *et al.* 1991, Vilgalys et Hester 1990). Par cette approche, le profil de restriction d'une séquence donnée est assigné à chaque individu. Cette méthode présente les avantages d'être rapide et d'engendrer des profils de restriction simples permettant une lecture aisée des profils. De plus, la possibilité de cibler, par le choix des amorces oligonucléotidiques, exactement une région du génome présente un énorme intérêt dans le cas d'*Agrobacterium* permettant de caractériser les fonds chromosomiques d'une part et les plasmides Ti d'autre part.

Les parties du génome ciblées pour la caractérisation des isolats d'*Agrobacterium* ont été choisies dans des régions variables, encadrées par des zones plus conservées à partir desquelles ont été déterminées des amorces d'amplification. De façon générale, les parties non codantes du génome comprises entre deux gènes (espace intergénique) subissent une pression de sélection moindre comparées aux gènes, elles sont donc à priori plus polymorphes. Certaines études ont porté sur des zones correspondant à une fonction spécifique de la bactérie étudiée, telles que les gènes *nif* (Jamann *et al.* 1993). Cependant, peu de séquences portées par le chromosome et spécifiques à *Agrobacterium* sont connues actuellement. La plupart des travaux de PCR-RFLP sur les différents genres bactériens ont été basés sur des séquences d'ADN ribosomique. En effet, cette région a été particulièrement bien étudiée et les séquences du gène 16S principalement, et du gène 23S de différents genres, sont disponibles. Les Rhizobiacées ont récemment fait l'objet d'études taxonomiques basées sur la comparaison des séquences du gène 16S (Sawada *et al.* 1993, Willems et Collins 1993, Yanagi et Yamasato 1993) montrant son utilité pour la définition des espèces. De plus, l'analyse de l'opéron ribosomique de différentes espèces bactériennes a mis en évidence l'existence de zones présentant différents niveaux de variabilité (figure 16, Normand *et al.* 1994). Sur la base des analyses des séquences nucléotidiques, le gène 16S apparaît fortement conservé parmi les souches appartenant à une même espèce génomique (Nazaret *et al.* 1992). D'autre part, Navarro *et al.* (1992) ont montré que l'espace intergénique entre les gènes 16S et 23S (IGS ou ITS) de *Nitrobacter* sp. est beaucoup moins conservé que le gène 16S. L'IGS apparaît suffisamment variable chez les Protéobactéries pour permettre la comparaison de souches proches

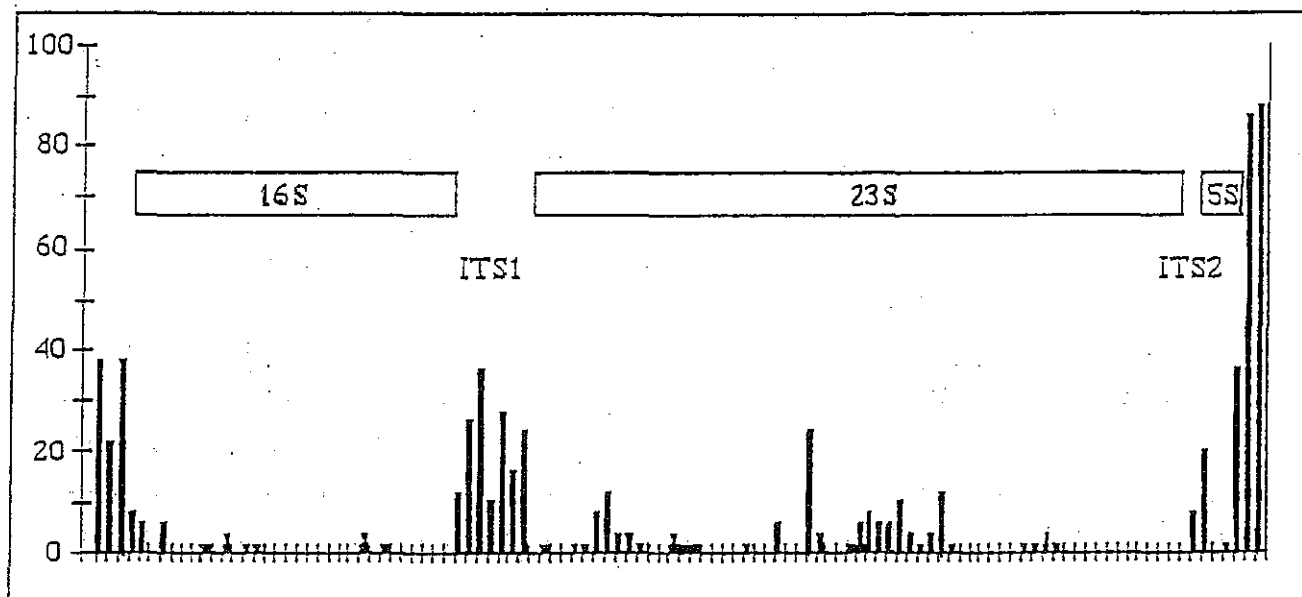


Figure 16. Histogrammes représentant la variabilité (%) des séquences ribosomiques entre deux souches de *Frankia* (d'après Normand *et al.* 1994).  
(ITS: internal transcribed spacer, correspond à l'IGS)

(Nomand *et al.* 1994), mais n'a pas encore été étudié chez *Agrobacterium*. Nous avons choisi d'étudier le polymorphisme de la région comprenant le gène 16S et la zone intergénique, afin de l'appliquer à l'identification des fonds chromosomiques des souches d'*Agrobacterium*.

De nombreux travaux se sont intéressés à l'étude de la fonction des gènes portés par le pTi (cf partie Bibliographique) et à leur séquençage. L'organisation des gènes de la région de virulence et du T-DNA a été particulièrement étudiée et des séquences conservées dans ces régions ont été mises en évidence. D'autre part, des études en RFLP par hybridation sur la partie droite du T-DNA montrent l'occurrence de plusieurs génotypes parmi les plasmides Ti à nopaline (Michel *et al.* 1990) indiquant un certain polymorphisme de cette zone. Ces connaissances nous ont conduit à rechercher des amorces d'amplification ciblant, d'une part la région du T-DNA comprise entre les gènes *tmr* et *nos* avec trois zones intergéniques et d'autre part la région comprise entre les gènes *virA* et *virB<sub>2</sub>* avec un intergène.

Dans cette partie nous avons utilisé la méthode de PCR-RFLP appliquée à la région ribosomique localisée sur le chromosome d'une part, et aux régions de virulence et du T-DNA des plasmides Ti d'autre part, pour caractériser un ensemble de souches d'*Agrobacterium* de collection d'origines géographiques variées et issues de différentes plantes-hôte. Les résultats seront comparés avec ceux obtenus par des méthodes concernant le génome entier afin de valider cette approche pour la caractérisation des souches d'*Agrobacterium* et son application à l'étude des populations naturelles.

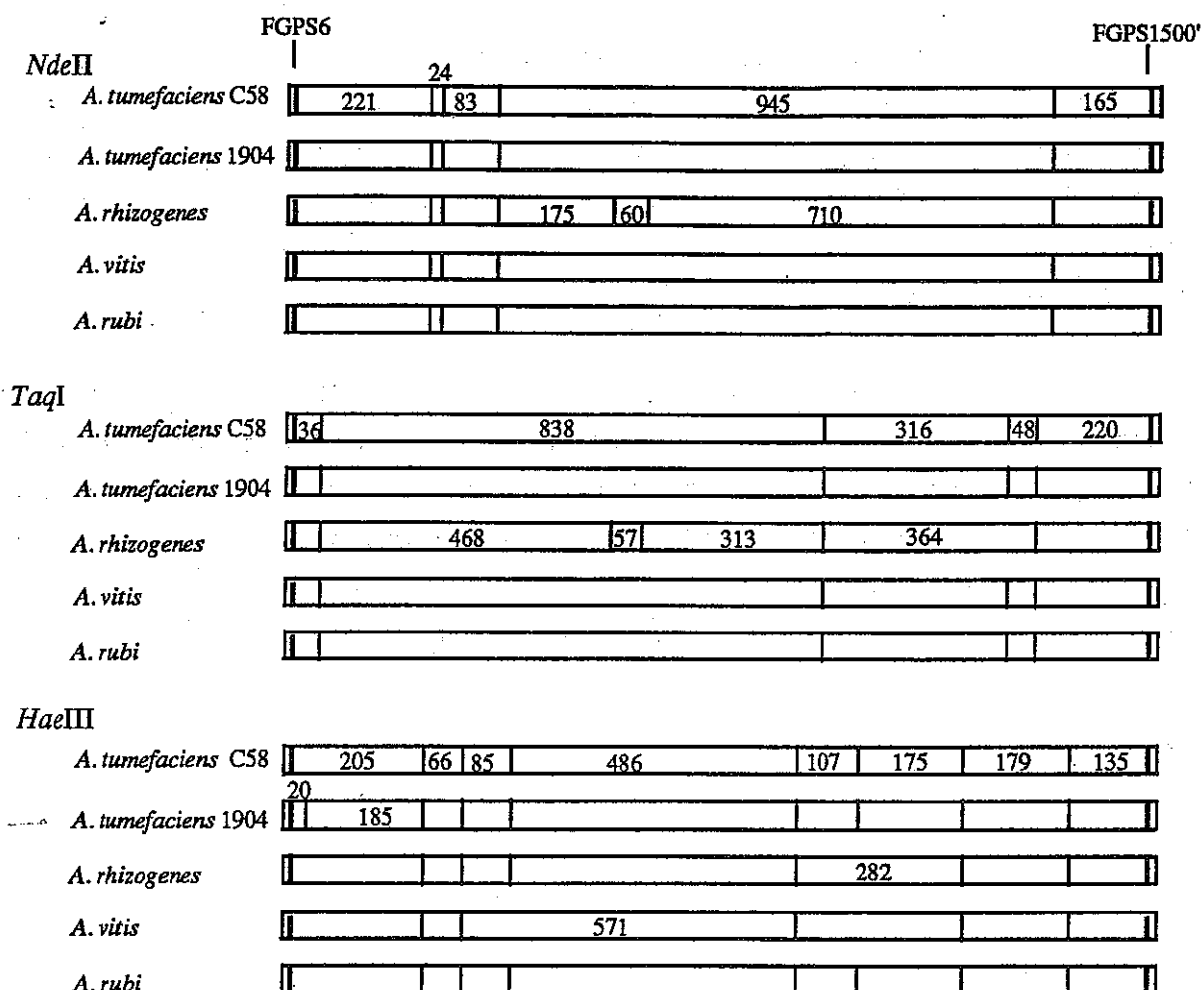


Figure 17. Cartes de restriction du gène 16S obtenues avec les enzymes *NdeII*, *TaqI* et *HaeIII* caractérisant les espèces d'*Agrobacterium*

Les sites ont été localisés d'après les séquences nucléotidiques publiées par Willems et Collin (1993). Les tailles des fragments sont données en pb. La position des amorces FGPS6 et FGPS1500' encadrant le gène 16S est indiquée.

## 1. Analyse des fonds chromosomiques

### 1.1 Polymorphisme du gène 16S de l'opéron ribosomique

#### 1.1.1 Résultats d'amplification et vérification de la spécificité

Les réactions d'amplification du gène 16S ciblé par les amorces FGPS6 et FGPS1509', ont donné un seul fragment d'environ 1500pb pour toutes les souches d'*Agrobacterium* de collection testées (résultat non montré). Ceci correspond à la taille attendue d'après la séquence nucléotidique du gène 16S publiée par Willems et Collin (1993).

L'analyse de restriction des fragments 16S8-16S1509 avec les enzymes *Hae*III, *Nde*II et *Taq*I est concordante avec la séquence du gène 16S (Willems et Collin 1993) pour toutes les souches appartenant aux espèces *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis* et pour la souche d'*A. rubi* (figure 17). Ces observations indiquent que l'ADN amplifié correspond effectivement, dans tous les cas, au gène 16S ciblé. La taille des fragments de restriction du gène 16S pour chaque profil est indiquée dans l'annexe IV.

#### 1.1.2 Discrimination des espèces par le polymorphisme du gène 16S

Les différents profils de restriction des fragments 16S8-16S1509 obtenus pour les souches des quatre espèces sont représentés dans la figure 18. Le nombre de bandes obtenues par profil varie selon les enzymes utilisés: 4 à 6 pour *Nde*II et *Taq*I, 6 à 8 pour *Hae*III. Sur la base des similarités des sites de restriction du gène 16S, les souches ont pu être classées en 4 groupes. Ces groupes correspondent à 3 espèces, avec une séparation de l'espèce *A. tumefaciens* en deux sous-groupes distincts. La souche d'*A. rubi* n'a pas été différenciée des souches de l'espèce *A. tumefaciens* avec les trois enzymes testées.

L'ensemble des résultats de l'analyse de restriction des fragments 16S8-16S1509 est indiqué dans le tableau 10. Deux sites *Nde*II (N1 et N2) et un site *Taq*I (T) sont spécifiques des souches d'*A. rhizogenes*, alors que le site H2 (*Hae*III) n'a été obtenu qu'après digestion des produits de PCR des souches appartenant aux espèces *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes* ainsi que la souche d'*A. rubi*. De plus, le site H3 (*Hae*III) est caractéristique des souches d'*A. tumefaciens* et de la souche d'*A. rubi*. Les souches appartenant à ce dernier groupe peuvent être distinguées par un autre site *Hae*III (H1): C58, 2410, 2517, 354, 2516, 2177, Ach5, B6, Bo542 d'une part, et 1904, 2518, 2458, 2407, 2411, 2414, 296, 999TR2 d'autre part.

La nomenclature du genre *Agrobacterium* est restée longtemps basée sur des caractéristiques de pathogénie (*A. radiobacter* non tumorigène, *A. tumefaciens* et *A. rubi* tumorigènes, *A. rhizogenes* induisant le chevelu racinaire) (Kerstens et DeLey 1973). Cependant, les trois biovars principaux sont distribués dans les groupes nommés ci-dessus, et sont maintenant



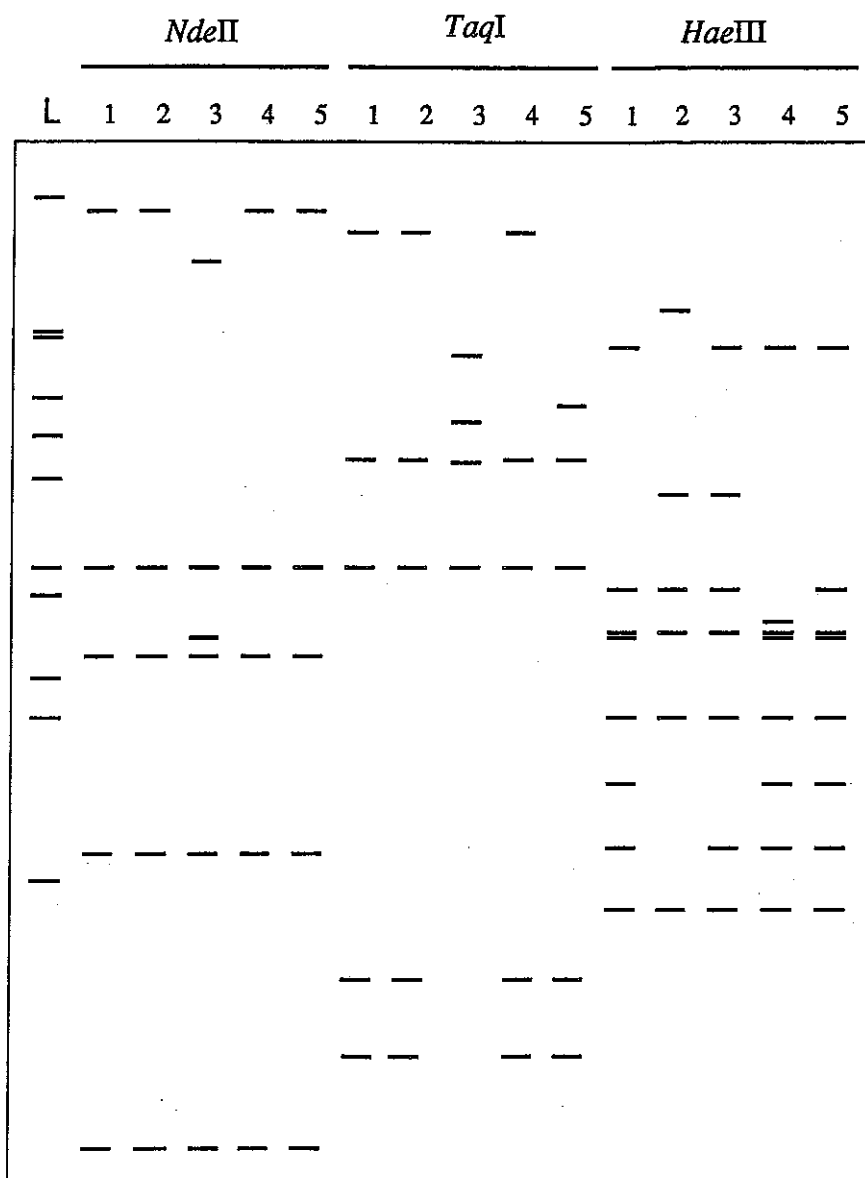


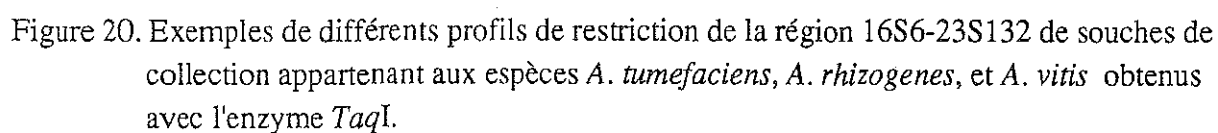
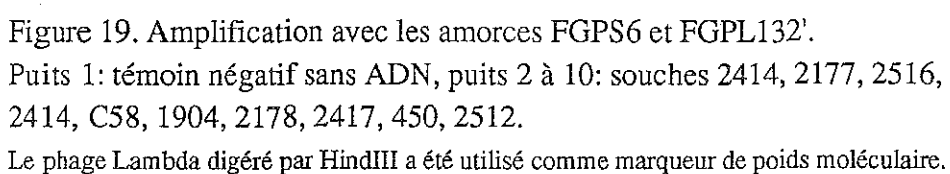
Figure 18. Profils de restriction du gène 16S obtenus avec les enzymes *NdeII*, *TaqI* et *HaeIII*.

L: marqueur de poids moléculaire (ladder 1kb), 1. *A. tumefaciens* (souche C58), 2. *A. tumefaciens* (souche 1904), 3. *A. rhizogenes*, 4. *A. vitis*, 5. *A. rubi*.  
(Les bandes de faible poids moléculaires inférieur à 70pb ont été déterminées d'après la séquence publiée par Willems et Collin 1993).

Enzyme	Site	<i>A. radiobacter</i> (C58)	<i>A. radiobacter</i> (1904)	<i>A. rhizogenes</i>	<i>A. vitis</i>	<i>A. rubi</i>
<i>NdeII</i>	248	+	+	+	+	+
	272	+	+	+	+	+
	355	+	+	+	+	+
	N1	-	-	+	-	-
	N2	-	-	+	-	-
	1300	+	+	+	+	+
	1474	+	+	+	+	+
<i>TaqI</i>	64	+	+	+	+	+
	T	-	-	+	-	-
	913	+	+	+	+	+
	1218	+	+	+	+	+
	1266	+	+	+	+	+
<i>HaeIII</i>	H1	-	+	-	-	-
	234	+	+	+	+	+
	300	+	+	+	+	+
	H2 (385)	+	+	+	-	+
	871	+	+	+	+	+
	H3 (982)	+	+	-	-	+
	1153	+	+	+	+	+
	1332	+	+	+	+	+

Tableau 10. Sites de restriction des enzymes *NdeII*, *TaqI*, et *HaeIII* du gène 16S d'*Agrobacterium*.

Les sites N1 and N2 coupent la région 16S355-16S1300 en trois fragments de 65, 175 et 725bp. Le site T coupe la région 16S64-16S913 en deux fragments de 355 et 455 bp. Le site H1 coupe la région 16S14-16S234 en deux fragments de 20 et 200bp. La présence ou l'absence d'un site est notée + or -.



Les fragments de restriction correspondant au gène 16S sont indiqués par (\*) pour chaque espèce.

Le marqueur de poids moléculaire "123pb" a été utilisé comme référence.

reconnus comme trois espèces génomiques sur la base des résultats d'hybridation ADN-ADN (De Ley *et al.* 1973, Ophel et Kerr 1990, Popoff *et al.* 1984). Récemment, le séquençage du gène 16S (Willems et Collin 1993, Sawada *et al.* 1993, Yanagi et Yamasato 1993) a permis de décomposer le genre *Agrobacterium* en quatre espèces, *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi* et *A. vitis*. La variabilité au niveau de la séquence du gène 16S est reconnue pour permettre la discrimination des espèces bactériennes (Weisburg *et al.* 1991), mais révèle peu de polymorphisme au sein d'une même espèce génomique (Gurtler *et al.* 1991, Nazaret *et al.* 1992). L'analyse par la méthode de PCR-RFLP du gène 16S a effectivement permis de différencier les souches selon leur espèce, sauf dans le cas d'*A. rubi* qui reste regroupé avec l'espèce *A. tumefaciens* par le biais dû au choix des enzymes utilisés. Les groupes ne sont pas séparés en fonction de leur pouvoir tumorigène. D'autre part, le dimorphisme mis en évidence au sein de l'espèce *A. tumefaciens*, pourrait indiquer l'existence d'au moins deux sous-espèces génomiques. Des sous-espèces génomiques ont en effet été décrites pour le biovar1 par Popoff *et al.* (1984).

L'analyse du polymorphisme du gène 16S des différentes souches d'*Agrobacterium* par la méthode de PCR-RFLP, révèle une variabilité permettant une discrimination des isolats au niveau spécifique. De plus, l'utilisation du seul enzyme *HaeIII* engendre des profils différents correspondant chacun à une espèce d'*Agrobacterium*, hormis *A. rubi*.

## 1.2 Polymorphisme de la région comprenant le gène 16S et l'IGS

### 1.2.1 Résultats d'amplification et vérification de la spécificité

Les réactions d'amplification avec les amorces FGPS6 et FGPL132' ont produit un fragment d'ADN unique pour chacune des 41 souches testées. La taille de ces fragments varie de 2500 à 2700pb selon les souches (figure 19). D'après ce résultat, la taille de l'intergène entre les gènes 16S et 23S des souches d'*Agrobacterium* a été estimée de 900 à 1100pb.

Après digestion des fragments 16S8-23S132 (par les trois enzymes utilisés pour l'analyse des fragments 16S8-16S1509), les bandes correspondant à la partie 16S ont pu être identifiées sur chaque profil, confirmant l'origine ribosomique des fragments d'ADN analysés.

### 1.2.2 Discrimination des souches par le polymorphisme de l'IGS

Les profils obtenus à partir des digestions effectuées avec les enzymes *CfoI*, *HaeIII*, *NdeII* et *TaqI* comportent 7 à 13 bandes selon les enzymes et les souches. Un exemple de profils obtenus après digestion des fragments 16S8-23S132 avec l'enzyme *TaqI* est montré dans la figure 20. L'analyse de restriction de cette région avec les 4 enzymes a permis d'obtenir 31 profils différents sur les 41 souches testées (dont 4 comportent le fond chromosomique C58). Le degré de discrimination est variable selon les enzymes pour les isolats d'*A. rhizogenes* (4 profils avec *CfoI*, 6 profils avec *NdeII*, 7 profils avec *TaqI* et 9 profils avec *HaeIII*), stable pour les isolats d'*A.*

Souches	<i>A. rubi</i>				<i>A. tumefaciens</i>														<i>A. rhizogenes</i>										<i>A. vitis</i>			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
1. 999		0,050	0,041	0,048	0,054	0,055	0,056	0,038	0,040	0,041	0,042	0,047	0,062	0,056	0,058	0,041	0,045	0,036	0,071	0,071	0,074	0,077	0,067	0,067	0,071	0,067	0,087	0,066	0,062	0,069	0,084	
2. C58			0,040	0,053	0,045	0,046	0,043	0,041	0,039	0,040	0,037	0,035	0,058	0,047	0,050	0,044	0,049	0,035	0,080	0,080	0,070	0,080	0,082	0,082	0,080	0,075	0,064	0,067	0,069	0,054	0,062	
3. 2518				0,039	0,048	0,049	0,042	0,037	0,028	0,029	0,041	0,046	0,047	0,055	0,045	0,029	0,052	0,031	0,082	0,082	0,084	0,088	0,097	0,090	0,088	0,090	0,079	0,086	0,083	0,068	0,076	
4. 2458					0,024	0,025	0,030	0,040	0,041	0,043	0,040	0,049	0,018	0,023	0,048	0,043	0,035	0,045	0,076	0,076	0,073	0,076	0,078	0,078	0,076	0,072	0,061	0,070	0,072	0,057	0,065	
5. 2407						0,001	0,010	0,037	0,043	0,044	0,037	0,039	0,017	0,005	0,041	0,044	0,032	0,039	0,084	0,091	0,074	0,084	0,085	0,085	0,084	0,079	0,082	0,077	0,067	0,053	0,072	
6. 2411							0,008	0,039	0,044	0,045	0,039	0,040	0,018	0,006	0,042	0,045	0,034	0,040	0,085	0,093	0,075	0,085	0,087	0,087	0,085	0,080	0,083	0,078	0,069	0,054	0,074	
7. 2414								0,040	0,030	0,031	0,026	0,034	0,028	0,015	0,033	0,031	0,043	0,027	0,094	0,094	0,090	0,094	0,095	0,095	0,094	0,088	0,084	0,079	0,082	0,061	0,082	
8. 2410									0,026	0,024	0,022	0,029	0,041	0,036	0,042	0,024	0,049	0,023	0,071	0,071	0,058	0,066	0,067	0,062	0,061	0,062	0,074	0,071	0,067	0,063	0,072	
9. 2516										0,001	0,012	0,021	0,042	0,041	0,020	0,003	0,051	0,005	0,080	0,080	0,083	0,087	0,088	0,082	0,080	0,082	0,065	0,079	0,075	0,066	0,069	
10. CG1028											0,013	0,022	0,044	0,042	0,018	0,005	0,052	0,006	0,082	0,082	0,084	0,088	0,090	0,083	0,082	0,083	0,066	0,080	0,077	0,062	0,065	
11. 2177												0,021	0,045	0,036	0,028	0,016	0,054	0,007	0,077	0,077	0,079	0,083	0,084	0,078	0,077	0,078	0,068	0,071	0,072	0,069	0,078	
12. 2517													0,046	0,037	0,021	0,025	0,055	0,018	0,078	0,072	0,055	0,067	0,068	0,068	0,067	0,063	0,063	0,067	0,074	0,055	0,062	
13. 1904														0,013	0,041	0,044	0,036	0,046	0,075	0,082	0,072	0,082	0,083	0,083	0,082	0,077	0,079	0,075	0,061	0,062	0,065	
14. 296															0,044	0,046	0,031	0,037	0,080	0,087	0,071	0,080	0,082	0,082	0,080	0,075	0,077	0,074	0,060	0,061	0,075	
15. 354																0,021	0,054	0,023	0,066	0,066	0,063	0,066	0,067	0,067	0,066	0,062	0,068	0,071	0,072	0,053	0,051	
16. Ach5																	0,052	0,008	0,075	0,075	0,078	0,082	0,083	0,077	0,075	0,077	0,072	0,080	0,077	0,068	0,070	
17. B6																		0,047	0,078	0,084	0,074	0,084	0,085	0,085	0,084	0,079	0,075	0,061	0,057	0,070	0,056	
18. Bo542																			0,080	0,080	0,083	0,087	0,088	0,082	0,080	0,082	0,071	0,074	0,070	0,066	0,075	
19. 450																				0,002	0,012	0,018	0,022	0,025	0,024	0,016	0,040	0,050	0,070	0,079	0,069	
20. 1961																					0,012	0,018	0,022	0,025	0,024	0,016	0,036	0,050	0,075	0,079	0,075	
21. 1804																						0,009	0,013	0,016	0,015	0,008	0,043	0,048	0,067	0,069	0,072	
22. 2519																							0,006	0,008	0,007	0,006	0,045	0,042	0,070	0,066	0,075	
23. 1905																								0,007	0,011	0,007	0,046	0,039	0,066	0,062	0,076	
24. 2178																									0,003	0,012	0,042	0,043	0,061	0,068	0,076	
25. 2417																										0,008	0,040	0,042	0,065	0,066	0,075	
26. CG1030																											0,046	0,039	0,071	0,062	0,076	
27. 1936																												0,041	0,079	0,069	0,059	
28. 2520																													0,069	0,066	0,074	
29. 2512																														0,043	0,041	
30. 2618																															0,028	
31. 2620																																

Tableau 11. Estimation des distances génétiques entre les séquences 16S-23S132 d'après la comparaison des profils de restriction obtenus avec les enzymes *HaeIII*, *TaqI*, *CfoI* et *NdeII* (selon l'équation de Nei (1987)).

*tumefaciens* (de 10 à 12 profils différents selon l'enzyme) et les isolats d'*A. vitis* (3 profils différents).

Les coefficients de similitude entre les séquences 16S-23S ont été calculés en répertoriant le nombre de fragments de restriction d'ADN communs entre les différents profils pris deux à deux, avec un total de 149 fragments pour l'ensemble des 41 souches en considérant les quatre enzymes testés. La matrice représentant les distances génétiques estimées entre ces séquences est présentée dans le tableau 11. L'analyse de ces données par la méthode UPGMA, a permis d'élaborer un dendrogramme révélant la présence de 4 groupes principaux correspondant aux 4 espèces d'*Agrobacterium* (figure 21). Les 17 souches d'*A. tumefaciens* ont été différenciées, les 15 souches d'*A. rhizogenes* ont été séparées en 10 types distincts et les 5 souches d'*A. vitis* en 3 types. Au niveau infraspécifique, un ensemble homogène regroupe toutes les souches (sauf 2518) qui ont été discriminées par le site *Hae*III (H1) dans le gène 16S.

La reproductibilité de la méthode est montrée par le fait que les souches 1901, 1902, 1896 (qui possèdent le même fond chromosomique que la souche C58, mais avec des plasmides Ti différents) et C58 présentent les mêmes profils quel que soit l'enzyme. De plus, le profil obtenu pour une même souche, à partir de réactions d'amplification et de digestion indépendantes, sont identiques (non montré).

Pour ce qui concerne l'étude de populations naturelles de même origine géographique, il est nécessaire de pouvoir identifier des isolats proches phylogénétiquement appartenant à une même espèce. Or, le polymorphisme du gène 16S s'est avéré insuffisant pour discriminer et identifier des souches à l'intérieur d'une même espèce. L'espace intergénique entre les gènes 16S et 23S n'est pas soumis aux mêmes contraintes et montre un degré de variabilité supérieure qui a permis une discrimination de souches proches pour divers genres bactériens (Navarro *et al.* 1992, Nour *et al.* in press). La taille de l'intergène entre les gènes 16S et 23S est variable selon les embranchements bactériens (Normand *et al.* 1994). Jensen *et al.* (1993) suggèrent que les critères de taille et de nombre d'IGS peuvent être utilisés pour caractériser les bactéries. Une taille importante constitue un avantage dans l'étude du polymorphisme pour l'identification des souches par PCR-RFLP. En effet, la variabilité détectée est supposée augmenter avec la taille de la séquence ciblée. Les travaux sur *Xanthomonas populi* (Nesme, non publié) ont montré que le polymorphisme de l'IGS de 370pb est insuffisant pour pouvoir être utilisé pour la caractérisation par PCR-RFLP. L'IGS des souches d'*Agrobacterium* est de taille relativement importante (de 900 à 1100pb) par rapport à celui d'autres genres comme *E.coli*, *Frankia* sp. ou *Nitrobacter* sp. (qui sont respectivement de 440, 411 et 800pb (Brosius *et al.* 1981, Normand *et al.* 1992, Navarro *et al.* 1992), et est comparable à celui de souches du genre *Rhizobium*.

Les branches les plus importantes du dendrogramme obtenues par l'analyse en PCR-RFLP de la région ribosomique comprenant le gène 16S et l'IGS des souches d'*Agrobacterium* correspondent à la classification selon quatre espèces: *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi* et *A. vitis* (De Ley *et al.* 1973, Ophel et Kerr 1990, Sawada *et al.* 1993, Willems et Collins 1993). Le pouvoir discriminant de la méthode de PCR-RFLP appliquée à la

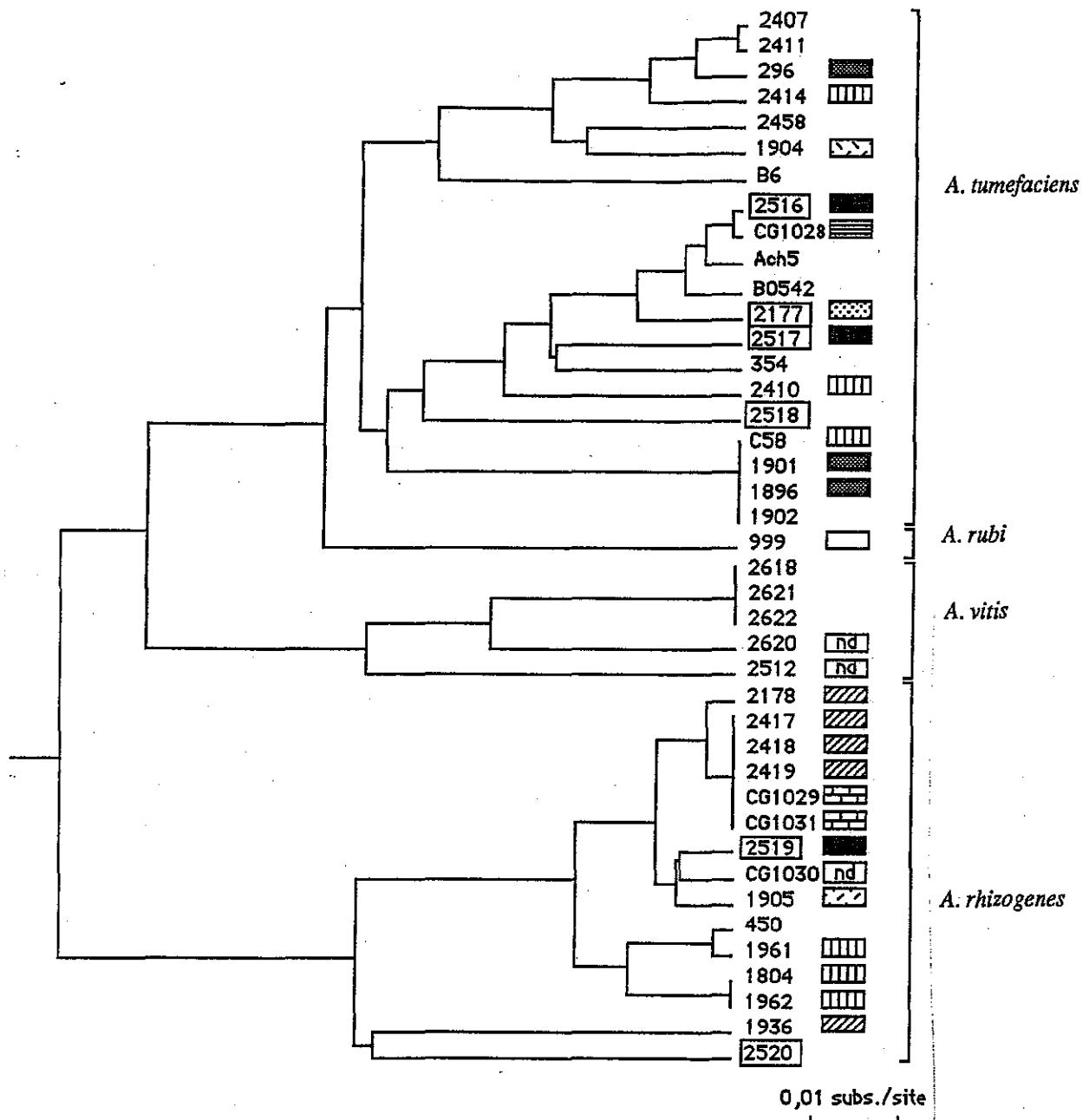
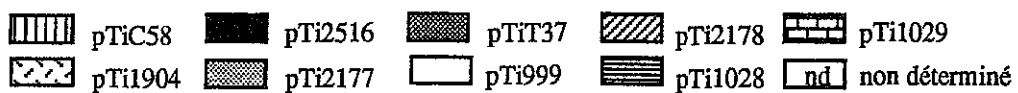


Figure 21. Dendrogramme représentant les relations entre les séquences de la région 16S6-23S132 basé sur l'analyse UPGMA.

Le type plasmidique est indiqué près de chaque souche.



région 16S et IGS s'est avéré important en permettant de différencier 31 ribotypes d'*Agrobacterium* sur les 41 souches testées. Le groupe constitué des isolats d'*A. tumefaciens* apparaît hétérogène, reflétant la grande diversité de ce taxon soulignée par différents auteurs (Kerstens et De Ley 1973, Keane *et al.* 1970). Les trois autres espèces semblent également composées de sous-groupes. Cependant le nombre de souches testées est trop faible pour permettre de conclure sur ce point.

Les relations phylétiques entre les souches, déterminées par l'analyse du gène 16S et de la région 16S plus IGS, sont concordantes bien que la variabilité des séquences intergéniques soit supérieure à celle des séquences du gène 16S. Le polymorphisme détecté au niveau de la région intergénique permet un degré de discrimination très élevé, permettant la distinction de presque toutes les souches. Les enzymes les plus discriminantes sont *TaqI* ou *NdeII* pour les souches appartenant à l'espèce *A. tumefaciens*, et *HaeIII* pour celles de l'espèce *A. rhizogenes*.

D'autre part, les souches 2516, 2517, 2518, 2177, 2519 et 2520 isolées de tumeurs de la même pépinière et qui ont été caractérisées selon différentes méthodes par Nesme *et al.* (1987, 1992) correspondent à six ribotypes différents par la méthode de PCR-RFLP. Les souches tumorigènes 2516, 2177 et 2517 sont regroupées, alors que les souches 2518 et 2520 non tumorigènes sont relativement éloignées des souches tumorigènes d'*A. tumefaciens* et *A. rhizogenes* respectivement. Ces données permettent de vérifier que l'approche d'identification des fonds chromosomiques par l'analyse en PCR-RFLP de l'opéron ribosomique est suffisamment discriminante pour être appliquée à l'étude de la variabilité chromosomique de populations d'*Agrobacterium* provenant d'un même biotope.



Souches	Type opinique	région <i>vir</i> <sup>a</sup>	T-DNA <sup>b</sup>	Souches	Type opinique	région <i>vir</i> <sup>a</sup>	T-DNA <sup>b</sup>
1903 (C58)	nopaline	1600	3600	1804	nopaline	1600	3600
1902		nt	-	1905	nopaline	1600	3600
1896	nopaline	nt	3600	1936	nopaline	1600	3000
1901	nopaline	nt	3600	1961	nopaline	1600	3600
296	nopaline	1600	3600	1962	nopaline	1600	3600
354	nopaline	nt	-	2178	nopaline	1600	3000
1904	nopaline	1600	3600	2417	nopaline	1600	3000
2410	nopaline	1600	3600	2418	nopaline	1600	3000
2411	nopaline	*	-	2419	nopaline	1600	3000
2177	nopaline	1600	3600	2519	nopaline	1600	3600
2516	nopaline	1600	3600	2520		nt	-
2517	nopaline	1600	3600	450	nd	**	-
2518		1600	-	CG1029	nd	1600	3000
2414	nd	1600	3600	CG1030	nd	-	(3600)
2458	nd	1600	-	CG1031	nd	1600	3000
CG1028	nd	1600	3000				
2407	o/c	1600	-	2620	nopaline	*	(3600)
Ach5	octopine	4000	-	2618	o/c	(1600)	-
B6	o/a	4000	-	2622	o/c	*	-
Bo542	a/m	2100	-	2512	nd	*	(3000)
				2621	nd	*	-
999	nopaline	1600	3600				

Tableau 12. Résultats d'amplification obtenus avec les amorces FGP*vir*A2275 et FGP*vir*B<sub>2</sub>164' (a), et FGP*tmr*530 et FGP*nos*975 (b).

(\*): plusieurs bandes dont une 1600pb; (\*\*): plusieurs bandes de faibles poids moléculaires;

o/c: octopine/cucumopine, a/m: agropine/mannopine, o/a: octopine/agropine, nd: non déterminé, nt: non testé.

Les réactions d'amplification faibles sont indiquées entre parenthèse, les amplifications négatives sont indiquées par (-).

## 2. Analyse des plasmides Ti

### 2.1 Polymorphisme de la région de virulence

#### 2.1 1 Résultats d'amplification et vérification de la spécificité

Les réactions d'amplification avec les amorces FGP*vir*A2275 et FGP*vir*B<sub>2</sub>164' ont données un seul produit d'environ 1600pb pour la plupart des souches testées, incluant des souches à nopaline et à octopine/cucumopine (tableau 12). Ceci est en accord avec la taille de cette région donnée par la séquence du régulon *vir*, publiée par Rogowsky *et al.* (1990). L'amplification à partir de l'ADN des souches Ach5 et B6 de type octopine, et de la souche Bo542 de type agropine/mannopine a résultée en un fragment d'ADN de taille plus importante (environ 4000pb et 2100pb respectivement). La différence de taille est probablement due à une variation de la longueur de l'espace intergénique entre les gènes *virA* et *virB2*. Ces trois souches n'ont pas été incluses dans l'analyse du polymorphisme de cette région du plasmide Ti.

Les fragments d'ADN amplifiés à partir de l'ADN de la souche C58 et digérés par les enzymes *Cfo*I, *Dde*I, *Hae*III et *Msp*I ont donnés les profils attendus, d'après la séquence de la région de virulence (Rogowsky *et al.* 1990). Ceci permet de confirmer la spécificité des fragments obtenus par amplification avec les amorces FGP*vir*A2275 et FGP*vir*B<sub>2</sub>164'.

#### 2.1 2 Discrimination de groupes de plasmides Ti

Sur les quatre enzymes (*Cfo*I, *Dde*I, *Hae*III, et *Msp*I) testés, deux sites de restriction polymorphes ont été détectés parmi les profils de la région *virA-virB2* des 23 plasmides Ti analysés: un site *Cfo*I à 381pb et un site *Dde*I à 189pb en aval du gène *virA*, dans l'intergène entre les gènes *virA* et *virB*. Une représentation schématique de ces résultats sous forme de carte de restriction est présentée dans la figure 22. Les plasmides Ti ont été arrangés selon la similarité de leurs sites de restriction présents dans la région *virA-virB*, en trois groupes:

VIR1: C58, 2410, 2414, 2458, 1804, 1961, 1962, 2516, 2517, 2177, 2519, 296 et 999

VIR2: 1904 et 1905

VIR3: 1936, 2178, 2417, 2418, 2419, CG1028, CG1029 et CG1031

La synthèse de l'analyse de restriction de la région *virA-virB2* est indiquée dans le tableau 13. La taille des fragments de restriction est indiquée dans l'annexe IV.

### 2.2 Polymorphisme au niveau du T-DNA

#### 2.2 1 Résultats d'amplification et vérification de la spécificité

Chacun des ADN des 24 souches à nopaline de la collection a permis l'obtention d'un seul produit d'amplification avec les amorces FGP*tmr*530 et FGP*nos*975. Parmi ceux-ci, 18

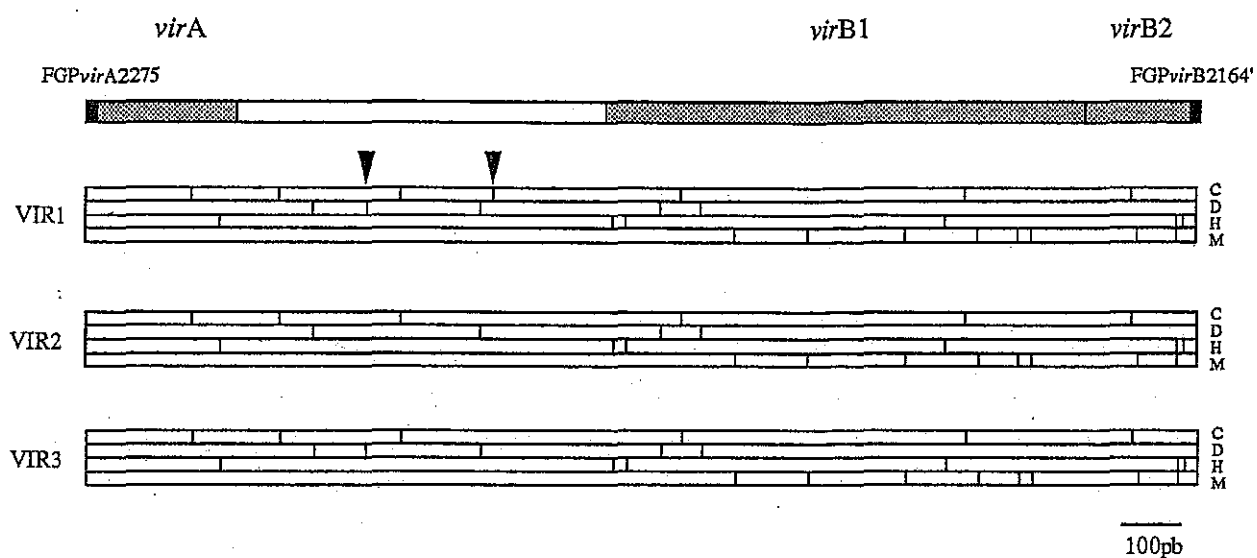


Figure 22. Carte de restriction de la région de virulence *virA2275-virB2164* illustrant les trois groupes VIR1, VIR2 et VIR3.

Les deux sites polymorphes sont indiqués par une flèche.

C: *Cfo*I, D: *Dde*I, H: *Hae*III, M: *Msp*I. Les tailles des fragments sont indiqués dans l'annexe IV.

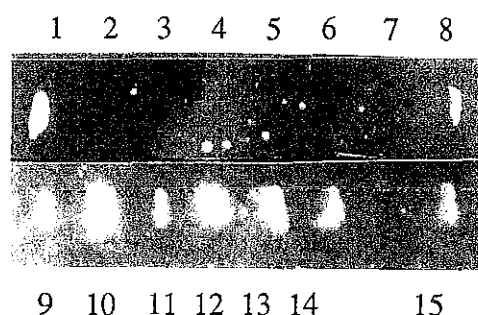


Figure 23. Hybridation des produits d'amplification avec le fragment d'ADN de 3600pb de la souche C58 comme sonde.

Puits 2 à 7: produits d'amplification de 3000pb des souches 2417, 24818, 2419, 1936, CG1029, CG1031. Puits 1, et 8 à 15: produits d'amplification de 3600pb des souches C58, 1962, C58, 2177, 2519, 2516, 1961, 2410.

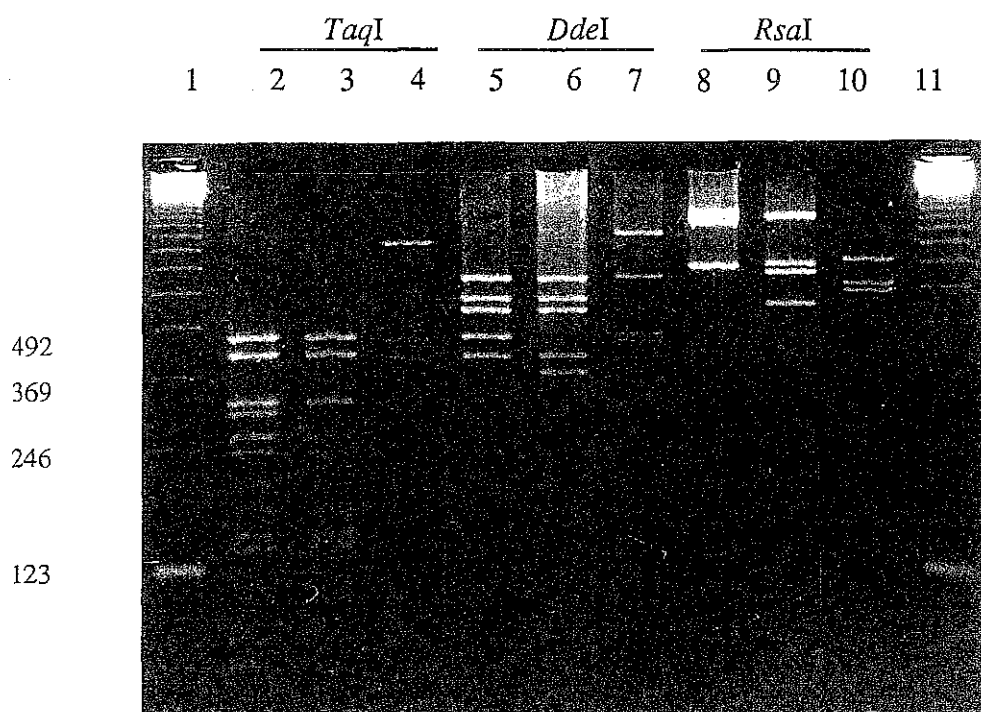


Figure 24. Profils de restriction de la région *tmr530-nos975* obtenus avec les enzymes *TaqI*, *DdeI* et *RsaI*.

Les puits 2, 3, 5, 6, 8 et 9 correspondent aux pTi du cluster 3600, les puits 4, 7 et 10 correspondent aux pTi du cluster 3000. Puits 1 et 11: ladder 123pb, puits 2: C58 (profil T1), puits 3: 2516 (profil T2), puits 4: 2178 (profil T3), puits 5: C58 (profil D1), puits 6: 2177 (profil D2), puits 7: 2178 (profil D3), puits 8: C58 (profil R1), puits 9: T37 (profil R2), puits 10: 2178 (profil R3).

fragments ont une taille attendue de 3600pb et 9 ont une taille moindre, de 3000pb (tableau 12). Chaque ADN ayant donné un produit d'amplification avec les amorces FGP*tmr*530 et FGP*nos*975 provenait d'une souche contenant un pTi à nopaline ou de type non déterminé.

Par contre, les souches qui n'ont pas abouti à un produit d'amplification avec ces amorces étaient: (i) des souches non tumorigènes ne comportant certainement pas de pTi, (ii) des souches tumorigènes de type opinique différent (telles que Ach5, B6, Bo542, 2407, 2618, 2621, 2622), (iii) la souche à nopaline 2411 qui a cependant permis une amplification avec les deux paires d'amorces internes aux gènes *tmr* et *nos*, (iiii) les souches 450 et 2458 de type opinique indéterminé (qui ont elles aussi permis une amplification avec les deux paires d'amorces internes).

Sous condition de moyenne stringence, les fragments de 3600pb des différents plasmides Ti se sont hybridés avec le pTiC58 entier et avec le fragment *tmr*530-*nos*975 de la souche C58 utilisés comme sonde. Ce résultat confirme la forte homologie des fragments de 3600pb avec la séquence *tmr*530-*nos*975 de la souche C58. Par contre les mêmes réactions d'hybridations effectuées sur les fragments de 3000pb se sont avérées négatives (figure 23).

En utilisant le produit d'amplification de 3000pb de la souche 2178 comme matrice d'amplification interne, une bande de taille attendue (172pb) a été obtenue avec les amorces FGP*tmr*530 et FGP*tmr*701'. Les fragments de 3000pb contiennent donc effectivement au moins la partie terminale du gène *tmr*. Par contre, aucune amplification n'a été obtenue en utilisant les amorces internes FGP*nos*975 et FGP*nos*1236'.

### 2.2.3 Discrimination de types parmi les plasmides Ti à nopaline

Dans un premier temps, les plasmides Ti ont été distingués en cluster 3600 (regroupant les plasmides Ti comportant une région *tmr*530-*nos*975 de 3600pb) et cluster 3000 (regroupant les plasmides Ti comportant une région *tmr*530-*nos*975 de 3000pb) sur la base de la taille des fragments d'ADN amplifiés. Sur les sept enzymes utilisés, trois (*Cfo*I, *Hae*III, *Nde*II) n'ont pas apporté de discrimination supplémentaire par rapport aux deux clusters d'amplification. Le cluster 3000 a pu être scindé en trois types de profils plasmidiques par l'enzyme *Rsa*I, les autres enzymes n'ayant pas révélé de polymorphisme. Le cluster 3600 est composé quant à lui de cinq groupes de restriction obtenus avec les enzymes *Msp*I, *Rsa*I, *Taq*I et *Dde*I.

Les résultats concernant l'analyse de restriction de la région *tmr*530-*nos*975 sont indiqués dans le tableau 13. Des exemples de profil de la région *tmr*530-*nos*975 obtenus avec les enzymes *Dde*I, *Taq*I et *Rsa*I sont indiqués dans la figure 24.

Seulement quatre sites de restriction polymorphes ont été détectés parmi les profils du cluster 3600 (ce qui correspond à un site polymorphe pour chacun des quatre enzymes) et trois sites *Rsa*I polymorphes pour le cluster 3000. Aucune différence n'a été notée au niveau des 7 sites *Cfo*I, 4 sites *Hae*III et 9 sites *Nde*II pour le cluster 3600; ni pour les 6 sites *Cfo*I, *Nde*II, *Dde*I, 5 sites *Hae*III et 8 sites *Taq*I pour le cluster 3000.

Souches	<i>tmr530-nos975</i>								<i>virA2275-virB<sub>2</sub>164'</i>			type de pTi <sup>c</sup>
	<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>NdeII</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i>	<i>DdeI</i>	type NT <sup>a</sup>	<i>CfoI</i>	<i>DdeI</i>	type VIR <sup>b</sup>	
Cluster 3600												
C58	C1	H1	N1	M1	R1	T1	D1	NT1	Cv1	Dv1	VIR1	pTiC58
1804	C1	H1	N1	M1	R1	T1	D1	NT1	Cv1	Dv1	VIR1	pTiC58
1961	C1	H1	N1	M1	R1	T1	D1	NT1	Cv1	Dv1	VIR1	pTiC58
1962	C1	H1	N1	M1	R1	T1	D1	NT1	Cv1	Dv1	VIR1	pTiC58
2410	C1	H1	N1	M1	R1	T1	D1	NT1	Cv1	Dv1	VIR1	pTiC58
2414	C1	H1	N1	M1	R1	T1	D1	NT1	Cv1	Dv1	VIR1	pTiC58
1904	C1	H1	N1	M1	R1	T1	D1	NT1	Cv2	Dv2	VIR2	pTi1904
1905	C1	H1	N1	M1	R1	T1	D1	NT1	Cv2	Dv2	VIR2	pTi1904
2516	C1	H1	N1	M1	R1	T2	D1	NT2	Cv1	Dv1	VIR1	pTi2516
2517	C1	H1	N1	M1	R1	T2	D1	NT2	Cv1	Dv1	VIR1	pTi2516
2519	C1	H1	N1	M1	R1	T2	D1	NT2	Cv1	Dv1	VIR1	pTi2516
2177	C1	H1	N1	M1	R1	T1	D2	NT3	Cv1	Dv1	VIR1	pTi2177
1901	C1	H1	N1	M1	R2	T1	D2	NT4	nt	nt	nt	pTiT37
1896	C1	H1	N1	M1	R2	T1	D2	NT4	nt	nt	nt	pTiT37
296	C1	H1	N1	M1	R2	T1	D2	NT4	nt	nt	nt	pTiT37
999	C1	H1	N1	M3	R1	T1	D2	NT5	Cv1	Dv1	VIR1	pTi999
Cluster 3000												
2178	C2	H2	N2	M2	R3	T3	D3	NT6	Cv2	Dv1	VIR3	pTi2178
1936	C2	H2	N2	M2	R3	T3	D3	NT6	Cv2	Dv1	VIR3	pTi2178
2417	C2	H2	N2	M2	R3	T3	D3	NT6	Cv2	Dv1	VIR3	pTi2178
2418	C2	H2	N2	M2	R3	T3	D3	NT6	Cv2	Dv1	VIR3	pTi2178
2419	C2	H2	N2	M2	R3	T3	D3	NT6	Cv2	Dv1	VIR3	pTi2178
CG1028	C2	H2	N2	M2	R4	T3	D3	NT7	Cv2	Dv1	VIR3	pTi1028
CG1029	C2	H2	N2	M2	R5	T3	D3	NT8	Cv2	Dv1	VIR3	pTi1029
CG1031	C2	H2	N2	M2	R5	T3	D3	NT8	Cv2	Dv1	VIR3	pTi1029

Tableau 13. Identification des plasmides Ti à nopaline d'après leurs profils de restriction des régions *tmr530-nos975* et *virA2275-virB<sub>2</sub>164'*.

Les profils ont été désignés par la première lettre de l'enzyme. Les types obtenus par l'analyse de restriction de la région *tmr530-nos975* sont indiqués par NT (a), les types obtenus par l'analyse de restriction de la région *virA2275-virB<sub>2</sub>164'* sont indiqués par VIR (b). Les différents types de pTi (c) ont été déterminés en tenant compte de ces deux informations.

De plus, aucune différence pour les 11 sites *AluI*, 2 sites *ApyI* et *Sau96I*, 6 sites *BstBUI*, 5 sites *DsaV* et l'unique site *AvaII* parmi les 8 souches montrant le même profil que C58 (NT1) n'a pu être mise en évidence (résultat non montré).

Cinq et trois groupes de restriction ont été obtenus dans chacun des deux clusters regroupant les plasmides Ti. Le cluster 3600 comporte les types plasmidiques NT1, NT2, NT3, NT4 et NT5; le cluster 3000 les types plasmidiques NT6, NT7 et NT8. A l'intérieur de chacun des deux clusters il existe une forte similitude entre les profils étant donné qu'un à deux sites de restriction diffèrent entre chaque profil. Par contre, aucune bande commune n'a été révélée entre les profils des deux clusters quel que soit l'enzyme utilisé. L'absence d'hybridation, les résultats d'amplifications internes et l'absence de similitude entre les profils des deux clusters indiquent l'existence d'une structure de la région *tmr530-nos975* différente entre les plasmides Ti appartenant aux clusters 3000 et 3600 respectivement.

### 2.3 Comparaison de l'analyse des deux régions plasmidiques

Les plasmides Ti classés dans les groupes VIR1 et VIR2 appartiennent au cluster 3600 déterminé par amplification de la région *tmr530-nos975*, alors que le groupe VIR3 correspond au cluster 3000. Les deux zones ciblées au niveau plasmidique n'ont pas le même degré de polymorphisme. La région *tmr530-nos975* du T-DNA s'est avérée plus variable que la région de virulence localisée hors du T-DNA: les plasmides se répartissent en 8 et 3 types respectivement. Certains plasmides Ti n'ont pas pu être différenciés par l'analyse de la région *tmr530-nos975* (NT1), mais ont pu l'être par celle de la région *vir* (VIR2) permettant de mettre en évidence le type 1904. De même, les groupes VIR1 et VIR3 ont été séparés en 4 et 3 types respectivement, dans la région *tmr530-nos975*.

L'analyse conjointe des deux régions permet de différencier 8 types de plasmide Ti pour les 21 souches testées (tableau 13) désignés par: pTiC58, pTi2516, pTi2177, pTi1904, pTi999 pour le cluster 3600, et pTi2178, pTi1028, pTi1029 pour le cluster 3000. (Le pTiT37 a été caractérisé uniquement d'après les profils de la région *tmr530-nos975*).

Les plasmides Ti des souches d'*Agrobacterium* sont classés selon leur propriétés opiniées (revue de Dessaux *et al.* 1992). L'analyse de la région de virulence, commune à tous les plasmides Ti, permet leur caractérisation de façon non spécifique. La région du T-DNA comprenant le gène *nos* (codant pour la synthèse de nopaline) permet quant à elle de cibler et d'analyser spécifiquement les plasmides Ti à nopaline.

Le faible degré de polymorphisme détecté dans la région de virulence *virA-virB<sub>2</sub>* ne nous a pas permis de différencier les plasmides Ti des souches type d'Orléans qui avaient pu l'être par la méthode de RFLP classique avec une sonde pTiC58 (Nesme *et al.* 1992). Nous avons donc ciblé une autre partie du pTi, de taille plus importante et située dans le T-DNA entre les gènes *tmr* et

*nos*. Cette zone comporte, outre les parties terminales des gènes *tmr* et *nos*, les gènes *6a* et *6b* séparés par trois espaces intergéniques (correspondant à environ 2000pb). Cette région s'est avérée plus discriminante et a effectivement permis de différencier les plasmides Ti pTi2516, pTi2177 et pTiC58 déterminés par RFLP classique. Il est certain que les plasmides Ti présentant le même profil de restriction peuvent être différents. Afin de palier cette faiblesse de la méthode, il est nécessaire d'analyser diverses séquences plasmidiques. Un exemple est donné par les plasmides Ti des souches C58 et 1904 qui possèdent des propriétés de virulence différentes (Nesme, communication personnelle). Ces deux plasmides présentent des profils de la région *tmr530-nos975* identiques alors que l'analyse de la région *vir* a permis de les distinguer. Le degré de discrimination de cette approche pourrait sans doute être encore amélioré en ciblant d'autres zones variables du plasmide Ti.

Les plasmides Ti analysés se répartissent en deux clusters, correspondant à deux structures de la région comprise entre les gènes *tmr* et *nos* et au regroupement selon le polymorphisme de la région de virulence. La différence de taille de la zone *tmr530-nos975* pour les plasmides Ti appartenant au cluster 3000 concorde avec les résultats rapportés par Brasileiro (Thèse), qui a montré que cette zone est fortement réarrangée pour la souche 82 139 (2178). Le gène *6a* (ou *ons*) est délété dans la souche 82 139 et le gène *6b* (présentant seulement 62% d'homologie avec le gène *6b* de la souche C58) est suivi d'une séquence homologue à 71% au gène 3' du TR-DNA du pTi15955 (Barker *et al.* 1983). La proximité des profils de restriction de la région *tmr530-nos975* à l'intérieur du cluster 3000 comprenant 8 souches, laisse supposer que cette organisation structurale n'est pas spécifique à la souche 82 139 qui a été étudiée pour sa particularité d'induire des tumeurs bourgeonnantes sur peuplier (Brasileiro *et al.* 1991). Les souches 1936 et CG1028 contenant un plasmide Ti appartenant au cluster 3000 et associés à deux espèces différentes favorisent également ce phénotype tumoral sur peuplier alors que la souche CG1030 comportant un pTi appartenant au cluster 3600 donne le plus souvent des tumeurs non bourgeonnantes (G. Pilatte, communication personnelle).

Le polymorphisme de la région de virulence n'a pas permis de distinguer les plasmides pTi2516 et pTi2177 des souches types de la pépinière d'Orléans (2156, 2517, 2177, 2519). Par contre, au niveau de la région *tmr530-nos975* les enzymes *DdeI* et *TaqI* sont suffisantes pour permettre une discrimination de ces deux types de plasmides Ti. Pour ce qui concerne les plasmides Ti associés aux souches isolées de la pépinière d'Orléans, le pouvoir discriminant de cette approche est donc identique à celui obtenu par RFLP classiques avec une sonde pTiC58 (Nesme *et al.* 1992). On distingue les deux types de plasmides Ti, pTi2516 et pTi2177, eux-mêmes différents du pTiC58. L'identification des plasmides Ti par les profils de la région *tmr530-nos975* du T-DNA semble donc adéquate pour l'analyse des "populations" de plasmides Ti associés aux isolats d'*Agrobacterium* à nopaline issus des pépinières d'Orléans et de Peyrat.



### 3. Analyse simultanée des chromosomes et des plasmides Ti:

#### caractérisation des géotypes

La répartition des 9 types de plasmides Ti au sein des 41 souches de collection est schématisée sur la figure 21. L'analyse ne donne pas une corrélation parfaite entre les informations plasmidique et chromosomique. Un même type plasmidique peut être associé à divers ribotypes de l'une ou l'autre des deux espèces *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*. Inversement, différents types de plasmides Ti peuvent être associés à un ribotype particulier. Certains cas font apparaître une association préférentielle entre le pTi et le chromosome, tels que les plasmides pTi2178 et pTi1029 retrouvés uniquement dans les souches de biovar2, ou au contraire les plasmides pTi1028, pTiT37 et pTi2177 dans les souches de biovar1. Knauf *et al.* (1983) avaient émis l'hypothèse d'une possible association des plasmides Ti en relation avec le biovar. Cependant, il est évident qu'un même type en PCR-RFLP ne peut pas être assimilé à une identité totale car les régions ciblées correspondent à une infime partie du génome. Cette limite de la méthode est toutefois une constante de toutes les études de populations bactériennes naturelles.

Lorsqu'on considère les caractères chromosomiques et plasmidiques simultanément, les 24 souches à nopaline analysées sont réparties en 19 classes. Dans trois cas seulement, des souches d'*A. rhizogenes* n'ont pas pu être différenciées ni par leur profil de la région ribosomique, ni par leur type de pTi (2417, 2418, 2419; CG1029, CG1031; et 1804, 1962). De même, les souches d'*A. vitis*, 2618, 2621 et 2622, présentent le même ribotype. Il serait intéressant de préciser ces résultats par le séquençage de l'intergène de souches appartenant aux quatre espèces d'*Agrobacterium*. Cette approche permettrait de savoir si un degré de polymorphisme supérieur pourrait être révélé en utilisant d'autres enzymes de restriction adaptées aux séquences des souches d'*A. rhizogenes* et d'*A. vitis*. De même, l'analyse d'autres régions du plasmide Ti pourrait permettre de détecter un polymorphisme plus important et ainsi d'augmenter le pouvoir discriminant de cette approche.

## CONCLUSION

La méthode de PCR-RFLP a été appliquée dans un premier temps à l'identification de souches d'*Agrobacterium* de collection d'origines diverses. Cet outil moléculaire présente les qualités requises de rapidité, de précision et de reproductibilité. Pour ce qui concerne *Agrobacterium*, l'atout majeur de cette méthode est la possibilité d'identifier les génotypes en ciblant le chromosome et le plasmide Ti de façon indépendante.

Cette approche offre la possibilité d'identifier les fonds chromosomiques quelle que soit l'espèce d'*Agrobacterium* considérée sur la base du polymorphisme de la région ribosomique. La classification des souches ainsi obtenue concorde avec la taxonomie classique et celle basée sur les séquences du gène ribosomique 16S. De plus, le pouvoir discriminant de cette approche s'est avéré suffisamment élevé pour permettre l'identification de souches proches, isolées du même biotope, comme le montre l'analyse des souches 2516, 2517, 2177, 2518, 2519 et 2520 souches-type de la pépinière d'Orléans. L'utilisation des profils de restriction de la région 16S6-23S132 apparaît donc adéquate pour typer les isolats d'*Agrobacterium* des populations naturelles des sites d'Orléans et de Peyrat.

La caractérisation des plasmides Ti a été réalisée par l'analyse de deux régions. Le polymorphisme de la région de virulence s'est avéré relativement pauvre et n'a donc pas été retenu pour une application à l'étude de populations naturelles d'*Agrobacterium*. Cependant, la région de virulence étant commune à la plupart des plasmides Ti, représente un bon candidat pour une application à d'autres études de ce type. D'autre part, la spécificité engendrée par le type opinique a été utilisée en ciblant la région du T-DNA comprenant le gène de synthèse de la nopaline. Cette approche nous a permis de caractériser différents types de plasmides Ti à nopaline parmi les souches de collection, mais peut également être appliquée à l'étude de souches de types opiniques variés en choisissant des amorces adaptées. Le polymorphisme de la région *tmr530-nos975*, détecté par les deux enzymes *DdeI* et *TaqI*, est suffisant pour permettre la discrimination des plasmides pTi2516 et pTi2177 associés aux souches types de la pépinière d'Orléans. Cette approche sera donc utilisée pour l'identification des plasmides Ti associés aux isolats d'*Agrobacterium* des populations naturelles des pépinières étudiées.

L'analyse effectuée en parallèle sur les fonds chromosomiques et sur les plasmides Ti permet de caractériser les isolats d'*Agrobacterium* selon deux critères génomiques. L'intérêt de l'utilisation la méthode de PCR-RFLP indépendamment sur ces deux compartiments génomiques sera notamment appréciable pour l'étude des populations en considérant que des transferts de plasmide Ti peuvent se produire en conditions naturelles. La prise en compte des souches types isolées de la pépinière d'Orléans et ayant été caractérisées par ailleurs selon diverses méthodes, nous a permis de valider cette méthode d'identification pour l'étude des populations d'*Agrobacterium* issus des pépinières d'Orléans et de Peyrat.

**PARTIE IV.**

**ETUDE DE LA STRUCTURE GENETIQUE DE POPULATIONS  
NATURELLES D'AGROBACTERIUM**

## INTRODUCTION

*Agrobacterium* est une bactérie du sol et de la rhizosphère. Ces deux caractères écologiques pourraient être dûs à une spécialisation des types chromosomiques conduisant à une sélection en faveur de certains génotypes adaptés au sol ou à la plante. En outre, le maintien des propriétés pathogènes de la population pourrait être assuré par le transfert des plasmides Ti et leur maintien dans les contextes chromosomiques les plus adaptés aux conditions du milieu. Le but de cette partie fut d'aborder cette question par l'étude des populations d'*Agrobacterium* impliquées dans une épidémie de crown gall.

A partir de l'observation de manifestations récurrentes du crown gall dans les pépinières forestières françaises, une étude épidémiologique a été entreprise visant à comprendre les relations entre les populations naturelles d'*Agrobacterium*. Dans un premier temps, la caractérisation sérologique des isolats issus de tumeurs sur peuplier a permis d'évaluer l'organisation des populations d'*Agrobacterium* impliquées dans le crown gall de la pépinière d'Orléans (Michel *et al.* 1990, Nesme *et al.* 1987). La méthode de RFLP s'est par la suite avérée un outil très puissant pour la caractérisation des génomes, présentant en outre l'avantage pour *Agrobacterium* d'être applicable aux chromosomes et aux plasmides Ti de façon indépendante. Une analyse des isolats d'*Agrobacterium*, au niveau génotypique par cette méthode, a montré que cette épidémie de crown gall semblait être causée par un nombre limité de souches, auxquelles sont associés deux types de plasmide Ti (Nesme *et al.* 1992).

L'étude épidémiologique envisagée dans cette partie s'effectuera à partir des populations d'*Agrobacterium* échantillonnées dans les pépinières d'Orléans et de Peyrat où les cas de crown gall ont été recensés sur peuplier. La méthode de PCR-RFLP mise au point dans la partie précédente a été appliquée à l'identification des isolats d'*Agrobacterium* composant les populations issues des tumeurs de peuplier de ces deux pépinières et du sol de la pépinière de Peyrat. Dans un premier temps, il s'agira d'évaluer la complexité des populations naturelles d'*Agrobacterium*, c'est-à-dire de déterminer le nombre de génotypes impliqués dans cette épidémie et leurs fréquences relatives. L'objectif sera ensuite d'estimer les variations quantitatives et qualitatives de la composition des populations analysées. Cet aspect sera traité en considérant d'une part un effet de la plante sur la structure des populations tumorigènes transmises d'une pépinière à l'autre. D'autre part, un effet du passage par le sol sur la structure et le maintien des populations tumorigènes contaminantes sera appréhendé. L'analyse des populations de plasmides Ti et de leurs contextes chromosomiques nous permettra d'aborder l'alternative de la prolifération "verticale" ou "horizontale" des plasmides Ti en conditions naturelles.

Echantillonnage	Année	Biovar 1			Biovar 2			Total		
		tumeur (a)	isolat	pTi	tumeur (b)	isolat	pTi	tumeur (c)	isolat	pTi
ORL 2A	1985	20	46	37	12	18	10	26	64	47
PEY 2A	1987	29	47	38	19	27	22	>35	74	60
PEY JT	1988	13	33	28	-	-	-	13	33	28
PEY VP	1989	22	54	44	14	33	26	24	87	70
PEY TP	1989	2	11	11	-	-	-	2	11	11
<b>Total (tumeurs)</b>		84	180	147	45	78	58	>98	258	205
PEY SOL	1991	-	34	0	-	10	0	-	44	
<b>Total</b>		84	214	147	45	88	58	>98	302	205

Tableau 14. Nombre de tumeurs, d'isolats et de plasmides Ti analysés dans chaque population.

(a): nombre de tumeurs à partir desquelles ont été isolés des *Agrobacterium* de biovar1

(b): nombre de tumeurs à partir desquelles ont été isolés des *Agrobacterium* de biovar2

(c): nombre total de tumeurs analysées dans chaque échantillon.

## 1. RAPPEL SUR LA NATURE DES POPULATIONS ANALYSÉES

Cette étude a été effectuée sur des populations d'*Agrobacterium* obtenues à partir (i) de tumeurs développées sur les peupliers de la section *Leuce* de la pépinière d'Orléans origine supposée de l'épidémie de crown gall déclarée à Peyrat, (ii) de tumeurs provenant de trois échantillons de la pépinière de Peyrat, (iii) du sol de la pépinière de Peyrat avant sa contamination.

La population issue de la pépinière d'Orléans a été obtenue à partir des tumeurs développées sur des peupliers âgés de deux ans. Les populations de tumeurs sur peupliers implantées à Peyrat depuis deux années, issus de boutures provenant d'Orléans, et de jeunes plants de peupliers de même origine mais plantés sous serre ont été analysées afin de tester l'influence de la transmission par la plante.

L'effet du passage par le sol a été étudié par la mise en place d'un dispositif piège quelques mois après l'arrachage des plants contaminés de la pépinière de Peyrat visant à analyser la population tumorigène du sol. Ce système était composé de plants issus de culture *in vitro* afin de s'affranchir de la contamination par les boutures (selon 4 blocs de 100, 105, 101 et 105 plants). La première année de son installation, les 201 plants installés dans les blocs 2 et 4 de la parcelle ont été arrachés, 10 étaient porteurs de tumeurs, soit une fréquence de 5%. La deuxième année, les 210 plants des blocs 1 et 3 ont été arrachés, 53 étaient porteurs de tumeurs soit une fréquence de développement du crown gall de 25%. La population d'*Agrobacterium* du sol de la pépinière de Peyrat piégée par ce système a été analysée. A partir du témoin du dispositif piège deux tumeurs se sont développées sur les 100 plants installés dans une parcelle non contaminée de cette pépinière.

L'ensemble des isolats d'*Agrobacterium* issus des tumeurs sur peuplier analysés appartiennent soit au biovar1 (*A. tumefaciens*), soit au biovar2 (*A. rhizogenes*). Dans cette partie, le terme biovar sera utilisé étant donné que les isolats ont été caractérisés par les tests biochimiques permettant leur affiliation à un biovar. Le nombre de tumeurs et d'isolats et de plasmides Ti analysés à partir de chaque échantillonnage est indiqué dans le tableau 14.

## 2. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS D'AGROBACTERIUM

### 2.1 Analyse sérologique

Dans un premier temps, nous avons utilisé la sérologie pour vérifier que les souches d'*Agrobacterium* introduites à Peyrat depuis Orléans par l'intermédiaire des boutures n'étaient pas présentes dans le sol de Peyrat. Pour cela les sérums 2516, 2517, 2177, 2518, 2519 et 2520 permettant de définir les sérogroupes 1a, 1b, 1c, 1d, 2ac et 2al caractéristiques des *Agrobacterium* isolés des tumeurs de peupliers de la pépinière d'Orléans, ont été utilisés pour un marquage en immunofluorescence de la microflore du sol de la pépinière de Peyrat avant sa contamination.

Chacun de ces six sérums testés a permis un dénombrement dans les deux échantillons de sol analysés. Le niveau de population des différents sérogroupes est comparable, de l'ordre de  $2.10^5$  b/g. D'autre part, les isolats d'*Agrobacterium* issus de ce même sol ont également été analysés en sérologie à l'aide de ces sérums. Une partie des ces isolats sont répartis dans les sérogroupes 1c, et 1b, mais la plupart non pas pu être identifiés par cette approche.

D'autre part, les isolats d'*Agrobacterium* de biovar1 issus des tumeurs des différents échantillons des deux pépinières (excepté la série des vitroplants de première année) ont été testés pour leur appartenance aux 4 sérogroupes de biovar1 définis par les sérums 2516, 2517, 2177 et 2518 permettant de définir les sérogroupes 1a, 1b, 1c et 1d présents à Orléans. La totalité des isolats provenant de la pépinière d'Orléans (population ORL 2A) sont répartis dans les sérogroupes 1a, 1b et 1c. Les isolats des tumeurs prélevées dans la pépinière de Peyrat, correspondent également en majorité à ces trois sérogroupes. Cependant, une part importante d'isolats issus de tumeurs ne croisant avec aucun des 4 sérums testés n'ont pas pu être caractérisés par cette méthode. Les résultats obtenus par caractérisation sérologique sont répertoriés dans les annexes I et II qui donnent la liste de l'ensemble des isolats analysés.

La sérologie n'est pas une méthode adéquate pour notre étude des populations d'*Agrobacterium*, étant donné que les isolats du sol de Peyrat croisent avec les sérums disponibles, qu'une part importante des isolats n'ont pas pu être typés par cette approche et par le manque d'information concernant le pTi. Nous avons donc utilisé la méthode de PCR-RFLP pour identifier l'ensemble des isolats composant les différentes populations. Ce typage a été réalisé au niveau chromosomique et plasmidique.

## 2.2 Analyse par PCR-RFLP

### 2.2.1 Résultats d'amplification par PCR

**Fonds chromosomiques:** La région ribosomique 16S8-23S132 de la plupart des isolats d'*Agrobacterium* testés a pu être amplifiée efficacement avec les amorces FGPS6 et FGPL132'. La taille des fragments d'ADN amplifiés (environ 2,7kb) est en accord avec les résultats obtenus dans la Partie III sur les souches de collection. Dans certains cas, et notamment pour la population isolée du sol, une taille inférieure a été observée pour cette région (non montré). Les bandes spécifiques du gène 16S permettant de caractériser les bactéries du genre *Agrobacterium* n'ont pas été retrouvées sur les profils de digestion de ces fragments atypiques (figure 27). Par conséquent, ces isolats ne sont probablement pas des *Agrobacterium* et n'ont pas été pris en compte dans l'analyse.

**Plasmides Ti:** Parmi les 258 isolats d'*Agrobacterium* issus de tumeurs, 205 (79%) ont permis l'obtention d'un signal d'amplification intense avec les amorces FGPTmr530 et FGPNos975 (82% et 74% pour les biovar 1 et 2 respectivement). La plupart des fragments d'ADN synthétisés par la réaction d'amplification avaient une taille attendue de 3,6kb, cependant pour 20 isolats issus de tumeurs de la pépinière de Peyrat (10% de la totalité des plasmides) la taille était de 6kb. Les

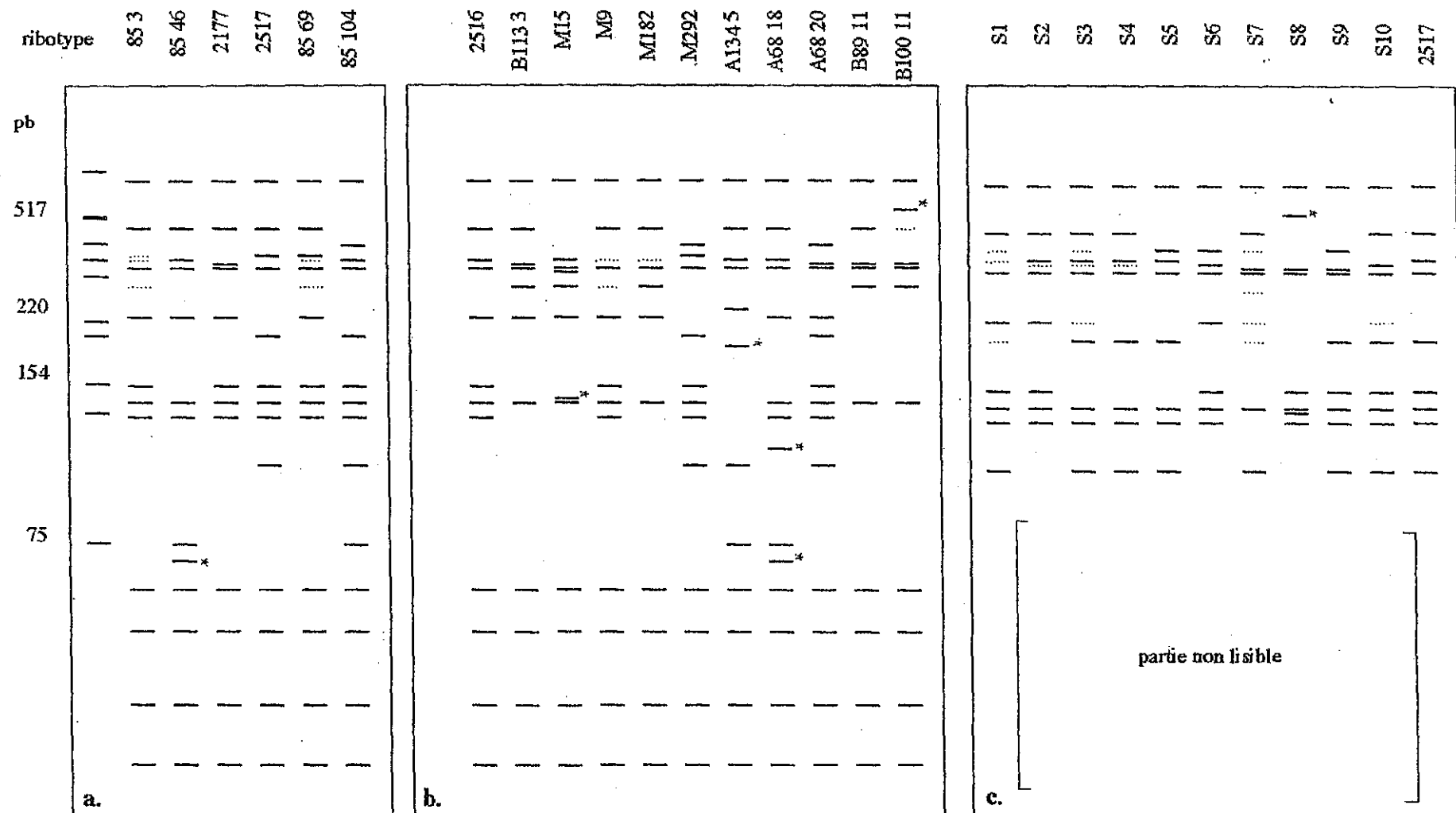


Figure 25. Représentation schématique des profils de restriction de la région 16S8-23S132 obtenus avec l'enzyme *TaqI* correspondant aux ribotypes de biovar1.

a. ribotypes détectés dans les deux pépinières

b. ribotypes spécifiques aux isolats de la pépinière de Peyrat

c. ribotypes composant la population isolée du sol

Les bandes surnuméraires de faible intensité sont indiquées en pointillés. L'astérisque indique les bandes spécifiques d'un profil. Le ladder 1Kb a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire.



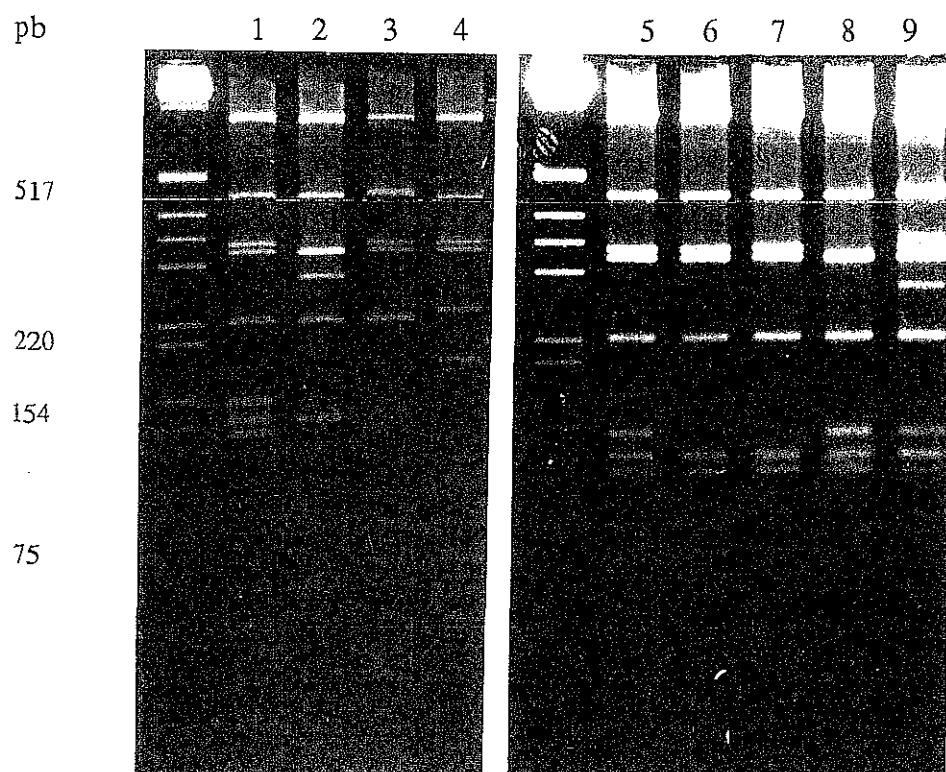


Figure 26. Exemples de profils de restriction de la région 16S6-23S132: ribotypes d'isolats de biovar1 isolés de tumeur (digestion par *TaqI*).

Puits 1 et 5: isolats de ribotype 2516; puits 2: ribotype B113 3; puits 3: ribotypes A68 18; puits 4: ribotype A134 3; puits 6 et 7: ribotype 85 46; puits 8: ribotype 2177; puits 9: ribotype 85 3.

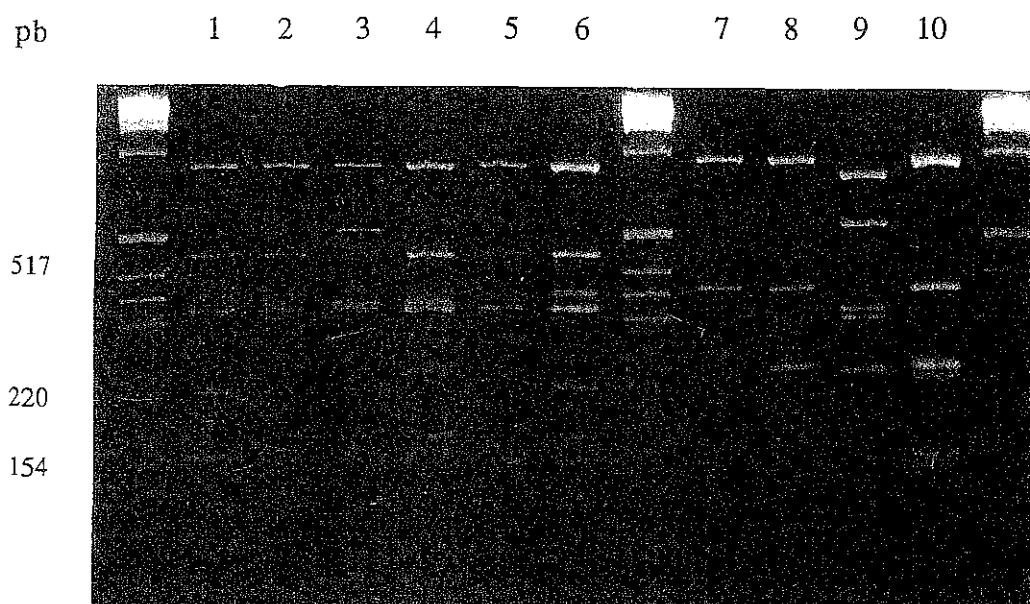


Figure 27. Exemples de profils de restriction de la région 16S6-23S132: ribotypes d'isolats de biovar1 isolés du sol de Peyrat (digestion par *TaqI*).

Puits 1, 2: ribotype S3; puits 3: ribotype S8, puits 4: référence (ribotype 2516); puits 5: ribotype S1; puits 6: ribotype 2517. Puits 7 à 10: isolats considérés différents de *Agrobacterium* étant donné que les bandes spécifiques du 16S sont absentes.

Le ladder 1kb a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

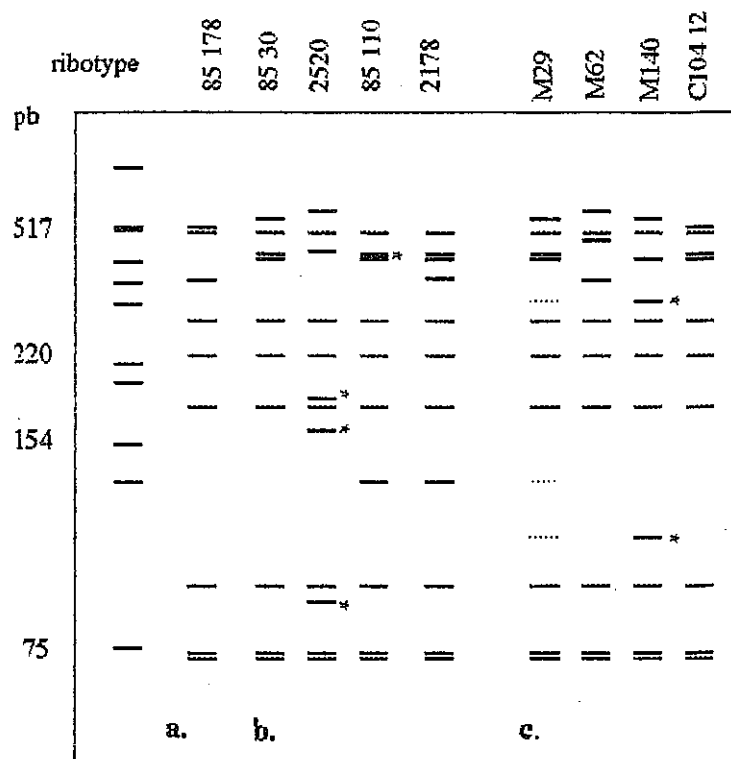


Figure 28. Représentation schématique des profils de restriction de la région 16S8-23S132 obtenus avec l'enzyme *Hae*III correspondant aux ribotypes de biovar2.

a. ribotype spécifique de la pépinière d'Orléans.

b. ribotypes détectés dans les deux pépinières

c. ribotypes spécifiques de la pépinière de Peyrat

Les bandes surnuméraires de faible intensité sont indiquées en pointillés. L'astérisque indique les bandes spécifiques d'un profil. Le ladder 1Kb a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

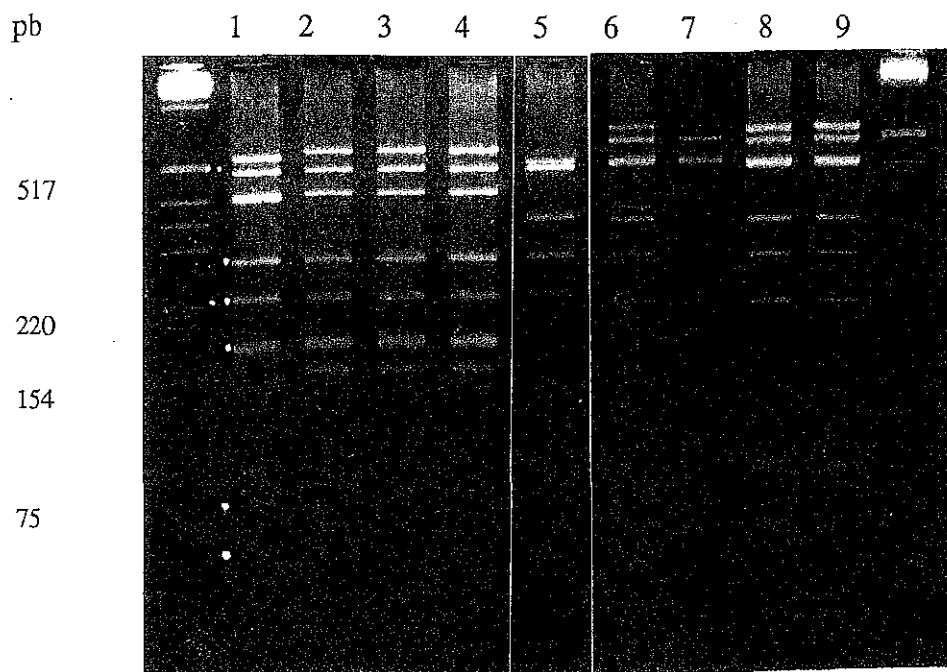


Figure 29. Exemples de profils de restriction de la région 16S6-23S132: ribotypes d'isolats de biovar2 isolés de tumeur (digestion par *Hae*III).

Puits 1, 8, 9: ribotype 85 30; puits 2, 3, 4: ribotype 2520; puits 5: ribotype 85 178; puits 6, 7: ribotype M29.

Le ladder 1kb a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

plasmides Ti non identifiés par cette méthode correspondent soit à des produits d'amplification obtenus en faible quantité et ne permettant pas l'analyse par digestion enzymatique, soit à l'absence d'amplification. Cette absence d'amplification peut être due à l'absence du gène *nos* (dans le cas où des plasmides Ti de type opinique autre que la nopaline seraient présents dans les tumeurs), à une organisation différente de la partie du T-DNA ciblée, ou à un défaut d'amplification dû à la qualité de l'ADN utilisé.

Parmi les 44 isolats, appartenant à l'un ou l'autre biovar provenant du sol de la parcelle non plantée de la pépinière de Peyrat, aucun n'a permis une amplification avec les amorces FGPTmr530 et FGPnos975, ni avec les amorces FGPTmr530 et FGPTmr701'. Le défaut d'amplification de cette zone du gène *tmr* signifie probablement une absence du pTi et confirme l'absence de développement de tumeurs observées pour les quelques souches testées quant à leur pouvoir pathogène sur *Datura* (non montré).

## 2.2.2 Profils de restriction ribosomiques et plasmidiques:

Pour l'ensemble des populations d'*Agrobacterium* issues de tumeurs, 17 profils de la région ribosomique 16S8-23S132 ont été obtenus avec l'enzyme *TaqI* pour les isolats de biovar1, et 9 profils avec l'enzyme *HaeIII* pour les isolats de biovar2. L'analyse de la région du T-DNA *tmr530-nos975* a révélé 5 types de plasmides Ti. Les plasmides Ti comportant une région *tmr530-nos975* de 3,6kb ont été séparés en 4 groupes d'après les profils obtenus avec les enzymes *DdeI* et *TaqI*: pTi2516, pTi2177, pTiM80 et pTi1903. Les plasmides Ti comportant une région *tmr530-nos975* de 6kb, ont été considérés comme un type particulier (pTi292), qui fera l'objet d'une analyse spécifique dans la partie V de cette étude.

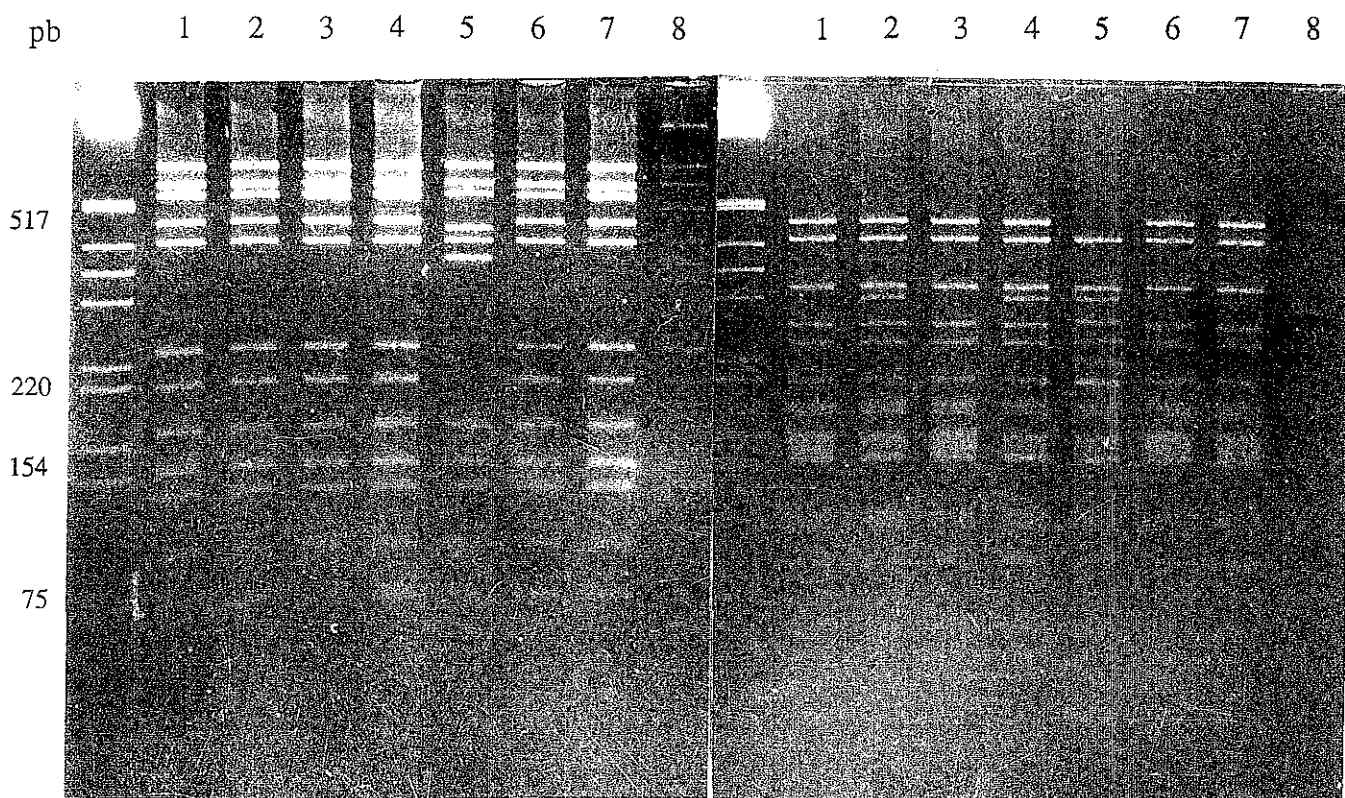
Pour ce qui concerne les populations provenant du sol, 11 profils de la région 16S6-23S132 ont été détectés parmi les isolats de biovar1, dont 10 sont spécifiques à cette population du sol. Les isolats de biovar2 correspondent tous au profil 2520 qui a été détecté dans les tumeurs.

### *Profils ribosomiques:*

Les 17 profils ribosomiques permettant l'identification des 17 types d'isolats de biovar1 issus de tumeurs, ainsi que les 11 profils correspondant aux isolats issus du sol sont schématisés sur la figure 25. Des exemples de ces profils sont montrés dans les figures 26 et 27 respectivement. Les 9 profils ribosomiques permettant l'identification des 9 types d'isolats de biovar2 sont schématisés sur la figure 28, des exemples de ces profils sont indiqués dans la figure 29.

Le nombre de fragments de restriction varie de 10 à 14 selon les profils. Les profils partagent un certain nombre de bandes en commun, dont certaines sont présentes dans la majorité des profils. De plus, il apparaît des bandes rares, spécifiques de certains profils. Sur chaque profil, les bandes correspondant à des fragments du gène 16S sont repérables d'après les résultats de restriction du gène 16S (cf. partie III). Le nombre et la taille des fragments de restriction de chaque profil, ainsi que la somme de leurs poids moléculaires sont indiqués dans l'annexe IV.





A.

B.

Figure 31. Exemples de profils de restriction de la région *tnr530-nos975*.

A. Digestion avec l'enzyme *DdeI*. Puits 1 à 4 et 6, 7: type D1, puits 5: type M80, puits 8: type 292.

B. Digestion avec l'enzyme *TaqI*. Puits 1, 3, 6, 7: type T1, puits 2, 4: type T2, puits 5: type M80, puits 8: type 292.

Le ladder 1kb a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

Un certain nombre de profils ribosomiques sont atypiques en ce sens qu'ils présentent des bandes surnuméraires de faible intensité (indiquées en pointillés sur les graphes), conduisant à une surestimation de la somme des tailles des fragments de ces profils. Il s'agit des profils 85 3, 85 69, M9, M182, B100 11, S1, S2, S3, S7 et S10 pour les isolats de biovar1 et du profil M29 pour les isolats de biovar2. Ce phénomène n'est pas dû à des digestions partielles, car ce résultat est reproductible sur différents échantillons d'amplification, sur différentes réactions de restriction, à partir de différents isolats. De plus, un test de digestion avec les enzymes *CfoI*, *NdeII*, *TaqI* et *HaeIII* a abouti à la même constatation (non montré). Afin de vérifier que ces produits de digestion atypiques n'étaient pas le fait d'une contamination au niveau des cultures bactériennes, une purification de l'isolat 85 3 a été entreprise. Une série de trois isolements sur milieu LPGa a été effectuée en prenant soin de laisser hydrater les cellules dans l'eau pendant une heure. Le test en PCR-RFLP a été réalisé sur 20 colonies prises au hasard à l'issue des trois passages. Les profils ribosomiques obtenus avec l'enzyme *TaqI* sont tous identiques au ribotype 85 3, avec les mêmes caractéristiques atypiques de bandes surnuméraires. L'interprétation la plus probable serait que ces bandes supplémentaires correspondent à des différences existant entre les différents opérons ribosomiques d'une même souche (au niveau intergénique), comme cela a été montré pour d'autres espèces bactériennes (Gurtler *et al.* 1991). Ces profils atypiques ont donc été considérés comme des ribotypes à part entière.

Le nombre de types identifiés par PCR-RFLP est supérieur au nombre de sérogroupes. En particulier, le séro groupe 1b regroupe 12 ribotypes. Dans ce cas, le pouvoir discriminant de la méthode de PCR-RFLP apparaît très supérieur. Par contre, le séro groupe 1a forme un ensemble plus homogène pour lequel la majorité des isolats sont de ribotype 2177, à l'exception de l'isolat 85 104. De plus, les isolats ne croisant avec aucun des sérums testés ont pu être identifiés par leurs profils de restriction.

#### *Profils plasmidiques:*

L'ensemble des profils obtenus par analyse de la région *tmr530-nos975* avec les enzymes *DdeI* et *TaqI* sont présentés sous forme schématique dans la figure 30. Des exemples de profils de la région *tmr530-nos975* sont montrés dans la figure 31. Les types 2516, 2177 et 1903 avaient déjà été décrits dans la partie III. Un type nouveau a été détecté, M80, qui se différencie des autres par la présence d'un fragment de 425pb pour le profil *DdeI*, et des fragments de 270, 248, 220 et 202pb pour le profil *TaqI*. Le nombre et la taille des fragments de restriction de chaque profil, ainsi que la somme de leurs poids moléculaires sont indiqués dans l'annexe IV.

#### **Conclusion**

La méthode de PCR-RFLP s'avère un outil puissant pour l'étude des populations naturelles d'*Agrobacterium*. En considérant simultanément les fonds chromosomiques et les plasmides Ti l'identification de nombreux isolats a été réalisée pour chaque population. Le pouvoir discriminant de cette méthode est supérieur à celui obtenu par sérologie, avec un total de 26 ribotypes et 5 types

Tumeurs	A 68	A 134	B 113
<b>(A) Biovar 1</b>			
85 3 - pTi2516 (a)	1	0	0
85 46 - pTi2516	1	0	1
85 46 - pTi1903	0	1	0
2516 - pTiM80	2	0	0
A68 18 - pTi2516	1	0	0
A68 20- pTiM80	2	0	0
A135 - pTi1903	0	9	0
B113 3	2	0	9
<i>Total</i>	9	10	10
<b>Indices de Shannon (b)</b>			
H'R	1,735	0,325	0,325
H'p	0,683	0	0
H'G	1,550	0,325	0
<b>(B) Biovar 2</b>			
85 30 - pTi1903(a)	6	0	8
M29 - pTi2516	0	9	0
<i>Total</i>	6	9	8

Tableau 15. Evaluation de la diversité intra et inter-tumorale pour les isolats de biovar1 (A) et biovar2 (B).

H'R, H'p, H'G: indices calculés à partir des ribotypes, des types plasmidiques et des génotypes. (a): effectifs des différents génotypes détectés dans les trois tumeurs, (b): estimation de la diversité de chaque tumeur.



plasmidiques pour les populations tumorales et 12 ribotypes pour la population du sol. Cette approche permet de mettre en évidence une diversité des génotypes composant les populations d'*Agrobacterium* étudiées.

### 2.3 Structure des populations: fréquence des génotypes et indices de diversité

Nous avons montré que les populations naturelles analysées sont diverses au niveau chromosomique et plasmidique. Dans un deuxième temps nous avons étudié comment sont organisées ces populations d'*Agrobacterium*. La complexité des populations a été abordée en se plaçant à différents niveaux: à l'échelle de la tumeur, à l'échelle du clone et en considérant la population globale de chaque échantillon.

L'estimation de la diversité de chaque population a été effectuée en tenant compte de façon indépendante: (i) les chromosomes des isolats dont le pTi avait été identifié, (ii) les plasmides Ti, (iii) les génotypes (déterminés par l'association des ribotypes et des types plasmidiques).

#### 2.3 1 Diversité génotypique à l'échelle de la tumeur et à l'échelle du clone

*Echelle de la tumeur:* Pour ce qui concerne l'étude de la diversité tumorale, l'analyse a été effectuée sur un échantillon de 3 tumeurs (désignées A68, A134 et B113) prélevées sur des vitroplants du clone 709-3 distincts. En considérant les deux biovars simultanément, les populations des trois tumeurs analysées sont de structures différentes. La richesse et la diversité des isolats de biovar1 est variable selon la tumeur (tableau 15). Le contenu plasmidique varie de un à trois types selon la tumeur. Les génotypes identifiés dans une tumeur ne sont pas forcément retrouvés dans les autres.

On observe une certaine complexité intratumorale non homogène entre les tumeurs. La diversité existant au sein d'une même tumeur se manifeste au niveau spécifique par la présence simultanée des deux biovars et au niveau infraspécifique par la présence de plusieurs génotypes de biovar1 et de plusieurs types de pTi.

*Echelle du clone:* L'analyse a porté sur des jeunes plants bouturés appartenant à trois clones différents (712.8, 717.1 et 712.2) plantés sous serre, à partir desquels ont été analysées respectivement 3, 5 et 5 tumeurs. A partir de chacune de celles-ci, 2 à 3 isolats de biovar1 ont été traités. Les résultats de caractérisation de cet ensemble d'isolats, ainsi que l'évaluation de la diversité génétique de la population piégée par un même clone sont indiqués dans le tableau 16. La structure et les indices de diversité  $H'$  des génotypes sont similaires pour les populations issus des trois clones toute tumeurs confondues. Ce sont principalement les mêmes génotypes qui sont retrouvés dans les trois clones, avec trois à quatre types de plasmide Ti détectés pour chaque clone.

Clones	712.8	717.1	712.2
Nb tumeurs	3	5	5
<b>(A) Génotypes</b>			
2177 - pTi292 (a)	1	3	3
2177 - pTi2177	0	0	2
85 3 - pTi2516	1	0	0
2516 - pTi1903	2	2	0
2516 - pTiM80	0	0	1
85 46 - pTi2516	2	4	5
Total	6	9	11
<b>(B) Indices de Shannon</b>			
H <sub>R</sub>	1,352	1,557	0,943
H <sub>P</sub>	0,451	0,956	1,273
H <sub>G</sub>	1,330	1,550	1,273
<b>(C) Test t ( pour H<sub>G</sub>' (ddl))</b>			
	712.8	717.1	712.2
712.8		- 0,779 (10)	0,185 (13)
717.1			1,172 (19)

Tableau 16. Evaluation de la diversité intra et inter-clone pour la population de biovar1 .

(A): effectifs des génotypes, (B): estimation de la diversité par l'indice de Shannon avec: H<sub>R</sub>, H<sub>P</sub>, H<sub>G</sub>: indices calculés à partir des ribotypes, des types plasmidiques et des génotypes; (C): test de significativité des indices H<sub>G</sub>' au risque  $\alpha=0,05$ .

La comparaison des populations issues des tumeurs développées sur trois clones distincts ne permet pas de mettre en évidence une influence du clone sur la composition de la population.

### **Conclusion: Conséquences de la diversité sur la façon d'échantillonner**

La façon d'échantillonner doit tenir compte de la diversité intratumorale non négligeable. La diversité obtenue à partir d'une seule tumeur peut être identique à celle révélée à partir d'un seul clone, cependant toutes les tumeurs ne présentent pas la même diversité. Il est donc nécessaire d'échantillonner plusieurs tumeurs afin d'avoir un échantillon représentatif de la population.

Le dilemme consiste en une nécessité d'estimer la diversité dans un espace donné, qui correspond dans cette étude à la parcelle, et de travailler sur un échantillon représentatif supposant l'analyse d'un nombre important d'isolats par tumeur. Cependant, bien que la méthode de typage par PCR-RFLP soit relativement aisée à utiliser en routine, il est difficile de traiter un très grand nombre de plants en considérant de nombreux isolats par plants. Le compromis choisi fut d'analyser les plants de la parcelle à intervalles réguliers à raison de un à trois isolats par plant, ce qui nous a permis de détecter une diversité importante. Cependant, l'analyse des populations issues d'un même clone montre une diversité similaire en considérant 3 tumeurs et de 3 à 5 isolats par tumeur. L'indice de diversité  $H'$  est similaire que l'on considère la population PEY JT globalement ou chacun des trois clones analysés. De plus, sur l'ensemble des populations, il suffit d'analyser une dizaine de tumeurs de façon aléatoire pour détecter la totalité des génotypes majoritaires. On peut donc estimer qu'un échantillon comprenant environ 10 tumeurs avec 3 à 5 isolats par tumeur donnerait une bonne évaluation de la diversité d'un échantillon.

**Remarque:** Les comparaisons entre tumeurs et entre clones ont été effectuées à partir d'effectifs faibles. Ces observations seraient à confirmer par une étude portant sur un échantillon plus important.

### **2.3 2 Structure génétique des populations**

L'analyse de la structure des populations a été réalisée de façon indépendante pour les populations constituées d'isolats de biovar1 et de biovar2. La distribution des abondances génotypiques de chacune des populations est représentée sous forme d'histogrammes (figures 32 et 33 pour les biovar 1 et 2 respectivement), excepté pour la population isolée du sol. De même, la distribution des cinq types plasmidiques dans les quatre populations analysées est donnée dans la figure 34. Les effectifs majoritaires ont été arbitrairement choisis comme supérieurs ou égaux à 4. Le détail des fréquences est donné dans les annexes V, VI et VII.

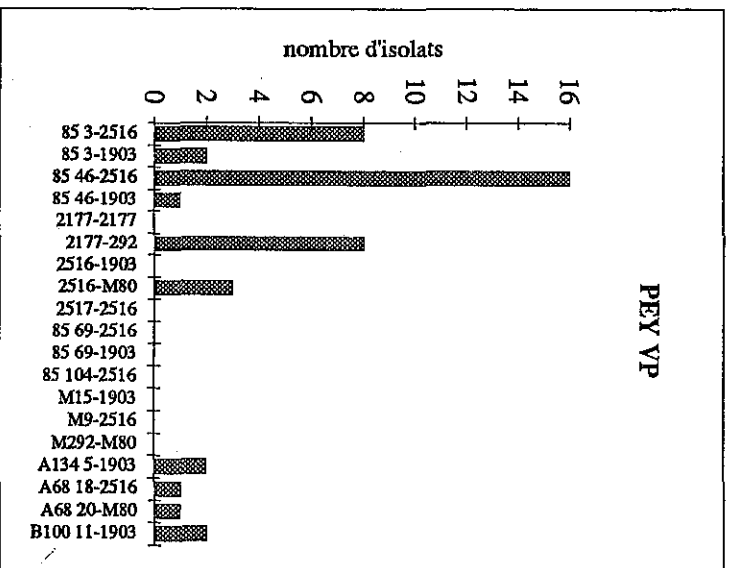
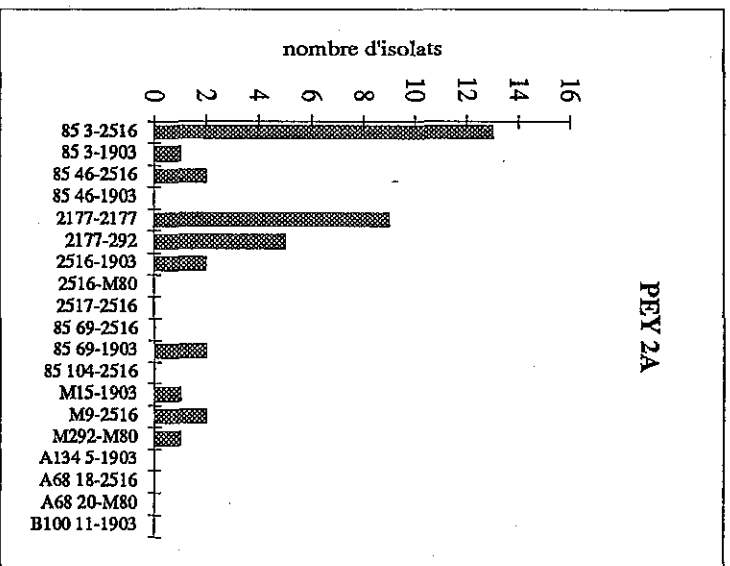
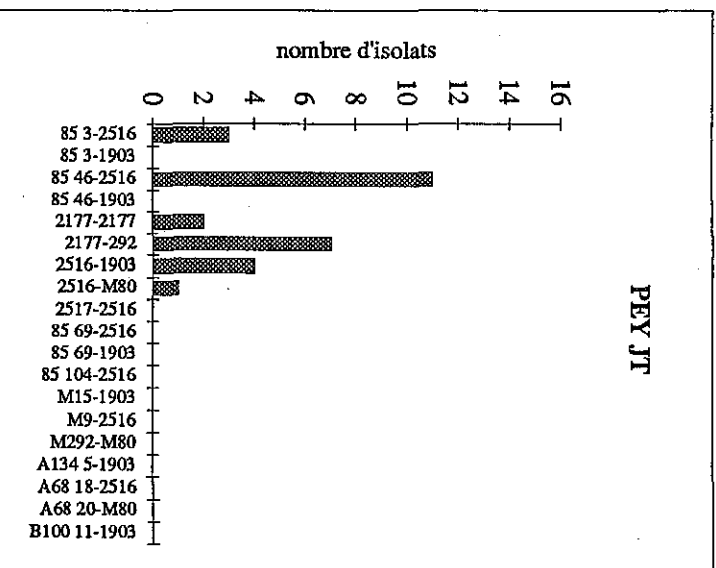
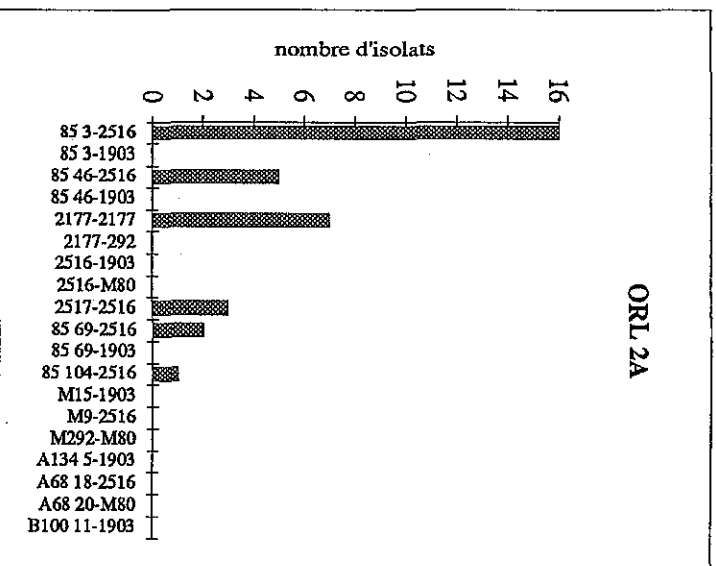


Figure 32. Fréquence des différents génotypes des populations tumorales de biovar1.

Les génotypes sont indiqués par l'association du ribotype (ex. 85 3) et du type de pTi (ex. 2516).

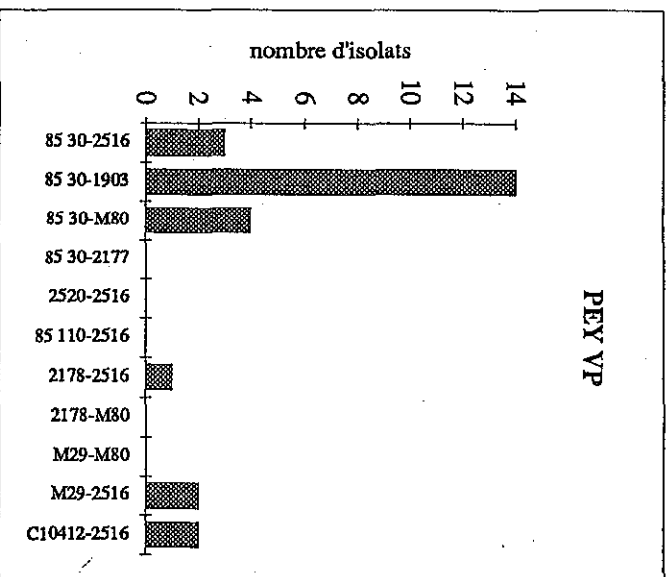
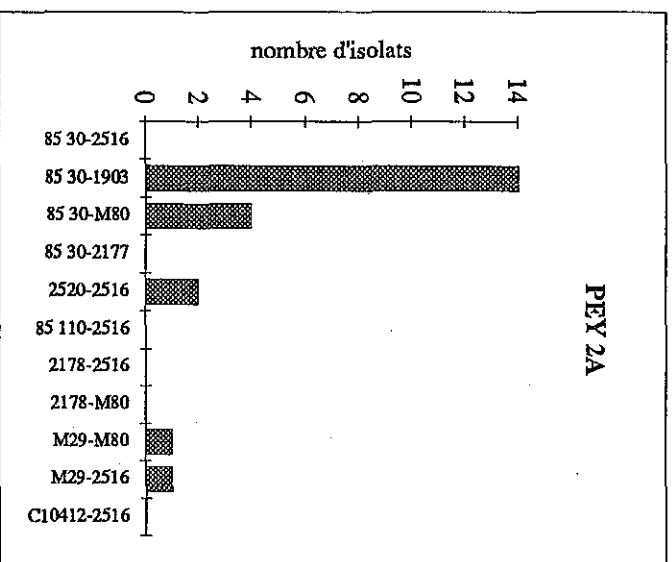
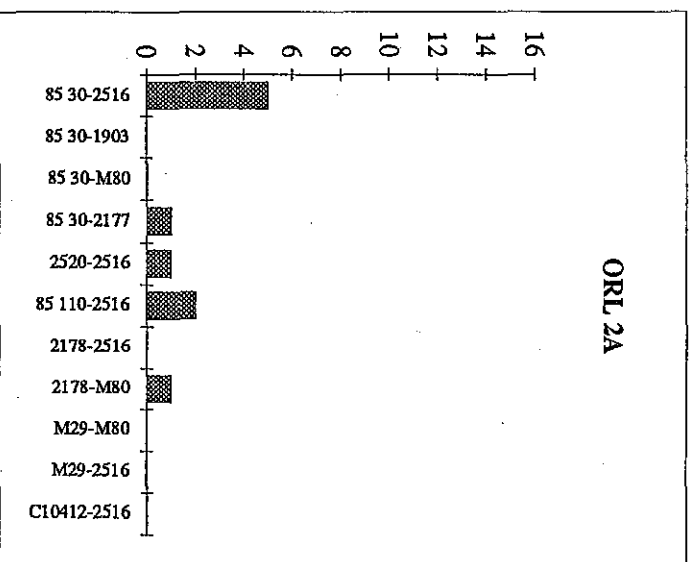


Figure 33. Fréquence des différents génotypes des populations tumorales de biovar2.

Les génotypes sont indiqués par l'association du ribotype (ex. 85 30) et du type de pTi (ex. 2516).

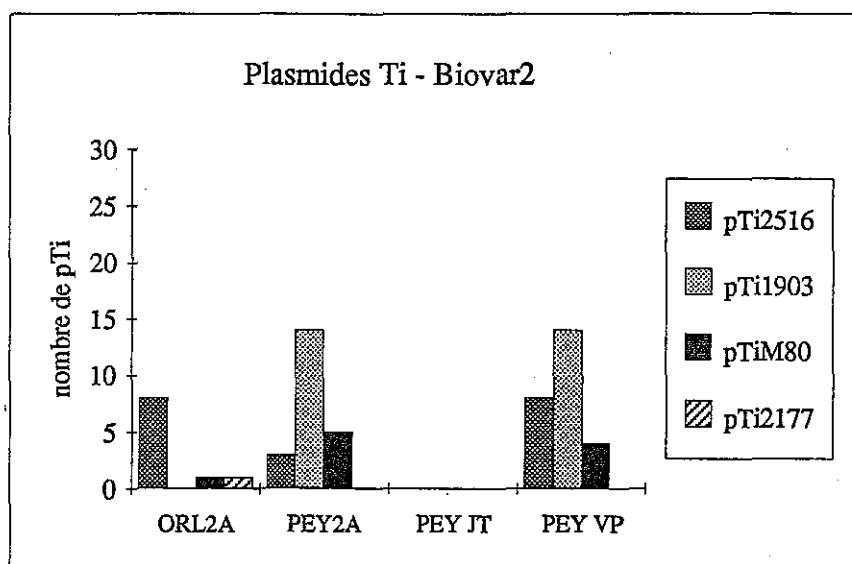
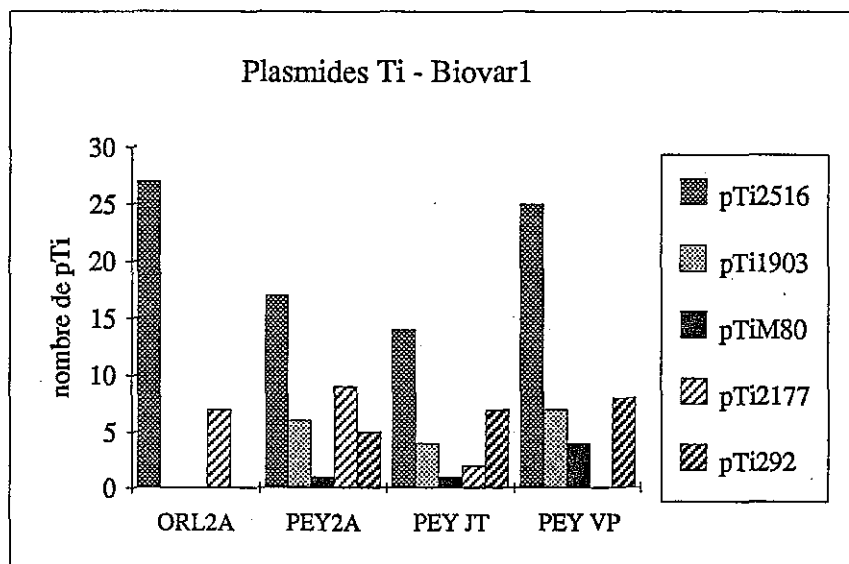


Figure 34. Répartition des différents types de pTi associés aux populations de biovars 1 et 2 des deux pépinières.

Remarque: Dans chacune des populations, un certain nombre d'isolats ont été typés uniquement au niveau chromosomique, étant donné qu'aucun produit d'amplification n'avait été obtenu avec la paire d'amorces plasmidiques FGP*tmr*530 et FGP*nos*975.

#### **Population ORL 2A:**

**Biovar1.** La population constituée des isolats de biovar1 de la pépinière d'Orléans est composée de 6 ribotypes (85 3, 85 46, 85 69, 85 104, 2177 et 2517), et de 2 types de pTi (pTi2516 et pTi2177). Les ribotypes 85 3, 85 46 et 2177 sont dominants et représentent 84,8% des isolats. Le pTi2516 est largement majoritaire avec une fréquence de 73% parmi les plasmides Ti de cette population. La combinaison des deux informations permet d'identifier 6 génotypes, avec une dominance des isolats identifiés par les génotypes 85 3/pTi2516 et 2177/pTi2177.

**Biovar2.** Pour ce qui concerne la population de biovar2, 5 ribotypes (85 30, 2520, 85 110, 85 178 et 2178) et 3 types de pTi (pTi2516, pTi2177 et pTiM80) donnant cinq génotypes en combinaison ont été identifiés. Les types chromosomiques 85 30 et 2520, ainsi que le pTi2516 représentent les groupes majoritaires, avec des fréquences de 77,8% et 80% respectivement. Cette population est difficilement comparable aux autres étant donné son faible effectif (dû à la difficulté de conservation des isolats de biovar2 qui a pu entraîner un biais dans la composition de la population analysée par une sélection de certains génotypes).

#### **Population PEY 2A:**

**Biovar1.** La population composée des isolats de biovar1 provenant des tumeurs prélevées sur les boutures âgées de 2 ans comporte 10 ribotypes (85 3, 85 46, 2177, 85 69, 85 104, 2516, M15, M9, M182 et M292). Cet ensemble est dominé par les ribotypes 85 3 et 2177, avec une fréquence de 68%. Les 6 autres fonds chromosomiques sont faiblement représentés (2,1 à 8,5%). Parmi les 5 types de pTi identifiés (pTi2516, pTi2177, pTiM80, pTi1903 et pTi292), le pTi2516 est majoritaire avec une fréquence de 45%. Pour ce qui concerne les 10 génotypes détectés, les génotypes 85 3/pTi2516 et 2177/pTi2177 sont dominants. Ils représentent 46,7% de cette population.

**Biovar2.** La population de biovar2 est composée de 6 ribotypes (85 30, 2520, 85 110, M29, M62, M140) et de 3 types de pTi (pTi2516, pTi1903 et pTiM80). Le fond chromosomique 85 30 et le pTi1903 sont fortement dominants avec des fréquences de 70,4% et 63,5% respectivement. Cette dominance est retrouvée pour le génotype 85 30/pTi1903 parmi les 5 associations composant cette population.

#### **Population PEY JT:**

**Biovar1.** La population de biovar1 provenant de cet échantillon est organisée comme suit: 5 ribotypes (85 3, 85 46, 2177, 2516 et B113 3) et 5 types de pTi (pTi2516, pTi1903, pTi2177, pTi292 et pTiM80). La dominance chromosomique est répartie sur les types 85 46, 2177 et 2516

	Ribotype	nb	%
Biovar1	S1	12	35
	S2	1	3
	S3	6	17,5
	S4	2	6
	S5	1	3
	S6	1	3
	S7	3	9
	S8	5	14,5
	S9	1	3
	S10	1	3
	2517	1	3
	Total	34	100
Biovar2	2520	10	100
	Total	10	100

Tableau 17. Fréquence des différents ribotypes détectés dans la population isolée du sol de Peyrat avant l'apport de boutures en provenance d'Orléans

		ORL 2A	PEY 2A	PEY JT	PEY VP	H' moyenne	PEY SOL
Biovar 1	H'G	1,446	1,882	1,538	1,850	1,679	-
	H'R	1,419	1,714	1,444	1,901	1,619	1,959
	H'p	0,584	1,355	1,279	1,142	1,090	-
Biovar 2	H'G	1,359	1,097	-	1,390	1,282	-
	H'R	1,268	1,050	-	0,874	1,064	0
	H'p	0,639	0,896	-	0,984	0,840	-

Tableau 19. Indices de Shannon (H') des populations d'*Agrobacterium* de tumeurs et du sol.

L'indice moyen de diversité sur l'ensemble des génotypes de tumeurs est donné dans l'avant dernière colonne.

H'R: diversité des ribotypes, H'p: diversité des plasmides, H'G: diversité des génotypes.

Rq. L'ensemble des ribotypes identifiés ont été comptabilisés, y compris ceux dont le plasmide Ti n'avait pas été identifié.



(82%). La population des plasmides Ti est dominée par le pTi2516. Au niveau des 6 génotypes on note une prépondérance des associations 85 46/pTi2516 et 2177/pTi292.

**Biovar2.** Aucun isolat de biovar2 n'a été isolé dans cette population.

#### **Population PEY VP:**

**Biovar1.** La population constituée des isolats de biovar1 provenant du dispositif piège comporte 10 ribotypes (85 3, 85 46, 2177, 2516, B113 3, A134 5, A68 20, A68 18, B89 11 et B100 11) et 4 types de pTi (pTi2516, pTi1903, pTi292 et pTiM80). Les dominances chromosomiques et plasmidiques sont 85 3, 85 46, 2177, B113 3 (79,5%) et le pTi2516. Parmi les 10 génotypes recensés, les trois représentés majoritairement sont 85 46/pTi2516, 85 3/pTi2516 et 2177/pTi292.

**Biovar2.** La population de biovar2 est composée de 5 ribotypes (85 30, 2520, 2178, M29 et C104 12) et de 3 types de pTi (pTi2516, pTi1903 et pTiM80), avec une dominance du type chromosomique 85 30 (75,7%) et des plasmides pTi1903 et pTi2516. Concernant les 6 génotypes détectés, l'association 85 30/pTi1903 est prédominante.

#### **Population PEY TP**

Les 11 isolats de biovar1 issus des tumeurs développées sur les vitroplants de la parcelle témoin du dispositif sont de génotype M9/pTi2516 qui a également été identifié dans la population PEY 2A, mais dans aucune autre population isolée de tumeurs, ni parmi les isolats du sol de Peyrat.

#### **Population PEY SOL:**

Sur les 34 isolats d'*Agrobacterium* de biovar1 provenant du sol de Peyrat avant la contamination par les boutures d'Orléans, 11 ribotypes ont été identifiés. Trois ribotypes sont retrouvés majoritairement, S1, S3 et S8, représentant 68% de la population totale isolée du sol. A l'exception du ribotype 2517, aucun des isolats du sol de biovar1 ne possède le même profil que les isolats issus des tumeurs. Inversement, la population de biovar2 isolée du sol est très homogène, composée exclusivement du ribotype 2520. Ce profil est assez bien représenté dans les isolats issus de tumeurs (tableau 17). La population de biovar1 apparaît plus hétérogène que celle de biovar2, mais cette dernière nécessiterait un nombre d'isolats plus important.

D'autre part, des dénombrements de la microflore totale du sol de la pépinière de Peyrat ont été effectués sur trois échantillons de sol provenant de la parcelle non contaminée par les boutures de peuplier. La microflore totale a été estimée en moyenne à  $2,8.10^9$  b/g de sol par comptage direct après coloration à l'acridine orange.

		ORL 2A		PEY 2A		PEY JT		PEY VP		PEY SOL	
		(a)	(b)								
Biovar 1	ribotype	6 (46)	1,306	10 (47)	<u>2,338</u>	5 (33)	1,144	10 (54)	<u>2,256</u>	11 (34)	<u>2,836</u>
	plasmide	2 (37)	0,277	5 (38)	1,100	5 (28)	1,200	4 (44)	0,793	-	
	génotype	6 (37)	1,385	10 (38)	<u>2,474</u>	6 (28)	1,501	10 (44)	<u>2,378</u>	-	
Biovar 2	ribotype	5 (10)	1,737	6 (27)	1,517	-		5 (33)	1,144	1 (10)	0
	plasmide	3 (10)	0,869	3 (22)	0,647	-		3 (26)	0,614	-	
	génotype	5 (10)	1,737	5 (22)	1,294	-		6 (26)	1,535	-	

Tableau 18. Evaluation de la richesse des populations: nombre de types et indice de Margalef.

(a): nombres de types identifiés dans chaque population. Le nombre d'isolats traités est indiqué entre parenthèses

(b): indice de Margalef ( $D_{Mg}$ ). Les valeurs en italiques indique des effectifs faibles comparés aux autres. Les valeurs maximales sont soulignées.

Les indices de Margalef (tableau 18) estimant la richesse sont semblables sur l'ensemble des populations de biovar2 issues de tumeurs, de l'ordre de 1,3 à 1,7. Cet indice est relativement plus élevé pour les populations PEY 2A et PEY VP (2,5 et 2,4 respectivement), et comparable à celui de la population isolée du sol de Peyrat (2,8).

A partir des données concernant la richesse et la fréquence des génotypes identifiés dans les différents échantillons, le degré de diversité de chaque population a été estimé par l'indice de Shannon  $H'$  (tableau 19). La diversité moyenne a été estimée à 1,679 et 1,282 pour les populations de biovar 1 et 2 respectivement en considérant les effectifs des génotypes. Les valeurs obtenues pour les populations de biovar1 et de biovar2 sont relativement stables.

### 2.2.3 Pouvoir tumorigène des différents génotypes

Un représentant de chaque génotype majoritaire (85 3/2516, 85 46/2516, 2177/2177, 2177/292, 2516/M80, 2516/1903, 85 30/2516, 85 30/1903 et 85 30/M80) a été testé quant à sa capacité tumorale chez le peuplier. Cet ensemble comprend la totalité des cinq types plasmidiques mis en évidence. La totalité des 9 isolats testés ont induits des tumeurs. Aucune évolution significative de la morphologie des tumeurs n'a été observée, excepté pour l'isolat comprenant un plasmide pTi292 (ce cas sera développé dans la partie V).

## Conclusion

L'analyse des agrobactéries isolées des pépinières d'Orléans et de Peyrat met en évidence une structuration des populations, qui se reflète par la présence de ribotypes et de types plasmidiques majoritaires et minoritaires.

La comparaison globale de ces populations montre que ce sont essentiellement les mêmes ribotypes et les mêmes types de pTi qui sont retrouvés dans les différentes populations, excepté en ce qui concerne la population du sol de la pépinière de Peyrat avant l'apport de boutures en provenance d'Orléans, ce qui élimine la possibilité d'une contamination majeure par le sol de Peyrat. Ces résultats confirment un lien épidémiologique entre les populations d'*Agrobacterium* isolées des tumeurs développées dans ces deux pépinières et montrent l'intérêt de l'utilisation de la méthode de PCR-RFLP pour l'analyse des épidémies de crown gall.

a. Génotypes				b. Ribotypes				c. Plasmides Ti			
	PEY 2A	PEY JT	PEY VP		PEY 2A	PEY JT	PEY VP		PEY 2A	PEY JT	PEY VP
ORL 2A	<u>0.439<sup>a</sup></u>	7,584	5,858	ORL 2A	<u>2.023</u>	11,202	4,206	ORL 2A	2,864	5,486	1,571
PEY 2A		5,242	6,848	PEY 2A		2,635	5,650	PEY 2A		<u>-0.224</u>	1,985
PEY JT			<u>-0.392</u>	PEY JT			<u>-0.459</u>	PEY JT			<u>0.097</u>

Tableau 20. Test du nombre de paires: valeurs NP\* des populations de biovar1.

a, b, c: comparaison des structures de population en considérant respectivement les génotypes, les ribotypes et les plasmide Ti. Les nombres non significatifs sont soulignés. (Test selon la loi normale centrée réduite au risque  $\alpha=0,05$ )

Rq. L'ensemble des ribotypes identifiés ont été comptabilisés, y compris ceux dont le plasmide Ti n'avait pas été identifié.

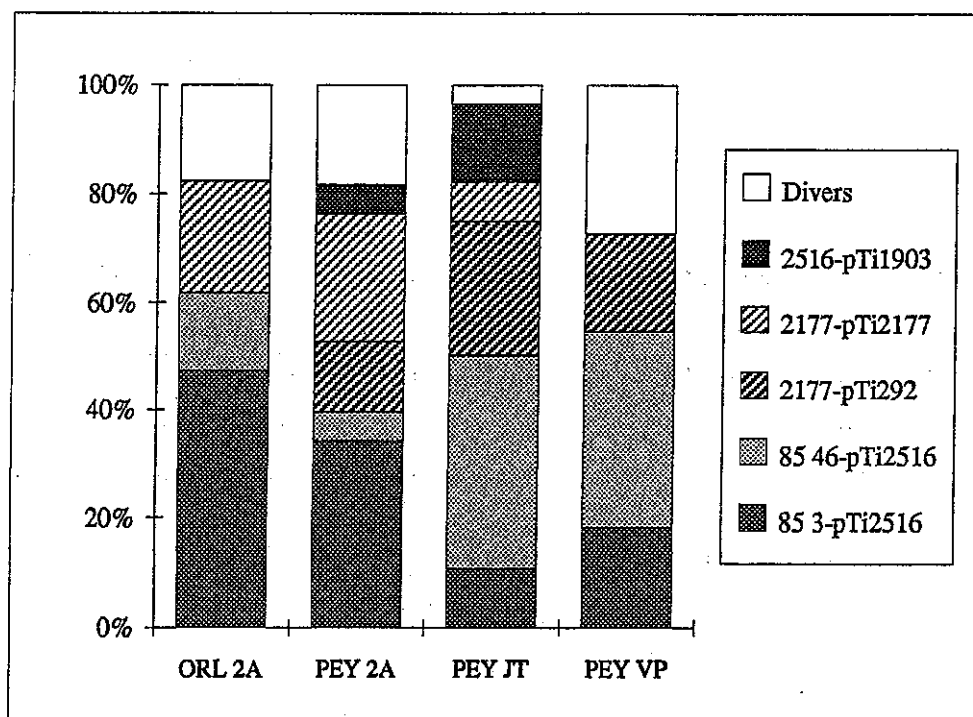


Figure 35. Distribution des génotypes majoritaires des populations tumorales de biovar1.

Les génotypes dont l'effectif est supérieur ou égal à 4 dans au moins une des population ont été considérés comme majoritaires.

Les génotypes minoritaires ont été regroupés dans divers.

a.	Génotypes		b.	Ribotypes		c.	Plasmides Ti	
	PEY 2A	PEY VP		PEY 2A	PEY VP		PEY 2A	PEY VP
ORL 2A	7,090	19,999	ORL 2A	<u>1,676</u>	2,532	ORL 2A	7,512	3,314
PEY 2A		<u>- 0,617</u>	PEY 2A		1,999	PEY 2A		<u>- 0,289</u>
PEY JT		-	PEY JT		-	PEY JT		-

Tableau 21. Test du nombre de paires: valeurs NP\* pour les populations de biovar2

a, b, c: comparaison des structures de population en considérant respectivement les génotypes, les ribotypes et les plasmides. Les nombres non significatifs sont soulignés. (Test selon la loi normale centrée réduite au risque  $\alpha=0,05$ )  
Rq. L'ensemble des ribotypes identifiés ont été comptabilisés, y compris ceux dont le plasmide Ti n'avait pas été identifié.

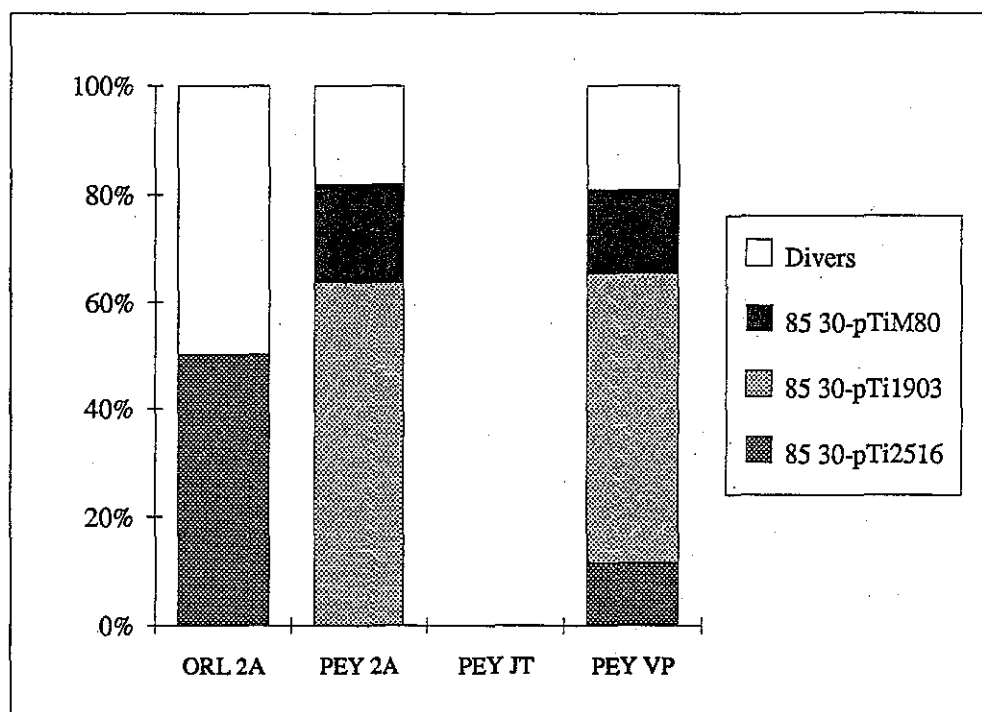


Figure 36. Distribution des génotypes majoritaires des populations tumorales de biovar2.

Les génotypes dont l'effectif est supérieur ou égal à 4 dans au moins une des population ont été considérés comme majoritaires.

Les génotypes minoritaires ont été regroupés dans divers.

### 3. COMPARAISON DES POPULATIONS D'*AGROBACTERIUM*

Nous avons, dans un deuxième temps, étudié plus précisément les relations existant entre ces différentes populations afin de savoir si les abondances relatives des différents génotypes ont subi des modifications significatives en fonction des échantillonnages.

#### 3.1 Génotypes majoritaires

##### 3.1.1 Populations de biovar1 (*A. tumefaciens*)

La comparaison des différentes populations de biovar1 est donnée dans le tableau 20 indiquant les valeurs de l'écart entre les nombres de paires de deux séries (NP\*) permettant de comparer statistiquement la structure des populations deux à deux. Un histogramme représentant la distribution des génotypes majoritaires sur l'ensemble des échantillons de tumeurs est donné dans la figure 35.

Une des hypothèse de cette étude était une influence du passage par le sol ou par la plante, sur la structure des populations d'*Agrobacterium*. Les résultats obtenus montrent que les populations PEY JT et PEY VP ne diffèrent ni par leur contenu en pTi, ni par les fonds chromosomiques, ni par les génotypes issus de l'association de ces deux caractères (valeurs de NP\* non significatives). Ces données suggèrent qu'il n'y a pas d'effet significatif du passage par la plante (PEY JT) ou par le sol (PEY VP) sur l'abondance relative des types majoritaires.

Par contre, les données du tableau 20 illustrées par la figure 35 révèlent des relations inattendues entre les populations. En particulier, les populations PEY JT et PEY VP ont des compositions génétiques significativement distinctes de leur population d'origine PEY 2A. Les différences sont essentiellement dues aux fluctuations des proportions des trois génotypes 853/pTi2516, 85046/pTi2516 et 2177/pTi2177. Une explication de ces observations pourrait être l'âge supposé des tumeurs analysées (2 ans pour PEY 2A et moins d'un cycle végétal pour les deux autres populations). A titre de vérification, les populations PEY 2A et ORL 2A issues de tumeurs d'âge semblable ont également été comparées. Les fréquences des trois génotypes majeurs sont effectivement identiques dans ces deux populations provenant de tumeurs de 2 ans. Les deux populations de biovar1, isolées des tumeurs âgées de deux ans, sont statistiquement identiques. D'autre part, la comparaison entre les populations issues de tumeurs d'âge différent entraîne dans tous les cas des valeurs des nombres de paires NP\* significatifs.

En conclusion, la structure génétique de la population d'*Agrobacterium* majoritaire n'est affectée ni par le passage par la plante, ni par le passage par le sol. Par contre, l'âge des tumeurs semble avoir une influence significative sur les fréquences des génotypes composant ces populations.

Biovar1	85 69	85 104	M15	M9	M182	M292	A134 5	A68 20	A68 18	B89 11	B100 11
ORL 2A	2516	2516	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEY 2A	1903	nd	1903	2516	nd	M80	-	-	-	-	-
PEY JT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEY VP	-	-	-	-	-	-	1903	M80	2516	nd	1903

Biovar2	85 110	85 178	2178	M29	M62	M140	C104 12
ORL 2A	nd	nd	M80	-	-	-	-
PEY 2A	2516	-	-	M80 2516	nd	nd	-
PEY VP	-	-	2516	2516	-	-	2516

Tableau 22. Répartition des ribotypes minoritaires dans les populations de biovars 1 et 2.

La présence de chaque ribotype dans les populations est indiqué par le type de pTi qui lui est associé.

(nd: non déterminé, - non détecté).

### 3.1.2 Populations de biovar2 (*A. rhizogenes*)

La structure des différentes populations de biovar2 est indiquée sur la figure 36. Le tableau 21 indique les comparaisons entre ces populations par le test du nombre de paires. Ces données montrent qu'à l'évidence le contenu en plasmides Ti des isolats de biovar2 est différent entre les deux pépinières et non selon l'âge des tumeurs. La différence observée entre les populations d'Orléans et de Peyrat est due au contenu plasmidique des isolats, le ribotype 85 30 étant largement majoritaire. En effet, le type plasmidique 2516, majoritaire dans la population d'Orléans de biovar2, a été remplacé par le type 1903 dans les populations tumorales de la pépinière de Peyrat.

### 3.2 Génotypes minoritaires

Un certain nombre de types minoritaires ont été recensés dans les différentes populations d'*Agrobacterium* (tableau 22). Les génotypes minoritaires sont la plupart du temps spécifiques d'une population, leur abondance se traduit par une augmentation de la diversité. Les valeurs de  $t$  permettant de comparer les indices  $H'$  reflétant cette diversité sont données dans le tableau 23. On note une différence de diversité chromosomique entre les populations PEY JT et PEY VP due à la présence de ribotypes minoritaires dans la population PEY VP absents de la population PEY JT (les indices  $H'$  obtenus à partir des ribotypes sont différents, les indices obtenus à partir des pTi étant identiques). De même la population PEY 2A est plus diverse que la population ORL 2A.

La présence de génotypes minoritaires est essentiellement remarquée dans les populations PEY 2A et PEY VP qui ont eu un stade de contact avec le sol. Cependant, les ribotypes minoritaires n'ont pas été retrouvés dans les isolats du sol.

### Conclusion

Un certain nombre de ribotypes minoritaires spécifiques de la population du dispositif piège sont associés à des types plasmidiques identiques à ceux des populations tumorales contaminantes suggérant des transferts de plasmides Ti dans les populations naturelles du sol.



a.	Test t - Génotypes				
	Biovar 1			Biovar 2	
	PEY 2A	PEY JT	PEY VP	PEY 2A	PEY VP
ORL 2A	- 2,197 (73)	<u>- 0,497 (63)</u>	- 2,120 (81)	<u>0,782 (22)</u>	<u>- 0,097 (20)</u>
PEY 2A		<u>1,682 (66)</u>	<u>0,153 (80)</u>		<u>- 1,066 (46)</u>
PEY JT			<u>- 1,593 (70)</u>		-

b.	Test t - Ribotypes						
	Biovar 1				Biovar 2		
	PEY 2A	PEY JT	PEY VP	PEY SOL	PEY 2A	PEY VP	PEY SOL
ORL 2A	<u>- 1,559 (88)</u>	<u>- 0,166 (79)</u>	- 2,979 (99)	- 2,656 (64)	<u>0,742 (45)</u>	<u>1,454 (46)</u>	6,597 (18)
PEY 2A		<u>1,494 (77)</u>	<u>- 0,993 (90)</u>	<u>- 1,090 (75)</u>		<u>0,604 (57)</u>	4,748 (27)
PEY JT			- 3,014 (86)	- 2,636 (55)			-
PEY VP				<u>- 0,289 (64)</u>			4,582 (33)

c.	Test t - Plasmides Ti				
	Biovar 1			Biovar 2	
	PEY 2A	PEY JT	PEY VP	PEY 2A	PEY VP
ORL 2A	- 5,952 (68)	- 4,248 (46)	- 4,279 (76)	<u>- 0,822 (15)</u>	<u>- 1,160 (12)</u>
PEY 2A		<u>0,425 (54)</u>	<u>1,421 (82)</u>		<u>- 0,524 (41)</u>
PEY JT			<u>0,760 (56)</u>		-

Tableau 23. Test t de comparaison des indices de diversité H' des différentes populations.

a, b, c: comparaison des valeurs de H' en considérant respectivement les génotypes, les ribotypes et les plasmides Ti. Les nombres non significatifs sont soulignés. Le nombre de degré de liberté (ddl) est indiqué entre parenthèses, avec  $\alpha=0,05$ .

L'intérêt de cette étude est d'avoir une meilleure représentation de l'écologie d'*Agrobacterium* et du plasmide Ti par la prise en compte de la complexité génétique des populations. Les premiers travaux réalisés sur les deux sites forestiers expérimentaux d'Orléans et de Peyrat suggéraient une propagation de la maladie via des boutures apparemment saines mais porteuses d'agrobactéries, engendrant des manifestations récurrentes de crown gall dans la pépinière de Peyrat. Nous avons utilisé ces pépinières comme modèle pour étudier l'effet du passage par la plante ou par le sol sur la stabilité de la structure génétique des populations.

### **1. Intérêt de l'identification par PCR-RFLP pour l'étude des populations d'*Agrobacterium***

#### ***Apport de la méthode de PCR-RFLP par rapport à la sérologie***

Actuellement, la sérologie est encore largement utilisée pour l'étude de populations bactériennes, comme les *Rhizobium* sp. et *Bradyrhizobium* sp. (Leung *et al.* 1994c, Mpeperekí et Wollum 1991, Sinclair et Eaglesham 1990). Cependant diverses études ont montré l'hétérogénéité des sérogroupes (Leung *et al.* 1994a, Sadowsky *et al.* 1987). Du point de vue méthodologique, la caractérisation sérologique des isolats d'*Agrobacterium* et l'identification par les profils PCR-RFLP sont concordantes, avec cependant un pouvoir discriminant supérieur de la méthode de PCR-RFLP. En effet, un nombre plus important de génotypes a été obtenu par cette dernière méthode. Sur les 258 isolats provenant de tumeurs, 17 ribotypes et 9 ribotypes ont été définis parmi les populations de biovars 1 (*A. tumefaciens*) et 2 (*A. rhizogenes*) respectivement. A l'échelle infraspécifique, différents types ont pu être identifiés dans les populations d'*Agrobacterium* par l'analyse en PCR-RFLP de l'opéron ribosomique.

La sérologie s'est avérée utile pour une première approche de l'épidémie déclarée dans les deux pépinières étudiées (Michel *et al.* 1990, Nesme *et al.* 1987). Cependant, cette méthode est rapidement apparue insuffisante dans le cadre de l'étude des populations d'*Agrobacterium*. En effet, l'information sérologique ne concerne que les chromosomes et ne permet pas une caractérisation des populations de plasmides Ti impliquées dans l'épidémie. De plus, les isolats d'*Agrobacterium* et la microflore du sol de Peyrat croisent avec les sérums disponibles signifiant le manque de spécificité de cette approche. Enfin, une part importante des isolats n'ont pas pu être typés par cette approche. Par contre, la méthode de PCR-RFLP a permis d'améliorer la caractérisation des *Agrobacterium* composant les populations analysées en identifiant la totalité des fonds chromosomiques et la plupart des plasmides Ti qui leur sont associés.

## *Identité des plasmides Ti dans les différentes populations*

### *lien épidémiologique entre les deux pépinières modèles*

Les plasmides Ti responsables de l'épidémie de crown gall du peuplier des pépinières d'Orléans et de Peyrat sont de type nopaline (Nesme *et al.* 1987, 1992). Les plasmides Ti à nopaline sont largement répandus dans les souches d'*Agrobacterium* impliquées dans divers cas de crown gall (Lopez *et al.* 1988, Wabiko *et al.* 1989). De ce fait ils représentent un bon modèle pour une généralisation de cette étude aux attaques de crown gall sur d'autres espèces végétales, notamment les arbres fruitiers appartenant au genre *Prunus*.

La caractérisation de différents types de plasmide Ti à l'intérieur de ce groupe a été possible par la méthode de PCR-RFLP ciblant le T-DNA. Sur l'ensemble de la population plasmidique analysée, cinq types ont été identifiés. Une telle diversité des plasmides Ti à nopaline associés à des isolats issus d'un même site avait été montré par Wabiko *et al.* (1989) par la méthode de RFLP. Excepté dans le cas du pTi1903 (identique par notre méthode au pTiC58), ces cinq types plasmidiques n'ont été retrouvés associés à aucune des souches de collection d'*Agrobacterium*, traitées dans la partie III, autres que les souches types d'Orléans.

**Les profils de la région *tmr530-nos975*, obtenus par PCR-RFLP, constituent donc un bon marqueur des plasmides Ti impliqués dans cette épidémie.**

Cette approche a montré que la plupart des types de plasmides Ti associés aux isolats de biovar1 sont communs aux deux pépinières, à l'exception des plasmides pTi1903 et pTi292. Le pTi292 semble dériver du pTi2177 sous l'effet d'une transposition d'un élément d'insertion qui sera étudié en détail dans la partie V. La présence du pTi1903, en association aux isolats de biovar2 principalement, dans la pépinière de Peyrat pourrait être le fait d'un défaut d'échantillonnage dû à une fréquence de ce pTi trop faible à Orléans. Dans ce cas, l'expansion des isolats arborant le pTi1903 aurait été favorisée dans la pépinière de Peyrat. Il semble en effet improbable que le pTi1903 soit indigène du sol de la pépinière de Peyrat à un taux élevé, étant donné qu'aucun cas de crown gall n'avait été décrit auparavant dans cette pépinière, et que aucune séquence spécifique du pTi n'a pu être détectée dans le sol de la pépinière de Peyrat avant sa contamination par la méthode de PCR-MPN (Picard *et al.* 1992). Cependant, l'hypothèse d'une contamination de la pépinière de Peyrat par une voie autre que celle des boutures prélevées à Orléans n'est pas à exclure. Il est évident que certains aspects des pratiques culturales en cours dans les pépinières du Fond Forestier National échappent à notre connaissance.

**En considérant le pTi comme le réel agent causal du crown gall, la similitude des populations de plasmides Ti permet de montrer que l'épidémie déclarée dans la pépinière de Peyrat a en grande partie son origine dans la pépinière d'Orléans. L'identification des plasmides Ti par la méthode de PCR-RFLP présente donc un intérêt non négligeable pour le suivi des populations de plasmides Ti dans un but épidémiologique.**

## *Identité des fonds chromosomiques dans les différentes populations:*

### *prépondérance de la transmission "verticale" des plasmides Ti*

La totalité des isolats de biovar1 et de biovar2 composant les populations d'*Agrobacterium* étudiées ont été identifiés par leur ribotype, obtenu par l'analyse en PCR-RFLP de l'opéron ribosomique. Les ribotypes recensés sur l'ensemble des populations se distinguent de ceux déterminés pour les souches de collection (Partie III). Le ribotypage constitue donc un marqueur performant des souches impliquées dans cette épidémie de crown gall. Cette approche permet en outre de montrer qu'un certain nombre de ribotypes sont communs aux populations des deux pépinières confirmant les résultats obtenus par l'identification des plasmides Ti.

La diversité des fonds chromosomiques et des plasmides Ti concourent à donner une structure génétique polyclonale aux populations d'*Agrobacterium*. Une population dominante composée de trois génotypes est retrouvée dans les deux pépinières. Globalement, la structure génétique des populations d'*Agrobacterium* est relativement constante dans les deux pépinières montrant qu'il s'agit bien d'une épidémie récurrente de crown gall. Cette étude de la diversité des populations d'*Agrobacterium* pourrait être complétée par une analyse des relations phylogénétiques entre les génotypes des différents échantillons sur la base du polymorphisme des régions ciblées pour la caractérisation des isolats.

La méthode de PCR-RFLP appliquée à l'identification des plasmides Ti et de leurs contextes chromosomiques permet de suivre des populations naturelles d'*Agrobacterium*. La relative stabilité des génotypes dominants détectés dans ces différentes populations tend à montrer une contribution importante de la prolifération clonale des souches tumorigènes (transmission verticale) dans la dissémination des plasmides Ti.

## **2. Apport de cette étude à l'écologie d'*Agrobacterium***

### *La tumeur, site privilégié de la diversité*

L'analyse des populations tumorales nous a permis de montrer l'existence d'une diversité importante à l'intérieur d'une tumeur, se manifestant par la présence des deux espèces *A. tumefaciens* (biovar1) et *A. rhizogenes* (biovar2), avec différents ribotypes et plasmides Ti. L'existence d'une diversité chromosomique et plasmidique dans les populations d'*Agrobacterium* à l'échelle de la tumeur avait également été constatée par Nesme *et al.* (1992).

La présence de plusieurs types de pTi au sein d'une même tumeur pose la question de savoir si tous sont impliqués dans l'induction de la tumeur. Dans ce cas la tumeur pourrait être considérée comme une chimère de cellules végétales transformées par différents T-DNA lors de plusieurs infections simultanées ou par une série d'infections se succédant. Le nombre de copies du T-DNA présentes dans les cellules tumorales dépend de la multiplicité des souches

d'*Agrobacterium* infectantes, de la quantité d'inducteurs présents, et de l'espèce végétale (Melchers et Hooykaas 1987). Il a été montré que certaines lignées tumorales peuvent contenir jusqu'à 12 copies de T-DNA (Kwok *et al.* 1985, Peerbolte *et al.* 1986). L'éventualité d'une co-infection par différents T-DNA expliquant la diversité révélée à l'échelle de la tumeur est donc probable.

Cependant, par l'analyse du contenu des tumeurs prélevées sur des plants d'âges différents, nous avons mis en évidence une évolution de la structure génétique des populations de biovar1 dans le temps. Cet effet se traduit par des différences d'abondances relatives des types majoritaires. Les populations contenues dans les tumeurs jeunes donnent donc certainement une image plus juste de la population à l'origine de la formation de la tumeur, alors que les populations issues de tumeurs plus âgées sont la résultante de l'évolution des populations dans le temps. Ces observations suggèrent l'existence de successions de différentes populations au sein de la niche écologique définie par la tumeur. Il a été observé par ailleurs que les *Agrobacterium* cèdent eux-mêmes la place à d'autres micro-organismes dans les tumeurs âgées à partir desquelles il est alors difficile d'isoler des agrobactéries (Nesme, comm. pers.).

La complexité intratumorale est trop importante pour dériver uniquement de modifications ayant eu lieu après la formation de la tumeur, surtout en considérant la diversité plasmidique présente. Cette constatation laisse supposer qu'une partie de cette diversité est antérieure à la formation de la tumeur. En conséquence, la diversité présente à l'échelle de la tumeur reflète en partie la diversité de la population tumorigène du sol. D'autre part, la tumeur, niche écologique, contribue à la génération de la diversité des *Agrobacterium*. En effet, la présence d'une population complexe "piégée" par la tumeur constitue le support d'échanges de plasmides Ti par conjugaison entre différentes souches, favorisé par la présence d'opines dans la tumeur (Ellis *et al.* 1979). Cette dynamique de la population plasmidique à l'intérieur des tumeurs est suggérée par la présence de différentes associations entre divers plasmides Ti et contextes chromosomiques. Par contre, aucune diversité n'a été mise en évidence dans les nodules induits par des souches de *Rhizobium* sp. ou par l'actinomycète *Frankia*. Une seule souche est identifiée par nodule, cependant diverses souches peuvent être à l'origine de la formation des différents nodules sur une même plante (Jamman, Thèse). Bien que la formation des tumeurs et des nodules comportent certains mécanismes communs, il semble qu'elles ne fassent pas intervenir les mêmes interactions au niveau populationnel. Les agrobactéries vivent à la surface ou dans les méats cellulaires, jamais dans les cellules végétales contrairement aux symbiontes. Les nodules induits par les symbiontes *Rhizobium* et *Frankia* constituent apparemment un environnement exclusif, alors que les tumeurs induites par le pathogène *Agrobacterium* constituent un environnement favorisant la diversité.

La diversité intra-tumorale apparaît ainsi comme la résultante de divers processus impliquant essentiellement la colonisation de la tumeur par une population du sol déjà complexe, et les transferts de plasmides Ti. D'autre part, l'existence de phénomènes de réarrangements génomiques impliquant des éléments mobiles (cet aspect sera développé dans la Partie V) contribuent également de façon non négligeable à la création de la diversité des *Agrobacterium*. La diversité

des génotypes ainsi générée dans la tumeur, ou à son voisinage, pose la question de leur rôle dans l'adaptation des souches tumorigènes au maintien dans le sol. Nous avons ainsi cherché à déterminer quelle est la contribution de la transmission verticale des plasmides Ti comparée au transfert horizontal par conjugaison dans la prolifération des souches tumorigènes.

### *Influence du passage par la plante ou le sol sur la stratégie de dissémination des plasmides Ti*

#### *Stabilité de la population majoritaire: mise en évidence d'une transmission "verticale"*

Les populations d'Orléans et de Peyrat de biovar1 issues de boutures de deux ans sont de structure semblable, certains génotypes sont présents dans chacune d'elles. La population d'*Agrobacterium* transmise par les boutures racinaires correspond à un nombre restreint de génotypes. Ces génotypes ont également été identifiés dans les populations issues des jeunes boutures. Ainsi, lorsque les *Agrobacterium* sont transmis par la plante, les populations restent identiques suggérant que le passage exclusif par la plante n'a pas sélectionné les *Agrobacterium*. Certains auteurs ont montré la persistance d'agrobactéries dans le système vasculaire de la vigne (Bishop *et al.* 1988, Burr *et al.* 1986) et dans la rhizosphère de diverses plantes (Bouzar *et al.* 1993). Cette observation indique que les populations d'*Agrobacterium* ont été véhiculées soit de façon systémique, soit par le sol rhizosphérique transporté avec les boutures racinaires. Nos données soulèvent cependant le problème de l'éventuelle adaptation de certains génotypes vis-à-vis de la plante, ou présentant une spécificité d'hôte plus restreinte pour le peuplier. La détection des mêmes types d'isolats dans les différentes populations peut également être due à une virulence supérieure de ceux-ci et/ou plus simplement à une supériorité quantitative de ces génotypes.

Une manifestation récurrente du crown gall a été observée dans la pépinière de Peyrat dans les années qui ont suivies l'introduction des premiers plants contaminés. Cette observation reflète (i) une colonisation du sol de Peyrat par les *Agrobacterium* tumorigènes disséminés à partir des tumeurs et (ii) un maintien de la capacité tumorigène après un passage de quelques années dans le sol sans plante-hôte. Les populations piégées par les vitroplants du système piège ont été analysées dans le but de connaître l'influence du passage par le sol sur la structure des populations tumorales. Deux aspects ont été appréhendés: une modification quantitative de la structure des populations d'*Agrobacterium*, et une modification génétique via le transfert de plasmides Ti.

D'après la comparaison entre les populations issues respectivement des jeunes boutures et des vitroplants du dispositif piège, on ne remarque pas d'influence notable du sol sur la structure des populations tumorales de biovar1. Bien que nous ayons montré une évolution de la

structure des populations tumorales de biovar1 en fonction de l'âge des tumeurs, on note une relative stabilité de la population infective dominante quel que soit le mode d'échantillonnage. La **population majoritaire transmise depuis Orléans s'est donc maintenue dans le sol de Peyrat.**

Les dénombrements des *Agrobacterium* tumorigènes par MPN-PCR (Picard *et al.* 1992) dans le sol de Peyrat après sa contamination ont en effet indiqué des taux avoisinant  $10^7$  séquences cibles par gramme de sol (Picard, Thèse). Ce nombre est relativement élevé comparé aux  $10^5$  à  $10^6$  séquences cibles par gramme de sol détectées dans différents sols cultivés par cette même approche (Picard, Thèse). De même, Bouzar *et al.* (1993) ont mis en évidence le maintien d'une population d'*Agrobacterium* de structure génétique complexe dans un sol sans plante-hôte depuis plusieurs années, avec un taux d'environ  $10^7$  pathogènes par gramme de sol. La structure de populations naturelles de *Rhizobium leguminosarum* peut également être stable sur des périodes de plusieurs années avec une dominance de certains types (Leung *et al.* 1994c). Le maintien de la population d'*Agrobacterium* dans le sol de Peyrat pourrait être dû au fait que les deux pépinières correspondent à deux environnements comparables: la plante-hôte est la même et d'autre part leurs sols respectifs sont de pH acide et de composition similaire. L'acidité des sols des pépinières étudiées est plutôt favorable au développement de l'infection (étant donné que l'induction des gènes *vir* semble optimum à pH 5 (Winans 1992)), mais plutôt néfaste à la multiplication cellulaire (Dickey 1961). La stabilité observée pour les génotypes majoritaires de biovar1 pourrait s'expliquer par un maintien des génotypes les plus adaptés à ce type de sol. L'effet du passage par le sol devra cependant être vérifié en augmentant la durée de mise en place du dispositif piège.

**En considérant la stabilité de la population majoritaire après un passage par la plante et par le sol, il semble que la dissémination de l'agent pathogène se fait essentiellement par transmission verticale des plasmides Ti.**

#### *Présence d'une population minoritaire: hypothèse de transmission "horizontale"*

Malgré la relative constance des génotypes majoritaires, on note une augmentation de la diversité des populations d'*Agrobacterium* entre les deux pépinières avec la détection de nouveaux ribotypes dans la pépinière de Peyrat. Ces ribotypes sont minoritaires mais représentent cependant entre 13% et 20% des isolats selon le biovar et la population considérée. La spécificité de ces ribotypes vis-à-vis des populations issues de la pépinière de Peyrat suppose qu'ils sont issus du sol de celle-ci. Cependant, l'origine de ces ribotypes minoritaires qui sont associés aux mêmes types plasmidiques que la population contaminante est difficile à déterminer de façon incontestable vu leurs faibles fréquences et qu'ils n'ont pas été détectés à Orléans. Les isolats provenant du sol de la pépinière de Peyrat avant sa contamination ne sont probablement pas tumorigènes étant donné qu'ils n'ont pas pu être caractérisés au niveau plasmidique. De plus, aucun cas de crown gall n'a été observé dans cette parcelle avant l'apport de boutures de la pépinière d'Orléans et les tests de détection par la méthode de PCR-MPN (Picard *et al.* 1992) se sont avérés négatifs (Picard, Thèse). Ainsi, la diversité des plasmides Ti associée aux ribotypes minoritaires

spécifiques de la population d'*Agrobacterium* de la pépinière de Peyrat suggère des échanges de pTi entre les *Agrobacterium* saprophytes du sol de la pépinière de Peyrat et les *Agrobacterium* contaminants. Le fait que les ribotypes minoritaires n'aient pas été identifiés dans la population isolée du sol pourrait signifier que les ribotypes les plus favorables à l'acquisition des plasmides Ti ne sont pas nécessairement les plus abondants dans la population indigène du sol.

D'autre part, les plasmides pTi2516, pTi1903 et pTiM80 ont été identifiés dans différents contextes chromosomiques de biovar 1 ou 2, alors que les plasmides pTi2177 et pTi292 sont associés préférentiellement aux isolats de biovar1 de ribotype 2177. Le génotype 2177/pTi2177 s'est avéré particulièrement stable sur l'ensemble des populations analysées, excepté pour le système piège. Cette stabilité laisse supposer que le pTi2177 n'est pas transféré ou ne se maintient pas dans différents fonds chromosomiques. Cependant, le fait que différents plasmides Ti puissent être associés à un même ribotype favorise fortement l'hypothèse de transfert de plasmides Ti dans les populations naturelles d'*Agrobacterium*.

Bien que nous ayons montré une prépondérance de la transmission verticale des plasmides Ti par multiplication clonale, les données concernant les ribotypes minoritaires associés à divers types de plasmides Ti, ainsi que l'instabilité de certaines associations chromosome/plasmide Ti suggèrent l'existence de transferts horizontaux des plasmides Ti.

#### *Adaptation écologique des biovars?*

La plupart des tumeurs de peuplier analysées ont permis l'isolement de deux espèces, *A. tumefaciens* (bv1) et *A. rhizogenes* (bv2)), excepté pour ce qui concerne les tumeurs prélevées sur les jeunes plants bouturés pour lesquelles uniquement des isolats de biovar1 ont été obtenus. Ce résultat n'a pas été reproduit et il est par conséquent impossible de donner une conclusion définitive sur cette observation. On remarque cependant, qu'un biais d'échantillonnage peut être causé par les différences des deux milieux électifs respectifs et surtout par la physiologie différente des isolats de ces deux biovars. Ceci se traduit par une difficulté de conservation des isolats de biovar2 par rapport aux isolats de biovar1, et explique le faible effectif des isolats de biovar2 analysés dans la pépinière d'Orléans, qui est disproportionné par rapport au nombre effectivement isolé par Michel *et al.* (1990).

Ces deux biovars sont souvent associés dans les épidémies de crown gall sur diverses essences végétales en Espagne (Lopez *et al.* 1988). Inversement, il existe une certaine spécificité des isolats de biovar3 pour la vigne (Burr *et al.* 1986), rarement détectés pour d'autres plantes-hôte (Lopez *et al.* 1988). L'inégale répartition des biovars dans les différents cas de crown gall soulève la question de la spécialisation écologique des espèces d'*Agrobacterium*. Une spécialisation écologique des biovars 1 et 2 n'a pas été reportée jusqu'à maintenant contrairement aux connaissances acquises sur le biovar 3. Notre étude montre que les populations des deux



biovars ne sont pas structurées de la même façon et que leur diversité est différente bien qu'ils partagent certains types de pTi. De plus, les populations de biovar2 sont stables dans les deux populations issues de la pépinière de Peyrat, alors que les populations de biovar1 évolue en fonction de l'âge des tumeurs. Contrairement à la population de biovar1, la population de biovar2 de Peyrat n'héberge pas les mêmes plasmides Ti que celle d'Orléans. Cette observation suggère que si les isolats de biovar1 d'Orléans ont été introduits et se sont multipliés à Peyrat, il n'en est pas de même pour les isolats de biovar2.

Ainsi, l'analyse effectuée en parallèle sur les populations de biovars 1 et 2 montre que ces deux espèces ne sont pas soumises aux mêmes contraintes suggérant une spécialisation différente de ces deux espèces.

## CONCLUSION

L'identification rapide des plasmides Ti et de leurs contextes chromosomiques par la méthode de PCR-RFLP s'est avérée un outil performant pour le suivi et la comparaison des populations d'*Agrobacterium* en cause dans l'épidémie modèle étudiée. Cette approche nous a permis dans un premier temps de confirmer le lien épidémiologique existant entre les deux pépinières analysées par la mise en évidence d'une stabilité qualitative des ribotypes et des types plasmidiques majoritaires dans les populations analysées. Cette observation nous a permis de conclure sur l'identité des deux épidémies d'Orléans et de Peyrat, même si une autre source de pathogènes est suspecté concernant la population de biovar2.

La mise en évidence d'une diversité et d'une structuration des populations d'*Agrobacterium* impliquées dans les cas de crown gall des pépinières d'Orléans et de Peyrat a constitué la base de cette étude. La diversité des populations d'*Agrobacterium* a été révélée à l'échelle de la tumeur. La structure des populations d'*Agrobacterium* intra-tumorales est soumise à une certaine dynamique se traduisant par une colonisation par différentes populations successives, et par des échanges de plasmides Ti favorisés par la présence d'opine dans la tumeur. La tumeur se présente ainsi comme un lieu privilégié de génération de la diversité.

Nous avons, dans un deuxième temps, chercher à connaître le mode de dissémination préférentiel des plasmides Ti en considérant les populations globalement. Le développement récurrent de tumeurs sur les peupliers de la pépinière de Peyrat indique un maintien de la capacité tumorigène dans le sol ou à la surface des racines des plants. L'étude de la population piégée à partir du sol par les vitroplants indique que la population contaminante apportée par les boutures d'Orléans s'est maintenue dans le sol, en interaction avec la microflore indigène. Les génotypes responsables de cette conservation de la capacité tumorigène du sol sont principalement les mêmes que ceux véhiculés depuis Orléans. Les structures des populations transmises par la plante à partir de la pépinière d'Orléans, ou piégées à partir du sol de la pépinière de Peyrat, s'accordent pour montrer une prolifération clonale prépondérante dans les populations naturelles d'*Agrobacterium*. Cependant, la détection de ribotypes spécifiques aux populations issues de la pépinière de Peyrat, associés aux plasmides Ti introduits par la population d'Orléans, représente un argument en faveur de l'existence de transferts de plasmides Ti à partir de cette population contaminante vers les *Agrobacterium* indigènes au sol. Les souches tumorigènes colonisant le sol sont donc capables de survivre dans le sol avec leurs plasmides Ti et sont susceptibles d'échanger des informations génétiques avec les *Agrobacterium* indigènes. Ces données signifieraient donc que les deux modes de dissémination des plasmides Ti, à savoir, la prolifération clonale et la transmission des plasmides Ti entre les souches d'*Agrobacterium*, contribueraient à la persistance du pouvoir tumorigène dans les sols, avec cependant une nette prépondérance de la prolifération verticale.

**PARTIE V.**

**DESCRIPTION D'UN ELEMENT D'INSERTION:  
IMPLICATIONS SUR LES POPULATIONS DE PLASMIDES TI**

## INTRODUCTION

L'étude des populations d'*Agrobacterium* isolés des tumeurs de Peuplier de la pépinière de Peyrat nous a permis d'identifier un groupe particulier d'isolats définis par le ribotype 2177. Ces isolats peuvent contenir deux types de plasmides Ti: le pTi2177 ou le pTi292, qui diffèrent par la taille de la région *tmr530-nos975* du T-DNA. Sur l'ensemble des populations analysées, ces deux types de plasmide Ti sont exclusivement associés au ribotype 2177, contrairement aux autres types de pTi identifiés dans ces mêmes populations qui ne présentent pas de spécificité particulière vis-à-vis d'un fond chromosomique. L'observation d'une différence au niveau de la taille de la région *tmr530-nos975* entre ces deux types de pTi nous a conduit à l'hypothèse qu'un événement d'insertion dans le T-DNA serait à l'origine du pTi292.

L'activité transpositionnelle des séquences d'insertion peut générer des modifications génétiques variées, telles que des mutations ou des réarrangements. Les éléments de type IS apparaissent donc comme l'un des moteurs de la diversité génomique des bactéries et de leur adaptation. Ils peuvent affecter tous les compartiments supports de l'information génétique: chromosomes, plasmides, phages. La transposition des éléments d'insertion peut être soit intragénomique (entre molécules d'ADN d'une même cellule), soit intergénomique via les plasmides conjugatifs, ou tout autre mécanisme de transfert d'ADN tels que la transduction ou la transformation. Ce phénomène a donc une incidence non négligeable sur l'évolution des génomes pouvant entraîner une modification de la diversité des populations.

Nous avons, dans un premier temps, vérifié la nature de l'insertion présente dans le T-DNA du pTi292 et cherché d'éventuelles relations avec les éléments décrits par ailleurs. Nous avons ensuite recherché l'origine de cet élément et replacé ces données dans le cadre de l'étude de la structure des populations d'*Agrobacterium* de l'épidémie étudiée. En considérant les éléments d'insertion comme l'un des facteurs influant sur la diversité des génomes, les implications potentielles d'événements de transposition sur la stabilité des populations en conditions naturelles sont discutées.

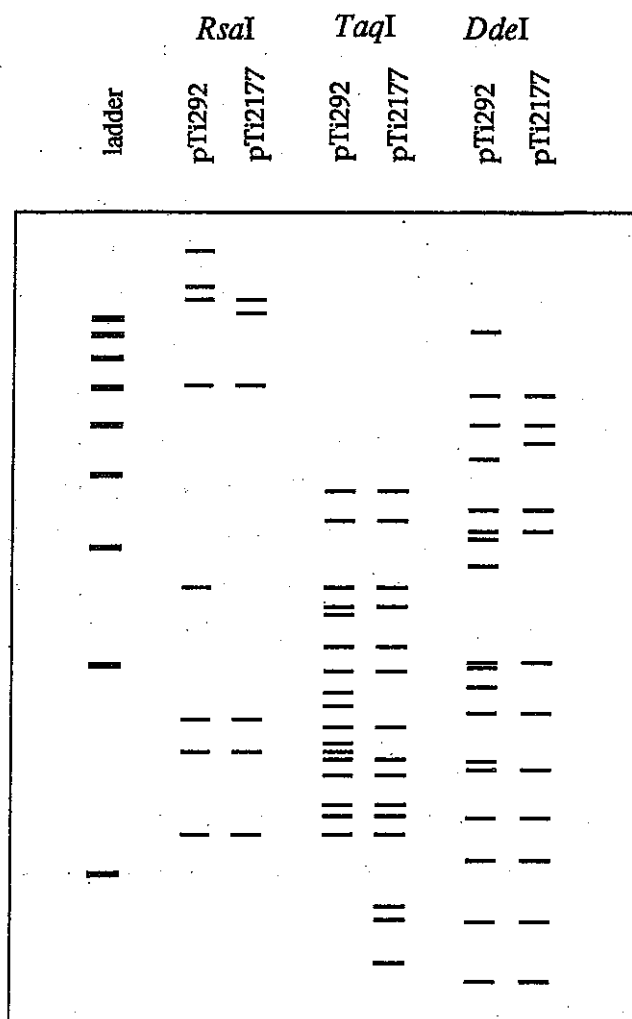


Figure 37. Comparaison des profils de restriction de la région *tmr530-nos975* des plasmides pTi2177 et pTi292 obtenus avec les enzymes *Rsa*I, *Taq*I et *Dde*I.

Le ladder de 123pb a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

## 1 Mise en évidence d'un élément d'insertion dans le pTi292

### 1.1 Détection d'une insertion dans le T-DNA du pTi292

La définition du type 292 parmi les plasmides Ti des populations d'*Agrobacterium* analysées correspond à un résultat d'amplification et non à des profils de restriction. L'amplification avec les amorces FGP*tmr*530 et FGP*nos*975 à partir de l'ADN des souches comportant un plasmide Ti de type pTi292, conduit à la synthèse d'un fragment de taille supérieure à celle attendue. Ce fragment a une longueur d'environ 6kb, alors que l'utilisation des mêmes amorces aboutissait à la synthèse d'un fragment de 3,6kb pour les autres types de pTi détectés parmi les isolats d'*Agrobacterium* des populations d'Orléans et de Peyrat. Il apparaît donc un supplément de séquence d'environ 2,4kb dans cette partie du T-DNA pour les plasmides Ti de type 292. Afin de vérifier la spécificité de ce fragment atypique, nous avons comparé les profils de restriction obtenus avec les enzymes *Dde*I, *Rsa*I et *Taq*I après digestion des fragments amplifiés (avec les amorces FGP*tmr*530 et FGP*nos*975) des souches X88292 (pTi292) et 2177 (pTi2177). Pour chacun des trois enzymes testés, les profils comportent une partie commune aux deux types de fragments et une partie supplémentaire pour le fragment correspondant au pTi292 (figure 37).

L'homologie existant entre les profils correspondant aux deux types de fragments permet d'exclure tout phénomène d'artéfact ou de contamination au niveau de l'amplification. Ces résultats mettent donc en évidence la présence d'une insertion d'ADN de 2,4kb, dans la région comprise entre les gènes *tmr* et *nos* du pTi292, celle-ci étant absente pour les autres types de pTi analysés.

### 1.2 Localisation de l'insertion

La comparaison des analyses de restriction de la région *tmr*530-*nos*975 des souches X88292 et 2177 par l'enzyme *Hind*III, a montré que l'insertion est située dans le fragment *Hind*III de 1850pb (figure 38). De plus, la présence de deux sites *Hind*III supplémentaires a été observée dans le fragment *tmr*530-*nos*975 de l'isolat X88292. Les digestions par l'enzyme *Rsa*I ont permis de préciser la localisation de l'insertion au fragment *Rsa*I de 1150pb environ, interne au fragment *Hind*III 31 du pTi292. Ce fragment *Rsa*I est composé pour moitié d'une partie de l'intergène *6a-6b*, le reste correspondant à la majorité du gène *6b*.

Les amorces FGP*6b*508 et FGP*6b*489' ont ensuite été élaborées afin de déterminer la position de l'insertion par rapport au gène *6b* (figure 38). L'amplification de l'ADN de la souche 2177 avec les paires d'amorces FGP*tmr*530-FGP*6b*508 et FGP*6b*489'-FGP*nos*975 a engendré des fragments de taille attendue, 1850pb et 1890pb respectivement. Dans le cas de l'isolat X88292,

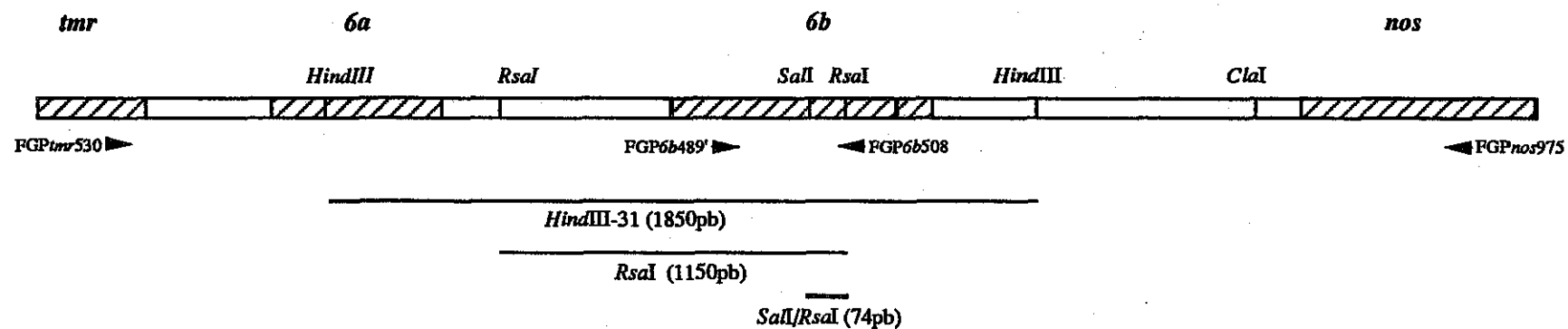


Figure 38. Localisation de l'insertion: restriction des fragments *tnr530-nos975* et *6b489-nos975* par *Hind*III, *Rsa*I et *Sal*I.

Les amorces d'amplification, ciblant les zones digérées, sont indiquées au-dessous de la carte de restriction par des flèches correspondant au sens d'amplification

les mêmes réactions ont conduit à un fragment de taille attendue avec les amorces FGP<sub>tmr530</sub>-FGP<sub>6b508</sub>. Par contre, une taille de 4300pb, supérieure d'environ 2,4kb à celle de 2177, a été obtenue avec les amorces FGP<sub>6b489'</sub>-FGP<sub>nos975</sub>. Ces résultats indiquent que l'insertion est située en aval de l'amorce FGP<sub>6b489'</sub>, dans le gène *6b*. La digestion du fragment *6b489-nos975* des souches X88292 et 2177 par l'enzyme *SalI* a permis de restreindre la zone de localisation de l'insertion au fragment *SalI-RsaI* de 74pb (figure 38).

### 1.3 Caractérisation de la séquence d'insertion

#### 1.3.1 Détermination de la nature de l'insertion

La nature la plus probable de la séquence présente dans le gène *6b* des plasmides pTi292 est celle d'un élément d'insertion. Afin de démontrer cette hypothèse, nous avons vérifié que la séquence supplémentaire présentait les caractéristiques de ce type d'élément d'ADN mobile. Nous avons donc, dans un premier temps, étudié la structure des extrémités de cette séquence et celle du site d'insertion.

Le séquençage des clones comportant les fragments *SalI-ClaI* et *SacII-ClaI* des plasmides pTi2177 et pTi292 a permis de localiser et de caractériser le site d'insertion de façon précise en comparant les séquences nucléotidiques de ces deux types de plasmides (figure 14 de la partie matériel et méthodes). L'insertion se situe au nucléotide 226 du gène *6b*. Le site d'insertion est constitué d'une séquence de 10pb (5' CGACGCAAGG 3') dupliquée de façon directe dans le pTi292, de part et d'autre de la séquence insérée. Les séquences des extrémités de l'insertion sont répétées et inversées sur 21pb. Ces deux séquences sont imparfaitement homologues, avec deux nucléotides variables entre les deux (soulignés):

extrémité gauche:	5' TAAGCGGCAAGCTGAC <u>G</u> CCGT 3'
extrémité droite:	5' TAAGCGGCAAGCTGAC <u>C</u> CCAT 3'

La structure des extrémités de l'insertion et du site d'insertion sont caractéristiques d'une séquence d'insertion (figure 39). Ces résultats permettent donc de montrer la présence d'un élément d'insertion d'environ 2,4kb en début du gène *6b* des plasmides Ti de type 292.

#### 1.3.2 Détermination de la séquence nucléotidique complète et de la structure de l'insertion

La séquence nucléotidique complète de l'insertion (inscrite dans la base de données GenBank, acc.# L29283), ainsi que la position des ORFs (Open Reading Frames ou cadres ouverts de lecture) sont indiquées dans les figures 40 et 41 respectivement. L'IS292 a une taille de 2494 nucléotides et comporte 8 ORFs principaux (de taille supérieure à 115 aa) déterminés par les signaux initiateurs ATG, GTG, TTG, et les codons stop TAA, TGA, TAG. Quatre ORFs,



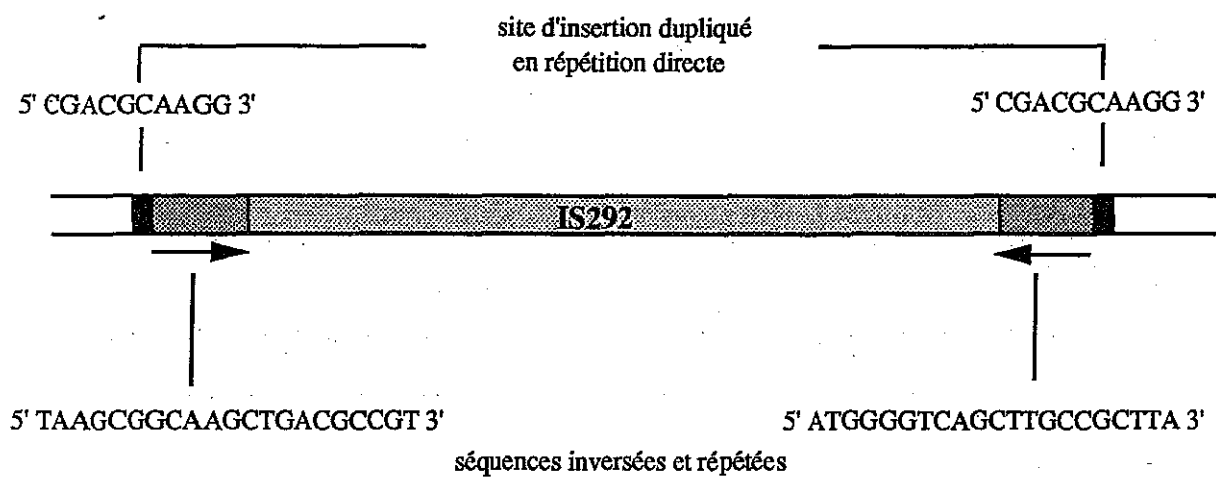


Figure 39 . Structure de l'élément d'insertion du pTi292, séquences des extrémités et du site d'insertion.

```

XhoI
CGACGCAAGGTAAGCGGCAAGCTGACGCCGCTTCAGGCTTGTAGCTCCACGGCATAAGAGTATGGATTTCGCTGCTAGGCCAGCCATTTCGAGGGCGCTC 100
      Δ ORF5
      EcoRI      PstI
GAGCGCTCTGCGTCAGCCAAGCCTGGGGATCGACAGAAATTCATCTTTGCAGTCTGCAGCAGCGACGCGATTGTCGCCCATGCCCTGCCCTCGCCGCTCGCTG 200
      SacI
CGGCAAGAGAGACTGTTTTTCTTGTGATCGCCTGAGGTCTGATCGCTCGCTCGACGATGTTGGAGTCGAGCTCGACACGGCCGTCGGTCAGAAAGCGTT 300
      Δ ORF1
      Δ ORF6
CGAAGACGTCACGACGCTTGATCGAGTACCGTAGAGCTTCGGCGAGATTGGATTTCCTTGATACTCGCGGCAAGTCGCTCTGCCAGAGAGTGAAGAGGCA 400
      >ORF1
TCGGACTATCGCCCGGAGCGTTCTTGTGCGGGCAGCGACCGGCCCTCAGGGCTTTGACCACGGACGGTATCTTCTATTTCAGAGCGCTTGCCTATTCG 500
      Δ ORF6
XhoI
TCGAGGGTCTCTGTTGCCACCTTGGAGCTTTTCGCGATATGCAATTCATAGAAGCTTGGCAGCGGCTATGTGCCAGCAGCCAGCCAGAACAACGCCGCTCGT 600
      ORF5<      ***
      HindIII      PstI
TGCCGCCGCTCCTTCGGGACAGGCTTCTGTAGGCCCGTACCGCTCAACCTGCAGAAATCCGCGATAGCCGCTGAGGTGCCGTGCCACGCAGTCGGTCGCC 700
      CGACTGTCTTCGAAGCGATAGGCCACCATTGGCGGGCCATTGCTCCGAACGGTCGTCATCCCTGGCATAGGCCACAGCCATCGGGTTTTCGCCGACC 800
      SacI
CGGACCCAGGCGCCAGTGTTCGGCAGGGTCTCTGTCGGCAATATTCGTTCCGCCCTTCTTGATTTCGTTTCAGGATGTAATCGGCGAGGATGTCGAGCTC 900
      ORF1 Δ
GAACCCAGCTTTTCCCATCCATTGAGCCATGAGCCTGCGGTCGAGTTCGACCTTTGTCGCGGGCGTAATCGCCTCTGCCGATAGAGTGGTAGGCCATCG 1000
      >ORF2
GCATATTTGACACGGCGATCTGAGCCAGAAGCGCTTCTGTTGGAATGCCCGCTCAATGATATGTGTCGGGGCGCAGCCTGGATCAGCCGCTCTTCGT 1100
      TCTTAAAGCGTATTTGGGACGGCGCGTAACAATGACACGGAAGCTTCGCTGCAACGACATCAAGCGTTTCGGGATATGTCCTCTCCGATCAGGATTTTGG 1200
      Δ ORF7      ORF6<
      >ORF3
TCTTACCCGCGATGCTCCGGCAATCTTCGGCTCGATCACCACCTCGATACGCTCCAGATGCGCCGCAAGCCCTTGGCTGGCCTCGGTTGACGTTTGGC 1300
      ATCTTTGTGATGCCACTCGTAACCTTGGCCCTGATCGCCGAATACCGGTCTCGATCTCCTCAAAGACAAAGCATGCTGCTCGTCATCAACACTGGCC 1400
      ORF2 Δ      HindIII
GCTGCAAGTTTCTCTGACGCGCTCCGAAGCGCGCGGCTCAAAGCTTTCAGGATCTGTGTGACGCGCTCGATGCGCTCATCGGCATCAGCATTTCCGG 1500
      XhoI      SacI
CCTCGAGATCATCGACCTGCTTTTCCAAAGCCTCGACGCGAGCGGCTTTTCGGCCATGGCAAGAACCATGGCCTTGAGTGCCTCTACATCATCCGGGAG 1600
      BclI
CTCTATATCGGGTCGCGTCATGGGTATGATCAGAGCATATTTGCTGTGATCGCGCCGAGTTTCAGGTGTCATGATTCAATTCGCGCCAGGGGTTTACC 1700
      ORF7<
      ORF3 Δ
CAACAATCTCTGGTGGCTTGATGGGTGTGATCGAACGCGTTTCCAGTCCATTCCATCCACCAAGCCAGAAGCTGGGCATTGTTGAGCTGGACCTGGCT 1800
      =====
      GTGTCCGATGCGCGCCAGCAGAACTGGGCTTTCTCCAGCGCTTGGCGTAAAGGCAAACGCCGAGCCATCCACCATACGATCTTGATACGGTCTGCT 1900
      SacI      >ORF4
CGTTTCGCGCGAAGACATAAAGAGCTCCGTTGAACGGATCACTGCCAGCATCTCGAACCAGTGATAGCAAGCTGTGAGGTCTTACGGAAGTCGATCGG 2000
      *****
      ATGGCTCGCCAGAAAGACTTTCAGTTCGACGGGATCATGCCGACGACGCTCGATCAGCGACTGAGGTGTGCTTCAATCGGCATCCACCCCGCCCGGAT 2100
      Δ ORF8
      AATTACGTCGCGGATAACCACTCGATCACCGCCCGCGCGCAAAACGGCCCCAATCGCCTCGACAGACGAGGCACCGGAAGAGCCCTTGTTCGGC 2200
      GCGAGGCATCAGACGCCAGCCGAATAATTGTGATGGATGTAGTCCGAGTGCGACGCGCAATTGCGGAGACACTCGGTCCAGGCTCCATCGCCTCAGCC 2300
      SacII
ACCGCTCGCTCCTTGAATCATCGGACCAACGCCGCCGAAACTGCCGCGCGCGCCCTCAAAACGTTCCGGAACGGCCTCGATCATATGAAAGTTTCTAG 2400
      TTCCAGAGATAGGCGCAGACATAGAAGCTCACAGCTGGTGAATAGTCATTACTCAATAGCTGAGCCCGCGCTACTGACGCCAGATGGGGTCAGCTTGCCG 2500
      ORF8<      ***      =====
      Δ ORF4
      CTTACGACGCAAGG

```

Figure 40. Séquence nucléotidique de l'IS292 et du site d'insertion dans le pTi292.

Les séquences répétées et inversées des extrémités sont soulignées. Les ORF1, ORF2, ORF3 et ORF4 sont indiquées au-dessus de la séquence; les ORF5, ORF6, ORF7 et ORF8 du brin opposé sont indiquées au-dessous de la séquence. Les codons initiateurs, les signaux stop, ainsi que les principaux sites de restriction sont soulignés. Les motifs de Shine-Dalgarno (1974) potentiels sont indiqués par des étoiles aux coordonnées 546, 1911 et 2420 et les deux séquences Chi par un trait double aux positions 1700 et 2424.

désignés par ORF1, ORF2, ORF3 et ORF4 de 501, 369, 433 et 573pb respectivement, ont été identifiés sur le brin supérieur. Quatre ORFs ont été repérés sur le brin opposé, désignés par ORF5, ORF6, ORF7 et ORF8 de 498, 687, 516 et 345pb respectivement. Plusieurs ORFs supplémentaires, de taille inférieure à 345pb, sont présents sur chaque brin. Une séquence similaire au motif de Shine et Dalgarno (1974), a été repérée 6pb en amont des codons initiateur des ORF4, ORF5 et ORF8. L'algorithme de Fickett (1982) a été employé pour évaluer la probabilité de la capacité codante de la séquence. Les deux brins des segments de coordonnées 19 à 390 et 403 à 2494 présentent la plus forte probabilité théorique possible. De plus, deux éventuelles séquences Chi ont été identifiées en positions 1700 et 2424. Ce type de séquence consensus peut être associé à une activité de type enhancer (Galas et Chandler 1989). De plus, on note la présence d'un codon stop situé à l'extrémité droite de l'insertion, à 245 nt du début du gène *6b* du pTi292.

#### 1.4 Recherche de séquences homologues

La recherche d'homologie entre l'élément d'insertion présent dans le pTi292 et les séquences des bases de données a été réalisée dans le but de:

- 1) démontrer que l'élément d'insertion n'avait pas encore été décrit
- 2) repérer des homologies avec d'autres éléments d'insertions
- 3) identifier un éventuel gène de transposase
- 4) rechercher la présence de zones d'homologie avec une séquence quelconque

##### 1.4.1 Comparaison avec la séquence nucléotidique d'autres éléments d'insertion

La séquence nucléotidique de l'élément d'insertion du pTi292 a été comparée aux séquences des éléments d'insertion et transposons de divers genres bactériens inscrites dans la base de données GenBank. Aucune de ces séquences ne présente un degré d'homologie suffisamment élevé pour pouvoir être considérée comme identique à la séquence d'insertion détectée dans le pTi292. Par conséquent, cette insertion correspond effectivement à un nouvel élément d'insertion associé au genre *Agrobacterium*, désigné par IS292.

Aucune ressemblance significative entre l'IS292 et les autres éléments d'insertion décrits chez *Agrobacterium* n'a été mise en évidence. Cependant, en ne considérant que les extrémités des éléments d'insertion, il existe un certain degré de similitude entre les séquences inversées et répétées des éléments IS292, IS66, IS866, IS1131 d'*Agrobacterium* et IS*Rm*2, IS*R*11 de *Rhizobium* (figure 42). Ces six éléments se répartissent en deux groupes: les éléments de taille supérieure ou égale à 2,4kb (IS66, IS1131, IS866, IS292 et IS*R*11) et ceux de taille inférieure (IS426, IS427 et IS*Rm*2). La taille du site d'insertion est de 8 à 10pb pour la majorité d'entre eux, excepté pour les éléments IS426 et IS*Rm*2.

Parmi les séquences d'insertion inscrites dans la base de données GenBank, l'IS*R*11 découverte chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (GenBank, acc.# L19650) est très proche

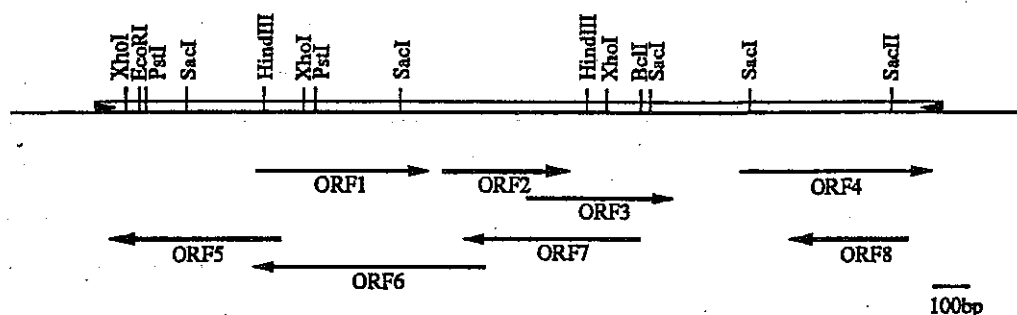


Figure 41. Localisation et étendue des ORFs de l'IS292.

Les flèches indiquent l'étendue et l'orientation de chacun des 8 ORFs principaux (100 aa). Les sites de restriction de l'IS292 sont indiqués.  
Les ORFs conservés par rapport à ISR/1 sont indiqués par un trait épais.

5'	TAAGCGGCAAGCTGACGCCGT	IS292	(2494)	ATGGGGTCAGCTTGCGCTTA	3'
	<u>GTAAGCGACAAGC</u>	ISR/1	(2495)	<u>GCTTGTGGCTTAC</u>	
	<u>GTAAGCCACGGTGAAGGCC</u>	IS66	(2458)	<u>GGCCTTCACCGGAGGCTTAC</u>	
	<u>GTATGCGCGCGCTCCATCCCATGATT</u>	IS866	(2716)	<u>AATCAATGGGACGGAGACGCCGCATAC</u>	
	<u>GTGAGCGTCCGG</u>	IS1131	(2773)	<u>CCGGAACGCTCAC</u>	
	<u>GTAAGCGCTCATTTCATGCGC</u>	ISRm2	(2500)	<u>GCGCATGGAAATTAGCGCTTAC</u>	

Figure 42. Comparaison des séquences nucléotidiques des extrémités des éléments d'insertion IS292, IS66, IS866, IS1131, ISR/1 et ISRm2.

Les nucléotides conservés par rapport à l'IS292 ont été soulignés. La taille de chaque élément est indiquée entre parenthèses (pb).

de IS292. En effet, ces deux éléments sont de même taille et sont homologues à 80% au niveau nucléotidique (annexe VIII). De plus, les séquences protéiques des ORF5 (position 534 à 25), ORF2 (position 480 à 980) et ORF8 (position 2412 à 2068) de l'IS292 sont fortement conservées avec les régions correspondantes de *ISR11* (figure 43). L'homologie la plus importante (69,5% de similitude) concerne l'ORF5 de IS292 et la zone 26 à 655 de *ISR11* en considérant un changement de phase en position 105 de la séquence en acides aminés. Ces trois régions conservées ont été comparées aux séquences protéiques de la base de données NBRF. ORF8 présente une homologie avec les séquences en acides aminés de protéines impliquées dans l'attachement de l'ARN (NBRF, acc.# S33799) et le traitement des ARN (protéine NOP3, NBRF acc.# A44401 et acc.# S27435; protéine MST1, acc.# S31322) (annexe VIII) qui pourrait donc avoir un rôle dans la transposition.

D'autres homologies avec des zones d'éléments d'insertion ou de transposons décrits pour divers genres bactériens ont été remarquées à partir de cette analyse. Ces analogies ne concernent pour la plupart que des parties de l'IS292 avec des degrés d'homologie relativement faibles (non montré).

#### 1.4 2 Recherche de séquence de transposase

La recherche d'homologie au niveau protéique a été accomplie en considérant les séquences en acides aminés des 8 ORFs principaux de l'IS292 individuellement. Il s'agissait de vérifier si l'une d'entre elles pouvait correspondre à une transposase. Deux bases de données ont été testées: la banque de séquences protéiques NBRF et la banque de séquences nucléotidiques GenBank traduite. Aucune similitude avec une séquence protéique de transposase n'a été mise en évidence par cette approche. L'analyse a seulement révélé une homologie faible entre l'ORF7 et le gène *bps2* de *Desulfurolobus ambivalens* (GenBank, acc.# X64202) et entre l'ORF6 et le gène *lmBA* de *Streptomyces lincolnensis* (GenBank, acc.# X64651). Cependant les fonctions de ces gènes ne présentent aucun lien avec l'insertion.

La recherche a ensuite été effectuée avec la base de donnée GenBank restreinte aux séquences associées aux transposases et en considérant la séquence nucléotidique complète de l'élément IS292. Cette analyse a mis en évidence une similitude entre une partie du gène de transposase *tnpA* (en position 1-1941) du transposon Tn21 (GenBank, acc.# X04891) et la région de coordonnées 558-2493 de l'IS292. Cette zone d'homologie (44%) recouvre les trois quarts de l'élément d'insertion IS292 (des positions nucléotidiques 558 à 2493).

#### 1.4 3 Recherche de séquences connues

La comparaison de l'IS292 avec l'ensemble des séquences nucléotidiques de GeneBank n'a révélée que peu de séquences présentant une homologie. La zone couvrant les 440 premiers nucléotides de l'IS292 présente 50% de similarité avec la région centrale du Tc-DNA du pTi15955 en position 14558-14998 (Barker *et al.* 1983, GenBank, acc.# X00493). Cette homologie est retrouvée au niveau protéique entre l'ORF1 et la protéine 14 (NBRF, acc. #

ORF5

	1	11	21	31	41	51
1 ISRLa	MVAYRFEDSR	ATECVARHLN	GYRGILQVDG	YAAYNKLVRK	DGGNNSAILA	GCWSHSRRKF
3 IS292	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2 ISRLb	-----	-----	-VESCRSMDM	PLITSSSGKM	EAITAPSWPA	VGRTAGESST
	61	71	81	91	101	111
1 ISRLa	YELHVAKSSK	VATDTVERMA	RLWEIEERVR	AQSPEARVAA	RQEISAAIVR	DLFTLWQATL
	II IIIII	III I IIII	IIII II	IIIIIIII	III IIIII	IIIIII II
3 IS292	--LHIKSSK	VATETLERMA	TLWEIEDTVR	QQSPEARVAA	RQERSAAIVR	CLFTLWQTTL
	I					
2 ISRLb	SCMSQRRAR-K	SLPTPSSVWR	GYGRSRVCA	PKALKLVSLH	ARRSPQRSSV	TSSLSGRRPC
	121	131	141	151	161	171
1 ISRLa	PRVSGKSKPR	RGSALCHLAS	RHL-RALPDR	RPHRT--RLQ	HSRASNQTPS	DHE---KK
	IIIIIII		I I	I		
3 IS292	PRVSGKSNLA	EALRYSIKRR	DVFERFLTDG	RVELDSNIVE	RAIRPQAITR	KNSLFAGSDG
	III IIIII	I II I	IIIIIIII	I IIIIIII	IIIIIIIIII	IIIIIIIIII
2 ISRLb	RGSLENPNLA	EALRYAISRR	DIFERFLTDG	RIELDSNIVE	RAIRPQAITR	KNSLFAGSDG
	181	191	201	211	221	231
1 ISRLa						
3 IS292	GGRWATIAS	LLQAKMNSV	DPQAWLTQTL	ERLANGWPSS	EIHTLMPWSY	KA
	III IIIII	IIIIIIII	I IIIIIIIII	I IIIII I	II IIII I	I
2 ISRLb	GGRTWATIAI	LLQAKMNAV	DPQAWLTQTL	EALANGWPNS	EIDALMPWNY	AA

ORF2

	1	11	21	31	41	51
1 ISRL	-----VCRSR	--RLDDTILV	PKGILRPAGD	DDTELRCMDI	QPLGDVFNQ	DLGLTCMFWK
			I I		I I I I III I	
2 IS292	MPASMICVGA	AAWITPSSFL	-KAYLGRRVT	MTRNFAATTS	KRSGYVLSQ	DFGLTRMLRQ
	61	71	81	91	101	111
1 ISRL	LFRFDHDLDA	LKMRRKALAW	PRSAFAVRAT	AAFRDLSLDR	RNAGLDLFED	KGMLLVIDRW
	II II II	I IIIIIII	II II	I I I II II IIII	I I IIIII	
2 IS292	IFRLDHHLDI	LQMRKALAW	PRLTFAIFVD	AT-RNLGPDR	RNTGLDLLKD	KSMLLVIN--
	121	131	141	151	161	171
1 ISRL	MMQAFPSVGQ	IGRDRKPSGS	CVSRSMRASA	SALRPLDRQP	VSPKPRRGLL	LHSGKNHGFE
		I I		I		
2 IS292	-----	-----TGR	CK-----	----FL----	-----	-----
	181	191	201	211		
1 ISRL	SLYIIRELNL	GPRHGYDQSI	FCRAPPMLSG	T		
2 IS292	-----	-----	-----	-----		

ORF8

	1	11	21	31	41	51
1 ISRL	MSAPSSGTRN	FHMIEAVPER	LEGAPRQFRR	RWSDDFKAQA	VAEAMEPGAS	VSAIAHRIGI
	IIII IIIII	IIIIIIIIII	IIIIIIII	IIIIII I	IIIIIIII I	IIII I
2 IS292	MSAPISGTRN	FHMIEAVPER	FEGAPRQFRR	RWSDDFKERA	VAEAMEPGPS	VSAIARRTRH
	61	71	81	91	101	111
1 ISRL	HPSQLFGWRR	DARDGQRSFS	QDRAGQTGTR	TIGTRAMIEL	VIGDVIIRAD	ADIGEALQOR
			II I I		I II I I	
2 IS292	YIHHNYS---	-----AGVV	MPRAEQGGSS	G-ACVCRGGF	GAG---LRAG	GDRGGYRRRN
	121					
1 ISRL	VIRAVRSA					
2 IS292	YPGGGGCR					

Figure 43. Comparaison des séquences protéiques des éléments IS292 et ISR/1.

Les régions conservées (ORF2, ORF5 et ORF8) de l'IS292 ont été alignées avec les régions correspondantes de l'ISR/1.

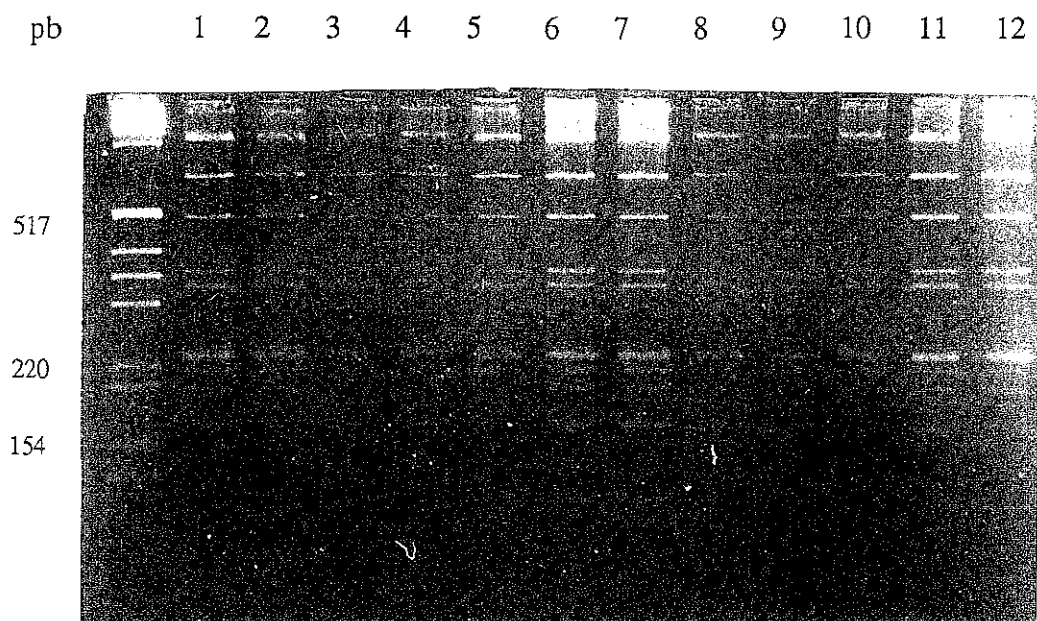


Figure 44. Comparaison de la région *6b489-nos975* de plusieurs pTi292.

Les profils de restriction ont été obtenus avec l'enzyme *DdeI*. Puits 1 à 12: isolats M142, M204, M290, B85 31, C17 11, X88 268, X88 292, X88 293, X88 294, X88 312, X88 313, X88 328.

X00493). De plus, l'analyse a révélé un alignement entre l'IS292 et le fragment C25 promoteur actif de la souche C58 sur 209 nucléotides, avec une homologie faible. Cependant, à l'intérieur de cette région, une séquence de 30 nucléotides présente 80% d'homologie avec la région de coordonnées 830-860 de l'IS292.

L'ensemble des comparaisons concernant les séquences nucléotidiques et protéiques sont rassemblées dans l'annexe VIII.

### 1.5 Comparaison des différents plasmides de type pTi292

Une analyse de restriction de la région *6b489-nos 975* a été utilisée afin de comparer 12 des plasmides Ti de type 292 détectés dans les différentes populations d'*Agrobacterium*. Les fragments d'ADN amplifiés avec les amorces FGP*6b489'* et FGP*nos975* encadrant l'insertion ont été digérés par les enzymes *DdeI* (figure 44) et *TaqI*. Parmi les 20 plasmides de type pTi292 détectés sur l'ensemble des populations nous avons testé respectivement: 3 sur les 5 de la série PEY 2A, la totalité (7) de la série PEY JT et 2 sur les 8 de la série PEY VP. Les profils obtenus sont tous identiques quel que soit l'enzyme. Ce résultat indique que les séquences d'insertions présentes dans le gène *6b* de ce groupe de plasmides Ti sont très proches sinon identiques.

### Conclusion:

Les plasmides Ti de type 292 présentent la particularité de posséder une insertion de 2,5kb localisée dans le gène *6b*. Sur la base des comparaisons des séquences nucléotidiques, cette insertion peut être considérée comme un nouvel élément d'insertion procaryotique, l'IS292. L'analyse fait cependant apparaître une similarité importante entre l'IS292 et l'ISR11 associée à *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: taille identique, séquences nucléotidiques homologues à 80%, ORFs conservés, séquences des extrémités similaires et site d'insertion de même taille.

### 2. Effet de la présence de l'IS292 dans le gène *6b* sur le pouvoir tumorigène:

Nous avons vérifié si la présence de l'IS292 dans le gène *6b* avait une conséquence sur le pouvoir tumorigène des isolats comportant un plasmide Ti de type 292. Ce test a été effectué en inoculant les isolats M20 (pTi2177) et M209 (pTi292) sur peuplier. Les isolats M20, M209 et la souche témoin C58 T139 (Brasileiro *et al.* 1991) ont développé des tumeurs sur peuplier quatre semaines après l'inoculation. Les tumeurs induites par les souches M209 et C58 T139 étaient à cette date de taille supérieure à celles induites par la souche M20. La mutation du gène *6b* causée par l'insertion n'inhibe donc pas le processus tumoral.





D'autre part, l'évolution de la morphologie des tumeurs a été suivie sur milieu axénique sans hormone. Treize semaines après l'inoculation, les tumeurs induites par les souches M209 et C58 T139 étaient bourgeonnantes. Les tumeurs induites par la souche M20 avaient augmenté en taille, certaines débutant un développement de bourgeons, mais aucune n'a abouti à un phénotype bourgeonnant stable (données non montrées). Les deux isolats, M20 et M209 différant par la présence de l'IS292 dans le gène *6b*, induisent donc des réponses distinctes au niveau de la morphologie tumorale.

### 3. Comparaison des génotypes 2177/pTi292 et 2177/pTi2177

Les génotypes 2177/pTi292 et 2177/pTi2177 ont été comparés plus précisément au niveau des fonds chromosomiques et des plasmides Ti. Les souches 2177 et X88292 ont été utilisées comme représentant de ces deux génotypes.

#### 3.1 Comparaison des plasmides pTi292 et pTi2177:

Les profils de restriction de la région *tmr530-nos975* du pTi292, obtenus avec les enzymes *DdeI*, *RsaI* et *TaqI*, ont été comparés avec ceux des plasmides pTi2177, pTi2516, pTi1903 et pTiM80 identifiés dans les populations d'*Agrobacterium*. Le nombre de bandes communes entre les profils du pTi292 et ceux des quatre autres types de pTi est indiqué dans le tableau 24. Le nombre de bandes communes le plus élevé a été obtenu entre les plasmides pTi2177 et pTi292.

Le séquençage des clones SC.2177.1, KC.292.2, SC.2177.2, KC.292.2 et SC.292.1 a permis de comparer des séquences partielles du T-DNA des plasmides pTi292 et pTi2177. La zone analysée est située en aval du site d'insertion. Elle comporte les 155 premiers nucléotides du gène *6b* et 254 nucléotides de l'espace intergénique entre les gènes *6b* et *nos* en amont du site *Clal* (figure 14 de la partie matériel et méthodes). Une similitude de 99,5% a été mise en évidence entre les séquences des deux types de pTi, ce qui correspond à une différence de deux nucléotides sur les 409 nucléotides lus (figure 45). Il faut noter que ce résultat est à confirmer étant donné qu'il correspond à une lecture sur un seul brin.

Cette étude comparative montre que la différence majeure détectée entre les plasmides pTi292 et pTi2177, associés aux ribotype 2177, est la présence d'un élément d'insertion dans le gène *6b* du pTi292.

#### 3.2 Comparaison des fonds chromosomiques 2177 associés aux plasmides pTi2177 et pTi292

Le type chromosomique 2177 a été caractérisé par la sérologie (sérotype 1a) et par la méthode de RFLP dans un premier temps (Nesme *et al.* 1987), puis par les profils de restriction de

	<i>Dde</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Rsa</i> I	total
pTi2177	11	7	5	23
pTi2516	10	5	5	20
pTi1903	10	7	5	22
pTiM80	9	5	5	19

Tableau 24. Nombre de bandes communes entre les profils de la région *tmr530-nos975* du pTi292 par rapport aux autres types de plamides Ti.

la région 16S8-23S132 (avec les enzymes *TaqI*, *HaeIII*, *CfoI* et *NdeII*) (cf Partie III). Une analyse plus approfondie des fonds chromosomiques 2177 associés aux plasmides pTi2177 et pTi292 a été réalisée par PCR-RFLP sur les souches types 2177 et X88292. Les profils de restriction de la région 16S8-23S132 obtenus avec 14 enzymes (*AluI*, *BstBUI*, *CfoI*, *HaeIII*, *HpaII*, *NdeII*, *NlaIII*, *RsaI*, *TaqI*, *ApyI*, *AvaII*, *DdeI*, *NciI*, *Sau96I*) ont été comparés. Aucune différence entre les profils ribosomiques de ces deux souches n'a pu être décelée pour chacun des enzymes testés (non montré).

Sur la base du polymorphisme de la région intergénique entre les gènes 16S et 23S, les fonds chromosomiques auxquels sont associés les plasmides pTi292 et pTi2177 semblent très proches sinon identiques.

### Conclusion:

La seule différence décelée entre les génotypes des souches 2177 et X88 292 est la présence d'un élément d'insertion dans le gène *6b* du pTi292 de la souche X88 292.

## 4. Recherche de l'IS292 dans les populations naturelles d'*Agrobacterium*

La présence de séquences homologues à l'IS292 a été recherchée dans les isolats représentatifs des différents génotypes d'*Agrobacterium* détectés dans les deux pépinières, afin de travailler sur un échantillon représentatif des populations étudiées. Cette recherche a été réalisée par amplification et/ou par hybridation sur l'ADN génomique total des isolats d'*Agrobacterium*. L'utilisation de l'amorce FGPis292 spécifique des extrémités de l'IS292 permet la synthèse d'un fragment de 2,5kb par réaction d'amplification. Les réactions d'hybridation ont été effectuées avec le fragment *SalI/SacII* du clone pSC.292.5 contenant l'insertion comme sonde. Cette approche donne une réponse en terme de présence ou d'absence de séquences de type IS292 dans le génome testé, sans localisation. La présence des séquences de type IS292 parmi les génotypes testés est donnée dans le tableau 25.

Un ensemble de 23 isolats de ribotype 2177 issus des populations d'Orléans et de Peyrat (cf Partie IV) a été testé quant à la présence de l'élément d'insertion IS292. Ces isolats contenaient soit un pTi2177 (15), soit un pTi indéterminé (5), soit un pTi292 (3). Dans tous les cas un signal d'hybridation a été obtenu sur ADN total, même dans le cas de l'isolat M74 non tumorigène. Ces souches contiennent donc une séquence homologue à l'IS292, mais à une localisation différente non déterminée. Si l'absence de formation de tumeur par l'isolat M74 est due à l'absence du pTi, ce résultat semblerait indiquer que une ou des copies homologues à l'IS292 pourraient être présentes sur le chromosome ou sur un plasmide autre que le pTi.

Des signaux d'amplification et d'hybridation ont été obtenus pour des isolats provenant soit de la pépinière d'Orléans, soit de la pépinière de Peyrat. L'IS292 était donc présente dans certains des isolats de la pépinière d'Orléans. Par contre, l'IS292 n'a jamais été détectée dans

Isolats	(a)	PCR <sup>(b)</sup>	Ribotype	Type pTi	Présence IS292		Origine
					Sonde	PCR	
(A) Isolats de biovar1							
2177	+	+	2177	2177	+	+	ORL 2A
85 2	+	+	2177	2177	+	+	ORL 2A
85 9	+	+	2177	2177	+	-	ORL 2A
85 3	+	+	85 3	2516	+	-	ORL 2A
85 46	+	+	85 46	2516	+	-	ORL 2A
85 104	+	+	85 104	2516	+	+	ORL 2A
2516	+	+	2516	2516	+	+	ORL 2A
2517	+	+	2517	2516	+	+	ORL 2A
2518	-	-	2518	nd	+/-	-	ORL 2A
M10	nt	+	M9	2516	+	+	PEY 2A
M15	+	+	M15	1903	-	-	PEY 2A
M292	+	+	M292	M80	+	+	PEY 2A
M74	-	-	2177	nd	+	+	PEY 2A
M146	nt	-	2177	nd	+	-	PEY 2A
M182	-	-	M182	nd	-	-	PEY 2A
X88 292	+	+	2177	292	+	+	PEY JT
X88 315	nt	+	2177	2177	+	nt	PEY JT
X88 308	nt	-	2177	nd	+	nt	PEY JT
X88 309	nt	+	2516	M80	nt	+	PEY JT
B100 11	nt	+	B100 11	1903	+/-	-	PEY VP
A134 5	nt	+	A134 5	1903	-	-	PEY VP
A68 18	nt	+	A68 18	2516	+/-	-	PEY VP
A68 20	nt	+	A68 20	M80	+/-	-	PEY VP
B89 11	nt	-	B89 11	nd	-	-	PEY VP
B113 3	nt	-	B113 3	nd	-	-	PEY VP
C91 54	nt	-	S1	nd	+/-	-	PEY SOL
C91 58	nt	-	S2	nd	-	-	PEY SOL
C91 5	nt	-	S7	nd	-	nt	PEY SOL
C91 6	nt	-	S8	nd	-	nt	PEY SOL
C91 9	nt	-	S3	nd	-	nt	PEY SOL
C91 76	nt	-	S11	nd	-	nt	PEY SOL
(B) Isolats de biovar2							
85 30	+	+	85 30	2516	nt	(1)	ORL 2A
2520	-	-	2520	nd	nt	-	ORL 2A
85 110	+	+	85 110	2516	nt	-	ORL 2A
85 178	-	-	85 178	nd	nt	(2)	ORL 2A
2178	+	+	2178	nd	nt	-	ORL 2A
M29	+	+	M29	M80	nt	+	PEY 2A
(C) Souches de référence							
C58	+	+	C58	1903	nt	-	
C58C1	-	-	C58	-	nt	-	
1896	+	+	C58	T37	nt	-	
1901	+	+	C58	T37	nt	-	

Tableau 25. Détection de séquences de type IS292 dans les différents génotypes d'*Agrobacterium* composant les populations étudiées.

(a): pouvoir pathogène, (b): amplification de la région *tmr530-nos975*, (A) et (B): isolats des populations d'Orléans et de Peyrat, (C): souches de collection.

Les réactions d'amplification (amorce FGPis292) ou d'hybridation positives ou négatives sont indiquées par (+) ou (-), nt: non testé, nd: non déterminé, +/-: signal faible, (1): produits d'amplification atypiques de 3000 et 1000pb, (2): produit d'amplification atypique de 1500pb.

le gène *6b* des isolats d'Orléans, comme le montre l'uniformité de la taille de leurs fragments *tmr530-nos975*. La présence de l'IS292 n'est donc pas spécifique aux génomes composant les populations d'*Agrobacterium* de la pépinière de Peyrat.

Parmi les 31 isolats de génotypes variés et appartenant au biovar1, 15 ont révélé la présence de l'insertion par un signal d'hybridation intense, et 3 par un signal faible (parmi eux, 10 ont donné un produit d'amplification de 2,5kb). Ceci correspond à une fréquence de présence de l'élément d'insertion d'environ 58% au sein des populations de biovar1 des deux pépinières étudiées. L'IS292 n'est donc pas spécifiquement associée aux isolats de génotype 2177.

Parmi les cinq isolats de biovar2 testés, un seul a abouti à la formation du fragment de 2,5kb attendu, et deux ont donné des fragments de tailles différentes par réaction d'amplification. Les deux isolats restants n'ont donné aucun signal d'amplification. L'IS292 n'est donc pas spécifique aux isolats appartenant au biovar1. Elle est présente dans le génome des deux espèces d'*Agrobacterium* composant les populations analysées.

Aucun signal d'amplification n'a été obtenu à partir de l'ADN des quatre souches de référence à nopaline testées. De même, aucun des ADN des six isolats provenant du sol de la pépinière de Peyrat n'a donné de réaction positive en hybridation, excepté pour l'isolat C91 54 avec un signal de faible intensité.

#### **Conclusion:**

L'élément d'insertion IS292 n'est pas spécifique au gène *6b* des plasmides Ti de type 292. Il semble assez bien répandu dans les isolats à nopaline des populations des biovars 1 des deux pépinières testées.

### 1. IS292: un nouvel élément d'insertion associé au genre *Agrobacterium*

L'analyse des plasmides Ti des populations d'*Agrobacterium* a révélé l'existence d'un nouvel élément d'insertion associé au genre *Agrobacterium*, l'IS292. L'analyse de la séquence nucléotidique de cet élément a permis de déterminer sa structure. Cet élément d'insertion de 2494nt comporte les caractéristiques communes aux autres séquences d'insertion détectées chez les bactéries (Calos et Miller 1980). En effet, les extrémités de l'IS292 sont constituées de répétitions inversées de 21nt, spécifiques de l'insertion. De plus, une courte séquence de 10nt, répétée de façon directe de part et d'autre de l'IS292, constitue son site d'insertion. Nous avons mis en évidence la présence de 8 ORFs principaux, comprenant de 345 à 687 acides aminés. Une séquence analogue au motif de Shine et Dalgarno (1974) est présente en amont des ORF4, ORF5 et ORF8. Cependant, aucun de ces ORFs ne possède un degré de similitude significatif avec une séquence de transposase. De même, la séquence de l'IS292, prise dans son ensemble, ne comporte qu'une faible homologie avec le gène de transposase *tnpA* du transposon Tn21. Cette absence d'homologie significative avec une séquence de transposase connue a également été signalée pour d'autres éléments d'insertion décrits dans diverses souches d'*Agrobacterium* (De Meirsmen *et al.* 1989, Machida *et al.* 1984). Cette observation pose la question de l'activité de l'insertion. On peut supposer qu'il peut s'agir d'une transposase particulière ou que le processus soit réalisé par un ensemble d'enzymes. La comparaison de la séquence nucléotidique de l'IS292 avec celles des autres séquences d'insertion inscrites dans la base de données GenBank n'a révélé aucune homologie permettant de conclure sur une identité. Cette analyse structurale de l'insertion nous a permis de montrer que l'IS292 est un nouvel élément d'insertion associé au genre *Agrobacterium*.

Les études portant sur les éléments d'insertion associés à un genre bactérien ont montré qu'ils peuvent être regroupés en familles (Bisercic et Ochman 1993a, 1993b, Hofman *et al.* 1986, Lawrence *et al.* 1992, Rezsöházy *et al.* 1993), définies comme un ensemble d'éléments d'insertion présentant une certaine analogie. Les critères de comparaison pris en compte sont la taille et la séquence nucléotidique de l'élément, la taille du site d'insertion, ainsi que la taille et la séquence des extrémités (Lawrence *et al.* 1992). Pour ce qui concerne les éléments d'insertion décrits chez *Agrobacterium*, les données sont le plus souvent reliées à une souche donnée plutôt qu'à un ensemble de souches, excepté dans le cas des souches isolées de la vigne. La séquence nucléotidique de l'IS292 ne présente pas de similitude significative avec les autres séquences d'insertion des souches d'*Agrobacterium*. Toutefois, en considérant uniquement les séquences nucléotidiques des extrémités, il existe une certaine similitude entre l'IS292 et les éléments IS66 de la souche d'*Agrobacterium* A66 à octopine (Machida *et al.* 1984), IS866 de la souche Tm4 à octopine/cucumopine (Bonnard *et al.* 1989b), IS1131 de la souche PO22 à nopaline (Wabiko

1992) et également l'IS $Rm2$  décrite chez *Rhizobium meliloti* (Dusha *et al.* 1987). L'IS292 peut ainsi être considérée comme un nouvel élément de la famille des séquences d'insertion associées aux *Rhizobiacées*, regroupant les éléments IS66, IS866, IS1131, IS292, IS $Rm2$  et IS $R11$ .

## 2. Similitude des IS292 et IS $R11$ décrite chez *Rhizobium leguminosarum*

L'existence d'homologies entre des éléments d'insertion décrits chez *Agrobacterium* et ceux décrits chez d'autres genres bactériens a déjà été montré (Soby *et al.* 1993). Il s'agit pour la plupart, de similitudes sur une zone plus ou moins restreinte de l'insertion. Nous avons montré une forte analogie entre l'IS292 et l'IS $R11$  de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Ces deux éléments ont la particularité d'être de taille identique et de posséder un degré d'homologie nucléotidique de 80% avec des sites d'insertion de tailles semblables. De plus, trois ORF sont conservés suggérant leur importance fonctionnelle. L'analyse fait apparaître que l'IS292 présente un degré de similitude supérieur vis-à-vis de IS $R11$  que des autres éléments décrits chez *Agrobacterium*.

La similitude existant entre l'IS292 et l'IS $R11$  de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* peut s'expliquer, soit par une co-évolution de ces deux éléments avec leur génome-hôte, soit par un transfert de matériel génétique entre *Agrobacterium* et *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Dans ce cas, la séquence d'insertion "ancêtre" aurait ensuite évolué parallèlement au génome-hôte avec lequel elle s'est retrouvée associée. De nombreuses séquences d'insertion semblent avoir co-évolué avec leur génome-hôte, et peuvent donc être considérées comme spécifiques de celui-ci (Lawrence *et al.* 1992). Cette caractéristique en font une cible intéressante pour la détection et la caractérisation des micro-organismes (Van der Zee *et al.* 1993). Cependant, Wheatcroft et Laberge (1991) indiquent que la notion de spécificité IS/génome n'est pas évidente étant donné que ce type d'élément peut être disséminé entre les génomes. Afin d'éclaircir ce point en ce qui concerne les IS292 et IS $R11$ , nous avons comparé le degré de similitude existant, d'une part entre les deux éléments d'insertion, et d'autre part entre chaque élément et son génome hôte. Deux approches ont été envisagées: le degré de similitude des séquences du gène 16S et celui des séquences nucléotidiques des deux éléments d'insertion (Bisercic *et al.* 1993a), et le pourcentage en bases guanine et cytosine (%GC) (Wheatcroft et Laberge 1991). Cette analyse indique que les deux insertions étudiées sont plus conservées que le gène 16S, et que le pourcentage en bases des genres *Agrobacterium* et *Rhizobium* et de leurs séquences d'insertion respectives n'est pas significativement différent. Les genres *Agrobacterium* et *Rhizobium* étant trop proches phylogénétiquement, les deux critères utilisés ne sont pas suffisamment discriminants. Cependant, Lawrence *et al.* (1992) suggèrent que le fait que la séquence d'un élément d'insertion soit plus conservée que celle des gènes chromosomiques de leur hôte indique une arrivée récente de l'insertion dans le génome. D'autre part, le fait que l'IS292 soit plus proche de l'IS $R11$  que des autres insertions associées à *Agrobacterium* favorise l'hypothèse



de transfert, qui plus est de *Rhizobium* vers *Agrobacterium*. Cependant, les travaux concernant les éléments d'insertion associés à *Rhizobium leguminosarum* ne font que débiter, il est donc difficile à l'heure actuelle de comprendre les relations phylétiques entre les éléments IS292 et ISR11, et la chronologie de leur établissement dans leur hôte respectif.

### 3. Conséquences de la présence de l'IS292 sur le pouvoir tumorigène

L'IS292 a été détectée initialement dans le gène *6b* du T-DNA des plasmides pTi292. Les conséquences des mutations par insertion peuvent être variées, étant donné qu'une séquence d'insertion transpose de façon apparemment aléatoire sur une molécule d'ADN. Lorsque l'insertion se produit à l'intérieur d'un gène, elle aboutit dans la majorité des cas à l'inactivation de celui-ci (Wabiko *et al.* 1991). De telles mutations peuvent entraîner une modification du phénotype de la souche mutante comme il l'a été montré pour la souche A66 (mutant naturel de A6) comportant plusieurs copies de l'IS66 (Binns *et al.* 1982, Machida *et al.* 1984). La localisation de l'insertion IS292 dans un oncogène nous a conduit à vérifier son effet sur le processus tumorigène. Il est en effet peu probable que le gène *6b* conserve son activité avec un supplément de 2,5kb comportant un codon stop près de son extrémité droite. Nous avons montré que la mutation du gène *6b* provoquée par la présence de l'IS292 n'empêche pas le processus tumoral. Cependant, la présence de l'IS292 dans le gène *6b* altère le phénotype tumoral en induisant plus rapidement le développement de tumeurs de taille supérieure à celles induites par la souche non mutée. Il serait cependant nécessaire de vérifier les autres différences existant éventuellement entre les deux isolats testés. Tinland *et al.* (1989, 1990) ont précisé le rôle du gène *6b* en comparant l'action des gènes *rol* du pRi à celle du gène *6b*. Ces auteurs concluent que le gène *6b* n'augmente pas la concentration en IAA (Indol Acetic Acid), mais qu'il rend les cellules moins sensibles à ce composé. Son rôle serait ainsi celui d'un anti-inhibiteur de la croissance via les auxines. Ce mécanisme pourrait augmenter les chances de formation de tumeurs en augmentant le nombre de cellules capables de répondre à la production d'hormone par le T-DNA. De même, Berres *et al.* (1992) stipulent que le gène *6b* a un rôle de stimulation du développement cellulaire. Cette explication est en accord avec l'observation de l'augmentation de la taille des tumeurs induites par la souche portant un gène *6b* défectueux.

D'autre part, la morphologie des tumeurs induites sur peuplier par l'isolat M209 évolue vers un type bourgeonnant ("shooty") de façon semblable à celles induites par la souche 82.139 (Brasileiro *et al.* 1991). Brasileiro (Thèse) a analysé l'organisation du plasmide Ti présent dans cette souche, et a montré une organisation particulière du locus *tml* comportant une délétion du gène *6a* et un gène *6b* non conservé comparé à celui de la souche C58. La souche 82.139 présente des capacités de transformation du peuplier dues à l'organisation génétique de cette région du T-DNA encadrant les gènes *tmr* et *nos* (Brasileiro *et al.* 1991). Cette étude a mis en évidence d'autres souches susceptibles de posséder ces mêmes propriétés.

Lors de l'étude de la structure des populations d'*Agrobacterium*, nous avons remarqué l'association préférentielle du ribotype 2177 avec les plasmides pTi2177 et pTi292. Le plasmide pTi292 se caractérise par la présence de l'IS292 dans le gène *6b*. Ces observations nous ont conduit à rechercher l'origine de la présence de l'IS292 dans le gène *6b* de ces plasmides Ti, et à replacer ces données dans le contexte de l'étude de la structure et de la stabilité des populations naturelles d'*Agrobacterium*.

L'association entre le type chromosomique 2177 et les plasmides pTi2177 et pTi292 semble fortement spécifique. En effet, le type chromosomique 2177 n'a été retrouvé associé qu'à ces deux types de plasmide Ti dans les différentes populations analysées. De même, les plasmides pTi2177 et pTi292 ont été identifiés uniquement dans les isolats de ribotype 2177. De plus, parmi les populations étudiées on remarque que les variations d'effectifs des deux types de pTi évoluent conjointement. Afin de préciser les relations existant entre les génotypes 2177/pTi2177 et 2177/pTi292, une comparaison a été réalisée au niveau des chromosomes et des plasmides Ti. La différence majeure détectée entre les génotypes 2177/pTi2177 et 2177/pTi292 étant la présence de l'IS292 dans le gène *6b* du pTi292, ces deux génotypes semblent très proches. Nous avons ensuite cherché l'origine de l'IS292 en recherchant sa présence dans les différents génotypes caractérisés dans les populations analysées. Les isolats de type 2177 hébergeant un pTi2177 contiennent l'IS292, hors du gène *6b*. Sur la base de ces observations, nous avons émis l'hypothèse qu'un événement de transposition intragénomique de l'IS292 dans le gène *6b* du pTi2177 serait à l'origine de l'apparition du pTi292 dans cette population d'*Agrobacterium*. Le génotype 2177/pTi2177 correspond donc certainement au génotype ancestral ayant subi une ou des modifications via l'activité de l'élément d'insertion IS292.

Les plasmides pTi292 sont spécifiques des populations échantillonnées dans la pépinière de Peyrat. Les explications qui peuvent être avancées à ce sujet sont uniquement spéculatives par manque de données suffisantes. L'événement de transposition dans le gène *6b* pourrait avoir eu lieu avant le passage entre les deux pépinières, dans ce cas le pTi292 n'aurait pas pu être détecté à Orléans dû à son faible effectif, mais aurait cependant été transmis par les boutures de peuplier. Il peut également s'agir d'un événement récent de la pépinière de Peyrat. Or, la transposition d'éléments mobiles peut être favorisée par des composés, tels que l'acétosyringone (Fortin *et al.* 1993), impliqués dans le processus infectieux. Nous pouvons supposer que des modifications des génomes d'*Agrobacterium* impliquant des éléments d'insertion puissent avoir lieu au moment de l'infection, dans les populations rhizosphériques.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux de Wabiko (1992), qui a suggéré la transposition de l'IS1131 dans une souche de biovar 1 à nopaline isolée de peuplier. Cet élément d'insertion IS1131 est assez bien réparti dans différentes souches à nopaline pathogènes ou non, d'origines variées et issues de diverses plantes-hôte. Cependant, l'IS1131 est distincte de l'IS292 de par sa taille et sa séquence, bien qu'une similarité au niveau des extrémités soit remarquable. D'autre part, l'ensemble des travaux sur la distribution d'éléments d'insertion dans les souches

d'*Agrobacterium* isolées de la vigne (Bonnard *et al.* 1989a, Paulus *et al.* 1989a, 1989b, 1991a, 1991b) a permis d'établir les relations existant entre les souches d'*A. vitis* appartenant à un même schéma évolutif. Actuellement ce groupe de souches constitue un modèle particulier pour l'étude de l'évolution des plasmides Ti via l'activité d'éléments d'insertion, mais pourra sans doute être étendu à d'autres types de souches comme les souches à nopaline.

L'étude des populations d'*Agrobacterium* (Partie V) a montré que les fréquences des génotypes comportant les plasmides pTi2177 ou pTi292 varient selon la population analysée. Le pTi2177, majoritaire dans la population issue de la pépinière d'Orléans, n'a pas été détecté après un passage par le sol de la pépinière de Peyrat (dans la population issue des vitroplants). Inversement, le plasmide pTi292, absent dans la population d'Orléans correspond à un des types majoritaires dans cette population ayant été en contact avec le sol. **Par conséquent, la présence de l'insertion dans le gène *6b* n'est pas défavorable à la multiplication des isolats contenant un pTi292.**

Dans la plupart des cas, les insertions décrites chez *Agrobacterium* sont présentes sur le chromosome et/ou le plasmide Ti. De façon générale, le génôme d'*Agrobacterium* semble comporter un nombre limité de copies d'une même insertion. Pour ce qui concerne les autres *Rhizobiacées*, le nombre de copies est faible pour *R. leguminosarum* (S. Mazurier, communication personnelle), et beaucoup plus important pour *R. meliloti* (Hartmann et Amarger 1991) et *Bradyrhizobium* (Kaluza *et al.* 1985). La présence de nombreuses séquences d'insertion peut engendrer des modifications génotypiques. Bien qu'un phénomène de transposition semble avoir eu lieu dans les populations d'*Agrobacterium* étudiées, nous n'avons aucune connaissance en ce qui concerne la fréquence de transposition de l'IS292. La question est de savoir si il s'agit d'un événement rare, auquel cas l'influence en terme de modifications génomiques serait moindre, ou si la fréquence de ce processus pourrait avoir des conséquences sur l'organisation des génomes et des plasmides Ti. Cet aspect pourrait être vérifié par une évaluation du nombre de copies de l'élément et de la stabilité de leur distribution dans les différents génotypes d'*Agrobacterium* au niveau des chromosomes et des plasmides Ti. D'autre part, les systèmes de piégeage d'éléments d'insertion (Gay *et al.* 1985, Simon *et al.* 1991) pourraient permettre de savoir si d'autres classes d'insertion sont présentes dans ces mêmes génotypes. Nous avons pu montrer que des séquences homologues à l'IS292 sont présentes dans de nombreux isolats d'*Agrobacterium* provenant des deux pépinières. **Cette donnée suppose une dissémination importante de cet élément et conforte l'hypothèse d'échanges de matériel génétique par transfert de plasmides Ti au sein des populations naturelles d'*Agrobacterium*.**

L'origine supposée de l'IS292 est la pépinière d'Orléans étant donné sa présence dans les isolats provenant de cette pépinière. La présence de l'IS292 dans la plupart des génotypes d'*Agrobacterium* analysés permet d'envisager son utilisation comme marqueur des génotypes impliqués dans l'épidémie de crown gall étudiée. Cette approche suppose cependant de vérifier l'absence de cet élément dans la population du sol de Peyrat et dans des souches de collection d'origines variées.

## CONCLUSION

L'analyse du T-DNA des plasmides Ti à nopaline des populations étudiées a révélé l'existence d'un nouvel élément d'insertion associé au genre *Agrobacterium*, l'IS292. Sur la base des similitudes de séquence et de taille, cet élément s'est avéré nettement plus proche de l'ISR11 décrit chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* que des séquences d'insertion associées à *Agrobacterium*. Les deux éléments IS292 et ISR11 sont donc placés dans une même famille d'éléments d'insertion associés aux *Rhizobiacées*. L'homologie importante entre ces deux éléments soulève la question de la propagation d'éléments mobiles dans les peuplements bactériens impliquant probablement le transfert via les plasmides conjugatifs.

La comparaison des génotypes 2177 suggère qu'un événement de transposition est à l'origine de l'apparition du pTi292 dans les populations d'*Agrobacterium* de la pépinière de Peyrat. La fréquence relative des isolats hébergeant un plasmide pTi2177 ou pTi292 dans les différentes populations analysées suggère que ce phénomène aurait entraîné une modification de la structure de la population plasmidique, en faveur des plasmides pTi292. Etant donné que des séquences homologues à l'IS292 sont largement répandues dans les génotypes d'*Agrobacterium* des deux pépinières étudiées, il est possible que ce processus de transposition ne soit pas rare. La dissémination de l'IS292 dans les populations d'*Agrobacterium* étudiées pourrait être lié au transfert conjugatif, ce qui renforce l'hypothèse du mode de prolifération "horizontal" des plasmides Ti. Une étude plus précise permettant d'appréhender le nombre et la répartition d'éventuelles copies de l'IS292 au sein des génomes identifiés dans les deux pépinières pourrait permettre de confirmer cette hypothèse. Une utilisation potentielle de ce type d'élément pourrait être envisagée en tant que marqueur épidémiologique des génotypes en cause dans le crown gall du peuplier.

## CONCLUSION GENERALE

## CONCLUSION GENERALE

Dans cette étude, nous avons abordé un aspect de l'écologie d'*Agrobacterium* concernant l'adaptation des souches tumorigènes dans le sol. Le maintien de la capacité tumorigène d'un sol implique des relations entre, les populations tumorigènes introduites lors d'épidémies de crown gall, et les populations indigènes du sol. Deux alternatives à l'adaptation des souches d'*Agrobacterium* tumorigènes sont envisageables: la survie dans le sol des souches tumorigènes introduites, et le transfert des plasmides Ti à la population indigène du sol. Cette question a été appréhendée par l'étude des populations d'*Agrobacterium* en cause dans le modèle épidémiologique du crown gall du peuplier.

Dans le cadre de cette étude, il est tout d'abord apparu nécessaire de comprendre comment sont structurées les populations naturelles d'*Agrobacterium*, en considérant les "populations" de plasmides Ti qui leurs sont associées. Parmi les différentes méthodes de caractérisation des souches d'*Agrobacterium* disponibles, aucune n'est réellement adaptée à l'identification des fonds chromosomiques et des plasmides Ti de nombreux isolats. La méthode de PCR-RFLP s'est avérée un outil performant, permettant de révéler la diversité des plasmides Ti et de leurs contextes chromosomiques en cause dans l'épidémie étudiée. Cette étude montre qu'il est possible d'analyser et de comparer les populations d'*Agrobacterium*, simultanément au niveau des chromosomes et des plasmides Ti. La comparaison des génotypes d'*Agrobacterium* a permis de confirmer le lien épidémiologique entre les populations en cause dans le crown gall développé dans les deux pépinières étudiées. Ce lien a été renforcé par la détection d'un élément d'insertion commun aux génotypes d'*Agrobacterium* composant les différentes populations. Ce résultat, indiquant l'ubiquité de cette séquence d'insertion dans les génotypes d'*Agrobacterium* étudiés, permet d'envisager l'utilisation de cet élément comme marqueur des *Agrobacterium* liés au crown gall du peuplier. Bien que cette insertion soit différente de celles décrites dans d'autres souches d'*Agrobacterium*, sa spécificité vis-à-vis des isolats impliqués dans l'épidémie sur peuplier reste à vérifier, en recherchant sa présence dans des souches d'*Agrobacterium* d'origines variées.

L'étude des populations d'*Agrobacterium* tumorales a montré que la tumeur constitue un site privilégié, favorable à la génèse et au maintien de la diversité des génotypes d'*Agrobacterium* tumorigènes. La complexité intratumorale des génotypes d'*Agrobacterium* se manifeste au niveau plasmidique et au niveau chromosomique avec la présence de deux espèces (*A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*) comportant chacune plusieurs ribotypes. Cette diversité s'explique par l'existence d'une population polyclonale tumorigène préexistant antérieurement à la formation de la tumeur, et qui se maintient principalement par voie clonale dans la tumeur. Les transferts de plasmide Ti au sein de cette population, favorisant la diversité à l'intérieur de la tumeur, sont

cependant suggéré par cette étude. La tumeur apparaît alors bien comme un environnement permettant une optimisation de la prolifération des *Agrobacterium* tumorigènes par la présence d'opines favorisant chacun des deux modes d'amplification des plasmides Ti.

La population d'*Agrobacterium* tumorigène contaminante, disséminée à partir des tumeurs vers le sol, est capable de coloniser, de se maintenir et de développer à nouveau la maladie dans un nouvel environnement. La notion de maintien dans le sol peut être envisagée sous trois aspects, en considérant: le taux auxquelles se maintiennent les souches, la disparition de certains génotypes, et les modifications éventuelles des génotypes. Notre étude montre que la stratégie de maintien du pouvoir tumorigène est essentiellement la multiplication clonale des souches introduites (transmission "verticale" des plasmides Ti), avec cependant une contribution probable de la transmission "horizontale" par des transferts de pTi entre les souches d'*Agrobacterium*. Ainsi, nous avons suggéré que certains génotypes d'*Agrobacterium* tumorigènes, majoritaire dans les tumeurs, sont bien adaptés au sol. Néanmoins, leur importance quantitative dans le sol n'est pas connue. La sélection permettant l'adaptation au sol n'est probablement pas identique à celle permettant une adaptation pour le potentiel infectieux. Il est en effet possible que ces *Agrobacterium* survivent à des taux faibles en l'absence de la plante-hôte et que leur sélection se fasse par leurs propriétés de virulence vis-à-vis de la plante. Une étude de la population des agrobactéries présentes dans le sol contaminé de Peyrat permettrait d'approfondir ce point. Une approche quantitative par dénombrement donnerait une estimation de la proportion des *Agrobacterium* tumorigènes et non tumorigènes dans cet environnement, dont l'évolution devrait être suivie au cours du temps. Une analyse qualitative visant à identifier les génotypes permettrait de connaître leurs abondances relatives dans ce sol, comparées à celles des populations tumorales piégées par la plante.

L'analyse des associations entre les plasmides Ti et leurs contextes chromosomiques nous a permis de suggérer l'existence de transferts de plasmides Ti dans les populations d'*Agrobacterium* dans le sol. Cette hypothèse est cependant limitée par la taille de l'échantillon étant donné la prépondérance de la multiplication clonale. Ce phénomène ne nous a en outre pas permis d'établir une relation entre les fonds chromosomiques des *Agrobacterium* non tumorigènes indigènes du sol, et ceux supposés dériver d'un transfert. Afin de confirmer ce résultat, il serait nécessaire d'augmenter la taille de l'échantillon des *Agrobacterium* isolés du sol. Cette analyse permettrait en outre de rechercher une éventuelle spécialisation de certains fonds chromosomiques à accepter certains types de plasmides Ti. Le déséquilibre de la proportion des *Agrobacterium* tumorigènes par rapport aux *Agrobacterium* non tumorigènes dans les sols pose la question de la stabilité des associations entre les plasmides Ti et leurs contextes chromosomiques dans le sol, environnement sans opine. Sur la base de ces observations, il serait intéressant d'étudier l'évolution de ces populations d'*Agrobacterium* dans sol en fonction du temps, afin de déterminer quelle est la voie prioritaire d'adaptation des génotypes à la vie tellurique à long terme. Cette perspective supposerait d'analyser la population d'*Agrobacterium* présente dans le sol de la

pépinière de Peyrat à l'heure actuelle, c'est-à-dire une dizaine d'année après l'introduction de la population d'*Agrobacterium* tumorigène contaminante. La stabilité des associations pourrait être un paramètre favorisant le maintien des souches tumorigènes. Nous avons effectivement pu remarquer que certaines associations entre un plasmide Ti et un fond chromosomique sont préférentielles. Une des hypothèses expliquant l'instabilité des *Agrobacterium* tumorigènes dans le sol à long terme serait de considérer le plasmide Ti comme une charge pour l'agrobactérie. La présence du plasmide Ti serait alors défavorable à la survie des bactéries l'hébergeant dans un environnement complexe.

D'autre part, des modifications génétiques du plasmide Ti peuvent avoir des implications sur l'adaptabilité des souches d'*Agrobacterium*. Il est en effet envisageable qu'au cours de la vie tellurique des *Agrobacterium*, le plasmide Ti subissent des modifications pouvant aboutir à un plasmide Ti désarmé incapable d'induire le processus tumoral. Le rôle d'événements de transposition d'éléments d'insertion sur la variabilité des plasmides Ti a été soulevé dans notre étude par la mise en évidence de l'IS292 dans un type particulier de plasmides Ti. La persistance des isolats hébergeant ce type de plasmide Ti, dans les populations d'*Agrobacterium* après un passage par le sol, pose la question de la relation entre la variabilité due à la présence d'éléments d'insertion et la survie dans le sol. Cette hypothèse serait à confirmer en comparant la survie de la souche hébergeant le pTi292 muté par insertion de l'IS292, par rapport à celle de la souche native, par un test de co-inoculation dans le sol. Les relations existant entre ces deux génotypes seront à préciser en recherchant d'autres différences.

La présence d'éléments d'insertion est un facteur de variabilité des génomes, notamment des plasmides Ti. La transposition de ces éléments pourraient avoir ainsi un rôle dans l'adaptation et l'évolution des *Agrobacterium* et des plasmides Ti. La présence de l'IS292 dans la plupart des génotypes identifiés dans les populations analysées suggère l'importance de ce type d'élément sur la stabilité des génomes d'*Agrobacterium* et favorise l'hypothèse de transferts de plasmides Ti dans cette population. Les éléments d'insertion semblent jouer un rôle important dans le transfert horizontal de matériel génétique et pourrait expliquer la structure en mosaïque des plasmides Ti selon le terme utilisé par Otten *et al.* (1992). La similitude entre les insertions IS292 et ISR11 pose également la question d'échanges de matériel génétique à l'échelle du peuplement bactérien dans le sol entre les genres *Agrobacterium* et *Rhizobium*.

Ce travail offre des perspectives de recherche visant à caractériser plus précisément les interactions entre les populations d'*Agrobacterium* dans le sol en terme d'échange de plasmide Ti. Si l'environnement tumeur est relativement connu, les facteurs qui régissent la stabilité des associations entre les plasmides Ti et leur contexte chromosomique dans le sol restent à déterminer. Ceci suppose d'étudier quelles sont les populations potentiellement donnatrices et receptrices de plasmide Ti. Dans cette optique, il est tout d'abord nécessaire de préciser la distinction entre les souches d'*Agrobacterium* tumorigènes et les souches non tumorigènes. Cette approche nécessite une comparaison approfondie des chromosomes de ces deux types de souches. L'étude d'une population issue du sol d'un site unique permettrait de déterminer si une même souche peut être



présente avec ou sans plasmide Ti, ou si la différence entre les souches tumorigènes et non tumorigènes impliquent d'autres différences au niveau chromosomique. L'étude des transferts de plasmides Ti devra être poursuivie par des approches expérimentales en conditions contrôlées restant cependant proches de la réalité. Une des approches envisageable serait l'introduction d'une souche marquée génétiquement, porteuse d'un plasmide Ti donné, dans un sol contenant des agrobactéries dépourvues de plasmide Ti. Cette approche serait facilitée par l'utilisation d'un système permettant de supprimer l'isolement de la souche donnatrice afin de pouvoir détecter l'événement de transfert par l'analyse des génotypes des *Agrobacterium* de ce sol. Cette orientation des recherches permettra sans doute de préciser l'importance des transferts de plasmides Ti dans les sols et les conditions dans lesquelles il s'effectue.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Akiyoshi, D.E., Regier, D.A., Jen, G., et Gordon, M.P. 1985. Cloning and nucleotide sequence of the *tzs* gene from *Agrobacterium tumefaciens* strain T37. *Nucleic Acids Res.* 13:2773-2788.

Alarçon, B., Lopez, M., Combra, M., et Ortiz, J. 1987. Comparative study of *Agrobacterium* biotypes 1, 2 and 3 by electrophoresis and serological methods. *J. Appl. Bacteriol.* 62:295-308.

Anderson, A.R., et Moore, L.W. 1979. Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology.* 69:320-323.

Arber, W., Humbelin, M., Caspers, P., Reif, H.J., Iida, S., et Meyer, J. 1981. Spontaneous mutations in the *Escherichia coli* prophage P1 and IS-mediated processes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 45:107-113.

Barker, R.F., Idler, K.B., Thompson, D.V., et Kemp, J.D. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Mol. Biol.* 2:335-350.

Barran, L.R., Bromfield, E.P.S., Rastogi, V., Whitwill, S.T., et Wheatcroft, R. 1991. Transposition and copy number of insertion sequence ISRm1 are not correlated with symbiotic performance of *Rhizobium meliloti* from two field sites. *Can. J. Microbiol.* 37:576-579.

Beadsley, R.E. 1955. Phage production by crown gall bacteria and the formation of plant tumors. *Am. Nat.* 89:175-176.

Bell, C.R., et Ramey, W.D. 1991. Hybrid biovars of *Agrobacterium* species isolated from conifer roots. *Can. J. Microbiol.* 37:34-41.

Beltran, P., Musser, J.M., Helmuth, R., Farmer, J.J., Frerichs, W.M., Wachsmuth, I.K., Ferris, K., McWhorter, A.C., Wells, J.G., Cravioto, A., et Selander, R.K. 1988. Toward a population genetic analysis of *Salmonella*: genetic diversity and relationships among strains of serotypes *S. choleraesuis*, *S. derby*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. newport*, and *S. typhimurim*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7753-7757.

Beneddra, T. 1990. Etude de la sensibilité des hybrides *Populus tremula* L x *Populus alba* L à *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn l'agent causal du crown gall. Thèse de l'Institut National de Paris-Grignon. Dec.1990.

Bernaerts, M.J., et De Ley, J. 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature (London)* 197:406-407.

Berres, R., Otten, L., Tinland, B., Malgarini-Clog, E., et Walker, B. 1992. Transformation of *Vitis* tissue by different strains of *Agrobacterium tumefaciens* containing the T-*6b* gene. *Plant Cell Reports* 11:192-195.

Bevan, M., Barnes, W.M., et Chilton, M.D. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Res.* 11:369-385.

Bevan, M., et Chilton, M.D. 1982. T-DNA of the *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids. *Annu. Rev. Genet.* 16:357-384.

Bibb, W.F., Gellin, B.G., Weaver, R., Schwartz, B., Plikaytis, B.D., Reeves, M.W., Pinner, R.W., et Broome, C.V. 1990. Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2133-2141.

Binns, A.N., Sciaky, D., et Wood, H.N. 1982. Variation in hormone autonomy and regenerative potential of cells transformed by strain A66 of *Agrobacterium tumefaciens*. Cell 31:605-612.

Bisercic, M., et Ochman, H. 1993a. Natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* harbor the same classes of insertion sequences. Genetics 133:449-454.

Bisercic, M., et Ochman, H. 1993b. The ancestry of insertion sequences common to *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 175:7863-7868.

Bishop, A.L., Katz, B.H., et Burr, T.J. 1988. Infection of grapevines by soilborne *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and population dynamics in host and nonhost rhizospheres. Phytopathology 78:945-948.

Boerlin, P., et Piffaretti, J.C. 1991. Typing of human, animal, food and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 57:1624-1629.

Bonnard, G., Tinland, B., Paulus, F., Szegedi, E., et Otten, L. 1989a. Nucleotide sequence, evolutionary origin and biological role of a rearranged cytokinin gene isolated from the wide host range biotype III *Agrobacterium* strains. Mol. Gen. Genet. 216:428-438.

Bonnard, G., Vincent, F., et Otten, L. 1989b. Sequence and distribution of IS866, a novel T-region-associated insertion sequence from *Agrobacterium tumefaciens*. Plasmid 22:70-81.

Bonnard, G., Vincent, F., et Otten, L. 1991. Sequence of the *Agrobacterium tumefaciens* biotype III auxin genes. Plant Mol. Biol. 16:730-738.

Bouzar, H., et Moore, L.W. 1987a. Isolation of different *Agrobacterium* biovars from a natural oak savanna and tallgrass prairie. Appl. Environ. Microbiol. 53:717-721.

Bouzar, H., et Moore, L.W. 1987b. Complementary methodologies to identify specific *Agrobacterium* strains. Appl. Environ. Microbiol. 53:2660-2665.

Bouzar, H., Ouadah, D., Krimi, Z., Jones, J.B., Trovato, M., Petit, A., et Dessaux, Y. 1993. Correlative association between resident plasmids and the host chromosome in a diverse *Agrobacterium* soil population. Appl. Environ. Microbiol. 59:1310-1317.

Bouzar, H. 1994. Letter to the editor: request for a judicial opinion concerning the type species of *Agrobacterium*. Int. J. Sys. Bacteriol. 44:373-374.

Barbault, R. 1981. Ecologie des populations et des peuplements. pp. 3-17 Masson.

Brasileiro, A.C.M., Leplé, J.C., Muzzin, J., Ounnoughi, D., Michel, M.F., et Jouanin, L. 1991. An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type *Agrobacterium* strains. Plant Mol. Biol. 17:441-452.

Brasileiro, A.C.M. 1992. Caractérisation de la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* 82.139 et son utilisation pour la transformation génétique du peuplier (*Populus x canescens*). Thèse de l'Université Paris-Sud, centre d'Orsay. 4 février 1992.

Brisbane, P.G., et Kerr, A. 1983. Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. J. Appl. Bacteriol. 54:425-431.

Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D., et Noller, H.F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 148:107-127.

Brunel, B., Cleyet-Marel, J.C., Normand, P., et Bardin, R. 1988. Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. Appl. Environ. Microbiol. 54:2636-2642.

Buchholz, W.G., et Thomashow, M.F. 1984. Comparison of T-DNA oncogene complements of *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmids with limited and wide host range. J. Bacteriol. 160:319-326.

Burr, T.J., Katz, B.H., et Bishop, A.L. 1986. Populations of *Agrobacterium* in vineyard and non vineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. Plant Dis. 71:617-620.

Burr, T.J., Ophel; K., Katz, B.H., et Kerr, A. 1989. Effect of hot water treatment on systemic *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in dormant grape cuttings. Plant Dis. 73:242-245.

Calos, M.P., et Miller, J.P. 1980. Transposable elements. Cell 20:579-596.

Campbell, A. 1981. Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 35:55-83.

Chardenon, J. 1982. Le peuplier aujourd'hui et demain. Institut pour le développement Forestier, France. pp. 279.

Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merlo, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P., et Nester, E.W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell 11:263-271.

Chilton, M.D., Montoya, A.L., Merlo, D.J., Drummond, M.H., Nutter, R., Gordon, M.P., et Nester, E.W. 1978. Restriction endonuclease mapping of a plasmid that confers oncogenicity upon *Agrobacterium tumefaciens* strain B6-806. Plasmid 1:254-269.

Clifford, H.T., et Stephenson, W. 1975. An introduction to numerical classification. Academic Press, London.

Cochran, L. 1941. A case of the crown gall organism persistent in grain land. Plant Dis. Rep. 25:73.

Collin, E. 1982. Les peupliers grisards. CEMAGREF, Nogent sur Vernisson, pp. 66.

Conn. 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. J. Bacteriol. 44:1424-1427.

Cubeta, M.A., Echeti, E., Abernethy, T., et Vilgalys, R. 1991. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. Phytopathology 81:1395-1400.

Currier, T.C., et Nester, E.W. 1976. Evidence for diverse types of large plasmids in tumor-inducing strains of *Agrobacterium*. J. Bacteriol. 126:157-165.

Daget, J. 1976. Les modèles mathématiques en écologie, pp. 9-27 Masson, Paris.

De Cleene, M., et De Ley, J. 1976. The host range of crown gall. Bot. Rev. 42:389-466.

De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., van Montagu, M., et Schell, J. 1982. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene. J. Mol. Appl. Genet. 1:499-511.

De Ley, J., Tigat, R., De Smedt, J., et Michiels, M. 1973. Thermal stability of DNA/DNA hybrids within the genus *Agrobacterium*. J. Gen. Microbiol. 72:242-252.

De Meirsmen, C., Desair, J., Vanderleyden, J., van Gool, A.P., et Jen, G.C. 1987. Similarities between nucleotide sequences of insertion elements of *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* in relation to *Agrobacterium tumefaciens* Tc-DNA. Nucleic Acids Res. 15:10591.

- De Meirsmen, C., Croes, C., Desair, J., Verreth, C., van Gool, A., et Vanderleyden, J. 1989. Identification of insertion element IS427 in pTiT37 plasmid DNA of an *Agrobacterium tumefaciens* T37 isolate. *Plasmid* 21:129-137.
- De Meirsmen, C., van Soom, C., Verreth, C., van Gool, A., et Vanderleyden, J. 1990. Nucleotide sequence analysis of IS427 and its target sites in *Agrobacterium tumefaciens* T37. *Plasmid* 24:227-234.
- Demezas, D.H., et Bottomley, P.J. 1986. Autecology in rhizospheres and nodulating behavior of indigenous *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:1014-1019.
- Demezas, D.H., Reardon, T.B., Watson, J.M., et Gibson, A.H. 1991. Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3489-3495.
- Denny, T.P., Gilmour, M.N., et Selander, R.K. 1988. Genetic diversity and relationships of two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *J. Gen. Microbiol.* 134:1949-1960.
- Depicker, A. van Montagu, M., et Schell, J. 1978. Homologous DNA sequences in different Ti plasmids are essential for oncogenicity. *Nature (London)* 275:150-153.
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambrisky, P., et Goodman, H.M. 1982. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:561-573.
- Dessaux, Y., Petit, A., et Tempé, J. 1992. Opines in *Agrobacterium* biology. pp.109-136. In D.P.S. Verma (ed.), *Molecular signals in plant-microbe communications*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Dhaese, P., De Greve, H., Decraemer, H., Schell, J., et van Montagu, M. 1979. Rapid mapping of transposon insertion and deletion in the large Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acids Res.* 7:1837-1849.
- Dickey, R.S. 1961. Relation of some edaphic factors to *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology.* 51:607-614.
- Doolittle, W.F., et Sapienza, C. 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature (London)* 284:601-607.
- Du Plessis, H.J., van Vuuren, H.J.J., et Hattingh, M.J. 1984. Biotypes and phenotypic groups of *Agrobacterium* in South Africa. *Phytopathology* 74:524-529.
- Dughri, M.H., et Bottomley, P.J. 1983. Effect of acidity on the composition of an indigenous soil population of *Rhizobium trifolii* found in nodules of *Trifolium subterraneum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1207-1213.
- Dusha, I., Kovalenko, S., Banfalvi, Z., et Kondorosi, A. 1987. *Rhizobium meliloti* insertion element ISRM2 and its use for identification of the *fixX* gene. *J. Bacteriol.* 169:1403-1409.
- Dybvig, K. 1993. DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 10:465-471.
- Ellis, J.G., Kerr, A., van Montagu, M., et Schell, J. 1979. *Agrobacterium* genetic studies on agrocin 84 production and the biological control of crown gall. *Physiol. Plant Pathol.* 15:311-319.
- Engler, G., Depicker, A., Maenhout, R., Villarroel, R., van Montagu, M., et Schell, J. 1981. Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and a nopaline Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Mol. Biol.* 152:183-208.

Engler, J.A., et van Bree, M.P. 1981. The nucleotide sequence and protein-coding capability of the transposable element IS5. *Gene* 14:155-163.

Escoubas, J.M., Prère, M.F., Fayet, O., Salvignol, I., Galas, D., Zerbib, D., et Chandler, M. 1991. Translational control of transposition activity of the bacterial insertion sequence IS1. *EMBO J.* 10:705-712.

Ferry, C. 1976. Un test facile pour savoir si la richesse mesurée d'un peuplement se rapproche de sa richesse réelle. *Jean Le Blanc* 15 (1-2) pp.21-28.

Fickett, J.W. 1982. Recognition of protein coding regions in DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 10:5303.

Flores, M., Gonzales, V., Brom, S., Martinez, E., Pinero, D., Romero, D., Davila, G., et Palacios, R. 1987. Reiterated sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.* 169:5782-5788.

Fortin, C., Marquis, C., Nester, E.W., et Dion, P. 1993. Dynamic structure of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. *J. Bacteriol.* 175:4790-4799.

Fortin, C., Nester, E.W., et Dion, P. 1992. Growth inhibition and loss of virulence in cultures of *Agrobacterium tumefaciens* treated with acetosyringone. *J. Bacteriol.* 174:5676-5685.

Gaffney, T.D. et T.G. Lessie. 1987. Insertion-sequence-dependant rearrangements of *Pseudomonas cepacia* plasmid pTGL1. *J. Bacteriol.* 169:224-230.

Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Berkelman, T., et Kado, C.I. 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 164:918-921.

Galas, D.J., et Chandler, M. 1989. Bacterial insertion sequences. In *Mobile DNA*, pp. 109-162. D.E. Berg & M.M. Howe (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Garfinkel, D.J., et Nester, E.W. 1980. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J. Bacteriol.* 144:732-743.

Gauvin, A.R., Harris, E.K., et Walter, H.J. 1956. A statistical evaluation of stream bottom sampling data obtained from three standard samplers. *Ecology.* 37:643-648.

Genetello, C., Van Larebecke, N., Holsters, M., De Picker, A., Van Montagu, M., Schell, J. 1977. Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* as conjugative plasmids. *Nature*, (London) 265:561-563.

Geniaux, E., Laguerre, G., et Amarger, N. 1993. Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Ecol.* 2:295-302.

Gibert, I., Barbe, J., et Casdesus, J. 1990. Distribution of insertion sequence IS200 in *Salmonella* and *Shigella*. *J. Gen. Microbiol.* 136:2555-2560.

Gibson, A.H., Demezas, D.H., Gault, R.R., Bhuvaneeswari, T.V., et Brockwell, J. 1991. Genetic stability in rhizobia in the field. In: *The rhizosphere and plant growth*, D.L. Keister and P.B. Cregan (eds.) pp. 141-148.

Gielen, J., De Beuckeleer, M., Seurinck, J., Deboeck, F., De Greve, H., Lemmers, M., Van Montagu, M., et Schell, J. 1984. The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J.* 3:835-846.

Glandsdorf, N., Charlier, D., et Zafarullah, M. 1980. Activation of gene expression by IS2 and IS3. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 45:153-156.

- Goldberg, S.B., Flick, J.S., et Rogers, S.G. 1984. Nucleotide sequence of the *tmr* locus of *Agrobacterium tumefaciens* pTi T37 DNA. *Nucleic Acids Res.* 12:4665-4677.
- Goodman, R.N., Butrov, D., et Tarbah, F. 1987. The occurrence of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine-propagating materials and a simplified indexing system. *Am. J. Enol. Vitic.* 38:189-193.
- Green, L., Miller, R.D., Dykhuizen, D.E., et Hartl, D.L. 1984. Distribution of DNA insertion element IS5 in natural isolates of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4500-4504.
- Grindley, N.D.F., et Reed, R.R. 1985. Transpositional recombination in procaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 54:863-896.
- Gurtler, V., Wilson, V.A., et Mayall, B.C. 1991. Classification of medically important *Clostridia* using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol.* 137:2673-267.
- Harrison, S.P., Young, J.P.W., et Jones, D.G. 1987. *Rhizobium* population genetics: effect of clover variety and inoculum dilution on the genetic diversity sampled from natural populations. *Plant and Soil.* 103: 147-150.
- Harrison, S.P., Jones, D.G., et Young, J.P.W. 1989. *Rhizobium* population genetics: genetic variation within and between populations from diverse locations. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1061-1069.
- Hartmann, A., et Amarger, N. 1991. Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting, and insertion sequence typing. *Can. J. Microbiol.* 37: 600-608.
- Heberlein, G.T., De Ley, J., et Tijtgat, R. 1967. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of *Agrobacterium*, *Rhizobium*, and *Chromobacterium*. *J. Bacteriol.* 94:116-124.
- Heidekamp, F., Dirkse, W.G., Hille, J., et Van Ormondt, H. 1983. Nucleotide sequence of the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid-encoded *tmr* gene. *Nucleic Acids Res.* 11:6211-6223.
- Higgins, D., et Gouy, M. 1987. Interfacing similarity search software with the sequence retrieval system ACNUC. *Comp. Applic. Biosciences* 3:329-241.
- Hofman, J.D., Schalkwyk, L.C., et Doolittle, W.F. 1986. IS H51: a large degenerate family of insertion-like elements in the genome of the archaebacteria *Halobacterium volcanii*. *Nucleic Acids Res.* 14:6983-7000.
- Holmes, B. 1988. Taxonomy of *Agrobacterium*. *Acta Hortic.* 225:47-52.
- Holmes, B., et Roberts, P. 1981. The classification, identification and nomenclature of *Agrobacterium*. *J. Appl. Bacteriol.* 50:443-467.
- Holsters, M., Silva, B., van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inze, D., Engler, G., Villarroel, R., Van Montagu, M., et Schell, J. 1980. The functional organization of the nopaline *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid* 3:212-230.
- Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T., et Chilton, M.D. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168:1291-1301.
- Huss, B., Bonnard, G., et Otten, L. 1989. Isolation and functional analysis of a set of auxin genes with a low root-inducing activity from an *Agrobacterium tumefaciens* biotype III strain. *Plant. Mol. Biol.* 12:271-283.



Hutcheson, K. 1970. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *J. Theor. Biol.* 29:151-154.

Iida, S., Meyer, J., et Arber, W. 1983. Procaryotic IS elements. In: *Mobile Genetic Elements*, pp. 159-221. JA Shapiro (ed.). Academic Press San Diego CA.

Jamman, S., Fernandez, M.P., et Normand P. 1993. Typing method for N<sub>2</sub>-fixing bacteria based on PCR-RFLP: application to the characterization of *Frankia* strains. *Mol. Ecol.* 2:17-26.

Jamman, S. 1994. Diversité de populations naturelles de *Frankia* infectant les Elaeagnacées. Rôle de facteurs édaphiques. Thèse de l'Université de Lyon. 20 mai 1994.

Jayaswal, R.K., Veluthambi, K., Gelvin, S.B., et Slightom, J.L. 1987. Double-stranded cleavage of T-DNA and generation of single-stranded T-DNA molecules in *Escherichia coli* by a *virD*-encoded border-specific endonuclease from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 169:5035-5045.

Jensen, M.A., Webster, J.A., et Straus, N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:945-952.

Kaluza, K., Hahn, M., et Hennecke, H. 1985. Repeated sequences similar to insertion elements clustered around the *nif* region of the *Rhizobium japonicum* genome. *J. Bacteriol.* 162:535-542.

Keane, P.J., Kerr, A., et New, P.B. 1970. Crown Gall of stone fruit: identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Austr. J. Biol. Sci.* 23:585-595.

Kearney, B., et Staskawicz, B.J. 1990. Characterization of IS476 and its role in bacterial spot disease of tomato and pepper. *J. Bacteriol.* 172:143-148.

Kerr, A., et Panagopoulos, C.G. 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathol. Z.* 90:172-179.

Kerstens, K., et De Ley, J. 1973. Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium* isolates. *J. Gen. Microbiol.* 78:227-239.

Kerstens, K., et De Ley, J. 1984. Genus III. *Agrobacterium* Conn 1942, pp. 244-254. In: N.R. Krieg and J.G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Kingsley, M.T., et Ben Bohloul, B. 1983. Characterization of *Rhizobium* sp. (*Cicer arietinum* L.) by immunofluorescence, immunodiffusion and intrinsic antibiotic resistance. *Can. J. Microbiol.* 29:518-526.

Klee, H., Montoya, A., Horodyski, F., Lichtenstein, C., Garfinkel, D., Fuller, S., Flores, C., Peschon, J., Nester, E., et Gordon, M. 1984. Nucleotide sequence of the *tms* genes of the pTiA6NC octopine Ti plasmid: two gene products involved in plant tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1728-1732.

Knauf, V.C., Panagopoulos, C.G., et Nester, E.W. 1983. Comparison of Ti plasmids from three different biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* isolated from grapevines. *J. Bacteriol.* 153:1535-1542.

Knauf, V., Yanofsky, M., Montoya, A. et Nester, E. 1984. Physical and functional map of an *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid that confer narrow host-range. *J. Bacteriol.* 160:564-568.

Komai, T., Halperin, W., et Nester, E.W. 1986. Physical and functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pTiBo542. J. Bacteriol. 166:88-94.

Kosier, A., Pülher, A., et Simon, R. 1993. Monitoring the diversity of *Rhizobium meliloti* field and microcosm isolates with a novel rapid genotyping method using insertion elements. Mol. Ecol. 2: 35-46.

Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature (London) 178:703.

Krieg, N.R., et Holt, J.G. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1 pp. 252-253. Williams & Wilkins. Baltimore.

Kwok, W.W., Nester, E.W., et Gordon, M.P. 1985. Unusual plasmid DNA organization in an octopine crown gall tumor. Nucleic Acids Res. 13:459-471.

Lam, S., et Roth, J.R. 1983. IS200: a *Salmonella*-specific insertion sequence. Cell 34:951-960.

Lamotte, M., et Bourlière, F. 1969. Problèmes d'écologie: l'échantillonnage des peuplements animaux des milieux terrestres. Masson, pp 8-18.

Lawrence, J.G., Ochman, H., et Hartl, D.L. 1992. The evolution of insertion sequences within enteric bacteria. Genetics. 131:9-20.

Leach, J.E., Rhoads, M.L., Vera Cruz, C.M., White, F.F., Mew, T.W., et Leung, H. 1992. Assessment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with a repetitive DNA element. Appl. Environ. Microbiol. 58:2188-2195.

Leemans, J., Hernalsteens, J.P., Delblaere, R., De Greve, H., Thia-Toong, L., Van Montagu M., et Schell, J. 1983. Genetic analysis of T-DNA and regeneration of transformed plants. In: *Molecular Genetics of Bacteria-Plant Interaction*. Pühler A (ed.). Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 322-330.

Lemmers, M., De Beuckeleer, M., Holsters, M., Zambrisky, P., Depicker, A., Hernalsteens, J.P., Van Montagu, M., et Schell, J. 1980. Internal organization, boundaries and integration of Ti-plasmid DNA in nopaline crown gall tumors. J. Mol. Biol. 144:353-376.

Leroux, B., Yanofsky, M.F., Winans, S.C., Ward, J.E., Ziegler, S.F., et Nester, E.W. 1987. Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant. EMBO J. 6:849-856.

Leung, K., Strain, S.R., De Bruijn, F.J., et Bottomley, P.J. 1994a. Genotypic and phenotypic comparisons of chromosomal types within an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Appl. Environ. Microbiol. 60:416-426.

Leung, K., Wanjage, F.N., et Bottomley, P.J. 1994b. Symbiotic characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates which represent a major and minor nodule-occupying chromosomal types of field-grown subclover (*Trifolium subterraneum* L.). Appl. Environ. Microbiol. 60:427-433.

Leung, K., Yap, K., Dashti, N., et Bottomley, P.J. 1994c. Serological and ecological characteristics of a nodule-dominant serotype from an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Appl. Environ. Microbiol. 60:408-415.

Lewin, B. 1988. Genes. pp. 589-604, Tardy Quercy, Bourges.

Lichtenstein, C., Klee, H., Montoya, A., Garfinkel, D., Fuller, S., Flores, C., Nester, E., et Gordon, M. 1984. Nucleotide sequence and transcript mapping of the *tmr* gene

of the pTiA6NC octopine Ti-plasmid: a bacterial gene involved in plant tumorigenesis. *J. Mol. Appl. Genet.* 2:354-362.

Lipman, D.J., et Pearson, W.R. 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 227:1435-1441.

Lippincott, B.B., et Lippincott, J.A. 1969. Bacterial attachment to a specific wound site as an essential stage in tumor initiation by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 97:620-628.

Lopez, M.M., Gorris, M.T., et Montojo, A.M. 1988. Opine utilization by Spanish isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Pathol.* 37:565-572.

Lupski, J.R., et Weinstock, G.M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174:4525-4529.

Lynch, J.M., et Ebben, M.H. 1986. The use of micro-organisms to control plant disease. *J. Appl. Bacteriol. (Symp. Suppl.):*115S-126S.

Machida, Y., Sakurai, M., Kiyokawa, S., Ubasawa, A., Suzuki, Y., et Ikeda, J. 1984. Nucleotide sequence of the insertion sequence found in the T-DNA region of mutant Ti plasmid pTiA66 and distribution of its homologues in octopine Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7495-7499.

Macrae, S., Thomson, J.A., et Van Staden, J. 1988. Colonization of tomato plants by two agrocin producing strains of *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl. Env. Microbiol.* 54:3133-3137.

Magurran, A. 1988. Ecological diversity and its measurement. University Press, Cambridge.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., et Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor University Press.

Margalef, R. 1972. Homage to Evelyn Hutchinson, or why is there an upper limit to diversity. *Trans. Connect. Acad. Arts Sci.* 44:211-235.

Martinez, E., Romero, D., et Palacios, R. 1990. The *Rhizobium* genome. pp. 59-93. In: *Critical Reviews in Plant Science*.

May, R.M. 1975. Patterns of species abundance and diversity. In: *Ecology and evolution of communities*. M.L. Cody and J.M. Diamond (eds.), Harvard University Press, Cambridge, MA, pp.81-120.

Melchers, L.S., Thompson, D.V., Idler, K.B., Schilperoort, R.A., et Hooykaas, P.J. 1986. Nucleotide sequence of the virulence gene *virG* of the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid: significant homology between *virG* and the regulatory genes *ompR*, *phoB* and *dye* of *E.coli*. *Nucleic Acids Res.* 14:9933-9942.

Melchers, L.S., et Hooykaas, P.J.J. 1987. Virulence of *Agrobacterium*. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.* 4:167-220.

Melchers, L.S., Thompson, D.V., Idler, K.B., Shilperoort, R.A., et Hooykaas, P.J. 1988. Analysis of the complete nucleotide sequence of the *Agrobacterium tumefaciens virB* operon. *Nucleic Acids Res.* 16:4621-4636.

Melchers, L.S., Maroney, M.J., DenBulk-Ras, A., Thompson, D.V., Van Vuuren, H.A., Schilperoort, R.A., et Hooykaas, P.J. 1990. Octopine and nopaline strains of *Agrobacterium tumefaciens* differ in virulence; molecular characterization of the *virF*-locus. *Plant Mol. Biol.* 14:249-259.

Michel, M.F., Nesme, X., et Digat, B. 1985. Caractéristiques d'une population d'*Agrobacterium tumefaciens* isolés d'une pépinière forestière. *Agronomie*

Michel, M.F., Brasileiro, C.M., Depierreux C., Otten L., Delmotte F., et Jouanin, L. 1990. Identification of different *Agrobacterium* strains isolated from the same forest nursery. Appl. Environ. Microbiol. 56:3537-3545.

Minamisawa, K., Seki, T., Onodera, S., Kubota, M., et Asami, T. 1992. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. Appl. Environ. Microbiol. 58:2832-2839.

Monneuse, M.O., et Rouzé, P. 1987. Sequence comparisons between *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA-encoded octopine and nopaline dehydrogenases and other nucleotide-requiring enzymes: structural and evolutionary implications. J. Mol. Evol. 25:46-57.

Moore, L.W. 1976. Research findings of crown gall and its control.

Mpepereki, S., et Wollum, A.G. 1991. Diversity of indigenous *Bradyrhizobium japonicum* in North Carolina soils. Biol. Fert. Soils. 11: 121-127.

Mullis, K.B., et Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. Methods Enzymol. 155:335-350.

Murashige, T., et Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473-497.

Navarro, E. 1992. Diversité du genre *Nitrobacter*. Structure génétique d'une population naturelle d'un écosystème aquatique. Thèse de l'Université de Lyon. 22 janvier 1992.

Navarro, E., Simonet, P., Normand, P., et Bardin, R. 1992. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. Arch. Microbiol. 157:107-115.

Nazaret, S., Cournoyer, B., Normand, P., et Simonet, P. 1992. Phylogenetic relationships among *Frankia* genomic species determined by use of amplified 16S rDNA sequences. J. Bacteriol. 173:1456-1471.

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics, Columbia University Press, New York.

Nei, M., et Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5269-5273.

Nesme, X., Michel, M.F., et Digat, B. 1987. Population heterogeneity of *Agrobacterium tumefaciens* in galls of *Populus* L. from a single nursery. Appl. Environ. Microbiol. 53:655-659.

Nesme, X., Beneddra, T., et Collin, E. 1990. Importance du crown gall chez les hybrides *Populus tremula* L. x *P. alba* L. en pépinière forestière. Agronomie 10:581-588.

Nesme, X., Ponsonnet, C., Picard, C., et Normand, P. 1992. Chromosomal and pTi genotypes of *Agrobacterium* strains isolated from *Populus* tumors in two nurseries. FEMS Microbiol. 101:189-196.

Normand, P., Cournoyer, B., Simonet, P., et Nazaret, S. 1992. Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. Gene 111:119-124.

Normand, P., Ponsonnet, C., Nesme, X., Neyra, M., et Simonet, P. 1994. ITS analysis of prokaryotes. In: *Molecular Microbial Ecology Manual* A.D.L. Akkermans, J.D. Van Elsas and F.J. De Bruijn (eds.), Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, The Netherlands.

Norrung, B., et Skovgaard, N. 1993. Application of multilocus enzyme electrophoresis in studies of the epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Denmark. Appl. Environ. Microbiol. 59:2817-2822.

- Ooms, G., Klapwijk, P.M., Poulis, J.A., et Shilperoort, R.A. 1980. Characterization of Tn904 insertions in octopine Ti plasmid mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 144:82-91.
- Ophel, K., et Kerr, A. 1987. Ecology of *Agrobacterium*: plasmids and biovars. In: *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Verma, DPS and Brisson, N. (eds.). Dordrecht. The Netherlands. 3.
- Ophel, K., et Kerr, A. 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar3 from grapevines. Int. J. Syst. Bacteriol. 40:236-241.
- Otten, L., Canaday, J., Gerard, J.C., Fournier, P., Crouzet, P., et Paulus, F. 1992. Evolution of *Agrobacteria* and their Ti plasmids - a review. Mol. Plant-Microbe Inter. 5:279-287.
- Panagopoulos, C.G., et Psallidas, P.G. 1973. Characteristics of greek isolates of *Agrobacterium tumefaciens* (E.F. Smith and Townsend) Conn. J. Appl. Bacteriol. 36:233-240.
- Paulus, F., Ridé, M., et Otten, L. 1989a. Distribution of two *Agrobacterium tumefaciens* insertion elements in natural isolates: evidence of stable association between Ti plasmids and their bacterial hosts. Mol.Gen. Genetics. 219:145-152.
- Paulus, F., Huss, B., Bonnard, G., Ridé, M., Szegedi, E., Tempé, J., Petit, A., et Otten, L. 1989b. Molecular systematics of biotype III Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Plant-Microbe Interactions 2:64-74.
- Paulus, F., Canaday, J., et Otten, L. 1991a. Limited host-range Ti plasmids: recent origin from wide host-range Ti plasmids and involvement of a novel IS element IS868. Mol. Plant-Microbe Interactions 4: 190-197.
- Paulus, F., Canaday, J., Vincent, F., Bonnard, G., Klares, C., et Otten, L. 1991b. Sequence of *iaa* and *ipt* region of different *Agrobacterium tumefaciens* bt3 octopine strains: reconstruction of octopine Ti plasmid evolution. Plant Mol. Biol. 16:601-614.
- Peerbolte, R., Leenhouts, K., Hooykaas-Van Sloogteren, G.M.S., Hoge, J.H.C., Willems, G.J., et Schilperoort, R.A. 1986. Clones from a shooty tobacco crown gall tumour: deletions, rearrangements and amplifications resulting in irregular T-DNA structures and organizations. Plant Mol. Biol. 7:265-284.
- Peet, R.K. 1974. The measurement of species diversity. Ann. Rev. Ecol. System. 5:285-307.
- Picard, C. 1993. Caractérisation et détection dans le sol des *Agrobacterium* du pommier. Thèse de l'Université de Lyon. 19 juillet 1993.
- Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X., et Simonet, P. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58:2717-2722.
- Pielou, E.C. 1969. An introduction to mathematical ecology, Wiley, New York.
- Pielou, E.C. 1975. Ecological diversity, Wiley, New York.
- Ponsonnet, C., et Nesme, X. 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. Arch. Microbiol. in press.
- Popoff, M.Y., Kersters, K., Kivedjian, M., Miras, I., et Coynault, C. 1984. Position taxonomique de souches d'*Agrobacterium* d'origine hospitalière. Ann. Microbiol. (Institut Pasteur) 135A:427-442.
- Porter, S.G., Yanosky, M.F., et Nester, E.W. 1987. Molecular characterization of the *virD* operon from *Agrobacterium tumefaciens*. Nucleic Acids Res. 15: 7503-7517.

Powell, B.S., Powell, G.K., Morris, R.O., Rogowsky, P.M., et Kado, C.I. 1987. Nucleotide sequence of the *virG* locus of the *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 164:102-106.

Priefer, U.B., Burkardt, H.J., Klipp, W., et Pühler, A. 1981. ISR1: an insertion element isolated from the soil bacterium *Rhizobium lupini*. In: *Movable Genetic Elements, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. XLV, pp 87-91. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY.

Priefer, U.B., Kalinowski, J., Rüger, B., Heumann, W., et Pühler, A. 1989. ISR1, a transposable DNA sequence resident in *Rhizobium* class IV strains, shows structural characteristics of classical insertion elements. Plasmid 21:120-128.

Read, H., et Jaskunas, S.R. 1980. Isolation of *E. coli* mutants containing multiple transpositions of IS sequences. Mol. Gen. Genet. 188:157-164.

Ream, W. 1989. *Agrobacterium tumefaciens* and interkingdom genetic exchange. Annu. Rev. Phytopathol. 27:583-618.

Recorbet, G. 1993. Régulation d'une population d'*Escherichia coli* modifiée génétiquement et devenir de son ADN dans le sol. Thèse de l'Université de Lyon.

Regnery, R.L., Spruill, C.L., et Plikaytis, B.D. 1991. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequences divergences for portions of two rickettsial genes. J. Bacteriol. 173:1576-1589.

Rezsöhazi, R., Hallet, B., Mahillon, J., et Delcour, J. 1993. IS231V and W from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, two distant members of the IS231 family of insertion sequences. Plasmid 30:141-149.

Richaume, A., Bernillon, D., et Faurie, G. 1992. Role of intraspecific competition in the regulation of *Agrobacterium tumefaciens* transconjugant population level in soil experiments. FEMS Microbiol. Ecol. 86:321-330.

Rogowsky, P., Close, T.J., et Kado, C.I. 1987. Dual regulation of virulence genes of *Agrobacterium* plasmid pTiC58. In: *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. D.P.S. Verma and N. Brisson (eds.), M. Nijhoff Publ., Dordrecht, pp. 14-19.

Rogowsky, P.M., Powell, B.S., Shirasu, K., Lin, T.S., Morel, P., Zyprian, E.M., Steck, T.R., et Kado, C.I. 1990. Molecular characterization of the *vir* regulon of *Agrobacterium tumefaciens*: complete nucleotide sequence and gene organization of the 28.63 kbp regulon cloned as a single unit. Plasmid 23:85-106.

Rüger, H.J., et Höfle, M.G. 1992. Marine star-shaped-aggregate-forming bacteria: *Agrobacterium atlanticum* sp. nov.; *Agrobacterium meteori* sp. nov.; *Agrobacterium ferrugineum* sp. nov., nom. rev.; *Agrobacterium gelatinovorum* sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:133-143.

Ruvkun, G.B., Long, S.R., Meade, H.M., Van Den Bos, R.C., et Ausubel, F.M. 1982. ISRm1: a *Rhizobium meliloti* insertion sequence that transposes preferentially into nitrogen fixation genes. J. Mol. Appl. Genet. 1:405-418.

Sadowsky, M.J., Tully, R.E., Cregan, P.B., et Keyser, H.H. 1987. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 and its relation to genotype-specific nodulation of soybean. Appl. Environ. Microbiol. 53:2624-2630.

Saedler, H., Reif, H., Hu, S., et Davidson, N. 1974. IS2: a genetic element for turn-off and turn-on of gene activity in *E. coli*. Mol. Gen. Genet. 132:265-289.

Saedler, H., Cornelis, G., Cullum, J., Schumacher, B., Sommer, H. 1980. IS1 mediated DNA rearrangements. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45:93-98.

Sanger, F., Nicklen, S., et Carlson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74:5463-5467.

Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, H., et Matsumoto, S. 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:694-702.

Sawyer, S.A., Dykhuizen, D.E., DuBose, R.F., Green, L., Mutangadura-Mhlanga, T., Wolczyk, D.F., et Hartl, D.L. 1987. Distribution and abundance of insertion sequences among natural isolates of *Escherichia coli*. *Genetics* 115:51-63.

Schofield, P.R., Gibson, A.H., Dudman, W.F., et Watson, J.M. 1987. Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in a soil population. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2942-2947.

Schöner, B., et Schöner, R.G. 1981. Distribution of IS5 in bacteria. *Gene* 16:347-352.

Schroth, M.N., Weinhold, A.R., Mc Cain, A.H., Hildebrand, D.C, et Ross, N. 1971. Biology and control of *Agrobacterium tumefaciens*. *Hilgardia* 40:537-552.

Sciaky, D., Montoya, A.L., et Chilton, M.D. 1978. Fingerprints of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Plasmid* 1:238-253.

Sciaky, D., et Thomashow, M.F. 1984. The sequence of the *tms* transcript 2 locus of the *A. tumefaciens* plasmid pTiA6 and characterization of the mutation in pTiA66 that is responsible for auxin attenuation. *Nucleic Acids Res.* 12:1447-1461.

Scordilis, G.E., Ree, H., et Lessi, T.G. 1987. Identification of transposable elements which activate gene expression in *Pseudomonas cepacia*. *J. Bacteriol.* 169:8-13.

Selander, R.K., Korhonen, T.K., Vaisanen-Rhen, V., Williams, P.H., Pattison, P.E., et Caugant, D.A. 1986. Genetic relationships and clonal structure of strains of *Escherichia coli* causing neonatal septicemia and meningitis. *Inf. Immunity*. 52:213-222.

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

Shine, J., et Dalgarno, L. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1342-1346.

Shishido, M., et Pepper, I.L. 1990. Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Biol. Biochem.* 22:11-16.

Simon, R., Hötte, B., Klauke, B., et Kosier, B. 1991. Isolation and characterization of insertion sequence elements from gram negative bacteria by using new broad-host range positive vectors. *J. bacteriol.* 173:1502-1508.

Simpson, E.H. 1949. Measurement of diversity. *Nature (London)* 163:688.

Sinclair, M.J., et Eaglesham, A.R.J. 1990. Serological diversity of *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) from three west african soils. *Soil Biol. Biochem.* 22:69-74.

Skerman, V.B.D., McGowan, V., et Sneath, P.H.A. 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:225-420.

Smith, E.F., et Townsend, C.O. 1907. A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25:671-673.

Sneath, P.H.A. 1956. Cultural and biochemical characteristics of the genus *Chromobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 15:70-98.

Soby, S., Kirkpatrick, B., et Kosuge, T. 1993. Characterization of an insertion sequence (IS53) located within IS51 on the *iaa*-containing plasmid of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Plasmid 29:135-141.

Sokal, R.R., et Sneath, P.H. 1963. The construction of a taxonomic system. In: *Principles of numerical taxonomy*, chap. 7, W.H. Freeman (ed.). San Fransisco, pp. 169-210.

Spanier, K., Schell, J., et Schreier, P.H. 1989. A functional analysis of T-DNA gene *6b*: the fine tuning of cytokinin effects on shoot development. Mol. Gen. Genet. 219:209-216.

Stachel, S.E., et Nester, E.W. 1986. The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J. 5:1445-1454.

Stanley, J., Jones, C.S., et Threlfall, E.J. 1991. Evolutionary lines among *Salmonella enteritidis* phage types are identified by insertion sequence IS200 distribution. FEMS Microbiol. Lett. 82:83-90.

Stern, M.J., Ames, G.F.L., Smith, N.H., Robinson, E.C., et Higgins, C.F. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. Cell 37:1015-1026.

Strabala, T.J., Bednarek, S.Y., Bertoni, G., et Amasino, R.M. 1989. Isolation and characterization of an *ipt* gene from the Ti plasmid Bo542. Mol. Gen. Genet. 216:388-394.

Süle, S. 1978. Biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* in Hungary. J. Appl. Bacteriol. 44:207-213.

Tarbah, F.A., et Goodman, R.N. 1986. Rapid detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine propagating material and the basis for an efficient indexing system. Plant Dis. 70: 566-568.

Taylor, L.R. 1978. Bates, Williams, Hutchinson - a variety of diversity. In: *Diversity of insect faunas: 9th Symposium of the Royal Entomological Society*. L.A. Mond and N. Warloff (eds.). Blackwell, Oxford, pp. 1-18.

Tempé, J., Guyon, P., Tepfer, D.A., et Petit, A. 1979. The role of opines in the ecology of the Ti-plasmids of *Agrobacterium*. In: *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance*. pp. 353-365. Timmis K.N., & Pühler A. (eds.), Amsterdam: Ebevier/North Holland Biomedical Press.

Thies, K.L., Griffin, D.E., Graves, C.H., et Hegwood, C.P. 1991. Characterization of *Agrobacterium* isolates from muscadine grape. Plant Dis. 75:634-637.

Thompson, D.V., Melchers, L.S., B.Idler, K., Schilperoort, R.A., et Hooykaas, P.J.J. 1988. Analysis of the complete nucleotide sequence of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* operon. Nucleic Acids Res. 16:4621-4635.

Tinland, B., Huss, B., Paulus, F., Bonnard, G., et Otten, L. 1989. *Agrobacterium tumefaciens* *6b* genes are strain specific and affect the activity of auxin as well as cytokinin genes. Mol. Gen. Genet. 219:217-224.

Tinland, B., Rohfritsch, O., Michler, P., et Otten L. 1990. *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA *6b* stimulates *rol*-induced root formation, permits growth at high auxin concentration and increases root size. Mol. Gen. Genet. 223:1-10.

Unger, L., Ziegler, S.F., Huffmann, G.A., Knauf, V.C., Peet, R., Moore, L.W., Gordon, M.P., et Nester, E.W. 1985. New class of limited-host-range *Agrobacterium* mega-tumor-inducing plasmids lacking homology to the transferred DNA a wide-host-range tumor inducing-plasmid. J. Bacteriol. 164:723-730.



Van der Zee, A., Agterberg, C., Van Agterveld, M., Peeters, M., et Mooi, F.R. 1993. Characterization of IS1001, an insertion sequence element of *Bordetella parapertussis*. J. Bacteriol. 175:141-147.

Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., et Zaenen, I. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* is essential for crown gall-inducing ability. Nature, (London) 252:169-170

Vanderleyden, J., Desair, J., De Meirman, C., Michiels, K., Van Gool, A.P., Chilton, M.D., et Jen, G.C. 1986. Nucleotide sequence of an insertion sequence (IS) element identified in the T-DNA region of a spontaneous variant of the Ti plasmid pTiT37. Nucleic Acids Res. 14:6699-6709.

Vaudequin-Dransart, V., Petit, A., Poncet, C., Ponsonnet, C., Nesme, X., Jones, J.B., Bouzar, H., Chilton, W.S., et Dessaux, Y. Novel Ti plasmids in *Agrobacterium* strains isolated from *Ficus* and *Chrysanthemum* tumors and their opine-like molecules. Mol. Plant-Microbe Interac. soumis.

Vilgalys, R., et Hester, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J. Bacteriol. 172:4238-4246.

Wabiko, H., Kagaya, M., Kodama, I., Masuda, K., Kodama, Y., Yamamoto, H., Shibano, Y. et Sano, H. 1989. Isolation and characterization of diverse nopaline type Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* from Japan. Arch. Microbiol. 152:119-124.

Wabiko, H., Kagaya, M., et Sano, H. 1991. Polymorphism of nopaline-type T-DNAs from *Agrobacterium tumefaciens*. Plasmid 25:3-15.

Wabiko, H. 1992. Sequence analysis of an insertion element, IS1131, isolated from the nopaline-type Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. Gene 114:229-233.

Ward, J.E., Akiyoshi, D.E., Regier, D., Datta, A., Gordon, M.P., et Nester, E.W. 1988. Characterization of the *virB* operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. J. Biol. Chem. 263:5804-5814.

Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., et Trüper, H.G. 1987. Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:463-464.

Weinreich, M.D., et Reznikoff, W.S. 1992. Fis plays a role in Tn5 and IS50 transposition. J. Bacteriol. 174:4530-4537.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., et Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697-703.

Wheatcroft, R., et Laberge, S. 1991. Identification and nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* insertion sequence ISRm3: similarity between the putative transposase encoded by ISRm3 and those encoded by *Staphylococcus aureus* IS256 and *Thiobacillus ferrooxidans* IST2. J. Bacteriol. 173:2530-2538.

White, L.O. 1972. The taxonomy of the crown gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationships to rhizobia and other bacteria. J. Gen. Genet. 72:565-574.

Whittaker, R.H. 1977. Evolution of species diversity in land communities. In: *Evolutionary Biology*. Vol. 10. M.K. Hecht, W.C. Steere and B. Wallace (eds.). Plenum, New York. pp. 1-67.

Willems, A., et Collins, D. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bact. 43: 305-313.

Willmitzer, L., Dhaese, P., Schreier, P.H., Schmalenbach, W., Van Montagu, M., et schell, J. 1983. Size, location and polarity of T-DNA encoded transcripts in nopaline crown gall tumors; common transcripts in octopine and nopaline tumors. *Cell* 32:1045-1056.

Winans, S.C., Allenza, P., Stachel, S.E., Mc Bride, K.E., et Nester, E.W. 1987. Characterization of the *virE* operon of *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6. *Nucleic Acids res.* 15:825-837.

Winans, S.C. 1992. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.* 56:12-31.

Yadav, N.S., Vanderlayden, J., Bennett, D.R., Barnes, W.M., et Chilton, M.D. 1982. Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:6322-6326.

Yamada, T., Lee, P.D., et Kosuge, T. 1986. Insertion sequence elements of *Pseudomonas savastanoi*: nucleotide sequence and homology with *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:8263-8267.

Yanagi, M., et Yamasato, K. 1993. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.* 107:115-120.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., et Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strain: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.

Yanofsky, M., Lowe, B., Montoya, A., Rubin, R., Krul, W., Gordon, M., et Nester, E. 1985. Molecular and genetic analysis of factors controlling host-range in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 201:237-246.

Young, J.P.W., Demetriou, L., et Apte, R.G. 1987. *Rhizobium* population genetics: enzyme polymorphism in *Rhizobium leguminosarum* from plants and soil in a pea crop. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:397-402.

Young, J.P.W., et Wexler, M. 1988. Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 134:2731.

Yun, A.C., Hadley, R.G., et Szalay, A.A. 1987. A plasmid sequence from *Rhizobium leguminosarum* 300 contains homology to sequences near the octopine T<sub>L</sub>-DNA right border. *Mol. Gen. Genetics* 209:580-584.

Zambrisky, P. 1988. Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annu. Rev. genet.* 22:1-30.

## ANNEXES

## LISTE DES ANNEXES

- ANNEXE I. Liste des isolats d'*Agrobacterium* analysés répartis par tumeur.
- ANNEXE II. Liste des isolats d'*Agrobacterium* isolés du sol de la pépinière de Peyrat.
- ANNEXE III. Enzymes de restriction et marqueurs de poids moléculaire.
- ANNEXE IV. Taille et nombre des fragments de restriction.
- ANNEXE V. Fréquence des ribotypes dans les quatre populations tumorales.
- ANNEXE VI. Fréquence des types plasmidiques dans les quatre populations tumorales.
- ANNEXE VII. Fréquence des génotypes dans les quatre populations tumorales.
- ANNEXE VIII. Comparaison de séquences nucléotidiques et protéiques.

## ANNEXE I. Liste des isolats d'*Agrobacterium* analysés, répartis par tumeur.

*Le biovar (Bv.), le séro groupe (Sg.; i: indéterminé, nt: non testé) et le génotype (ribotype et type plasmidique) de chaque isolat est indiqué.*

*NB: certains isolats n'ont été caractérisés que par leur ribotypes, à cause de l'absence d'amplification avec les amorces ciblant le T-DNA.*

I.1. Population de la pépinière d'Orléans isolée des boutures de peuplier de 2 ans en 1985.

I.2. Population de la pépinière de Peyrat isolée des boutures de peuplier de 2 ans en 1987.

I.3. Population de la pépinière de Peyrat isolée des jeunes boutures de peuplier en 1988.

I.4. Population de la pépinière de Peyrat isolée des plants de peuplier issus de culture *in vitro* du clone 709.3.

I.4.1 Population du premier arrachage en février 1989 (séro groupe non déterminé).

Seuls les isolats indiqués en caractère standard ont été pris en compte pour l'analyse de la population PEY VP.

Les isolats indiqués en italique ont été utilisés pour l'analyse de la diversité intratumorale.

I.4.2 Population du deuxième arrachage en octobre 1989.

*NB. Certains isolats n'ont été caractérisés uniquement par leur ribotype*

## I. 1. Echantillonnage ORL 2A

Clone (n° tumeur)	n° isolat	Bv.	Sg.	génotype (chr.-pTi)
927	85 2	1	1a	2177-2177
	85 3	1	1b	85 3
	85 4	1	1a	2177-2177
	85 5	1	1a	2177
	85 6	1	1b	85 3-2516
	85 7	1	1b	85 3-2516
912-3	85 30	2	nt	85 30-2516
928-1	85 15	1	1b	85 3-2516
924-24	85 24	1	1c	2517
920-9 A10	85 38	1	1b	85 69-2516
	85 66	1	1c	2517-2516
920-10 A10	85 39	1	1b	85 3-2516
907-16 A11	85 45	1	1b	85 3
	85 67	1	1b	85 3-2516
	85 68	1	1b	85 3-2516
	85 46	1	1b	85 46
922	85 46	1	1b	85 46
927-7	85 47	1	1b	85 46-2516
929-10 A10	85 49	1	1a	2177-2177
	85 69	1	1b	85 69-2516
920-8 A10	85 52	1	1c	2517-2516
934-23 A13	85 57	1	1b	85 3-2516
	85 73	2	nt	2520
740-50 A17	85 59	1	1b	85 3-2516
	85 75	1	1b	85 3-2516
	85 81	1	1b	85 3-2516
	85 85	1	nt	85 46-2516
	85 82	2	nt	85 30-2516
740-2 A10	85 83	2	nt	85 30-2516
	85 60	1	1b	85 3-2516
	85 76	1	1b	85 3
740-48 A17	85 61	1	1b	85 3-2516
	85 77	1	1b	85 3-2516
	85 78	1	1b	85 3-2516
	85 79	1	1b	85 3-2516
	85 63	1	1b	85 3-2516
907	85 86	1	1b	85 3
	85 87	1	1b	85 3
	85 89	2	nt	85 30-2516
	85 104	1	1c	85 104-2516
906-25 A10	85 121	1	nt	2517-2516
	85 123	2	nt	85 30-2516
922-7 A11	85 101	1	1b	85 46-2516
	85 102	1	1b	85 46-2516
	85 105	1	1b	85 46
	85 120	2	nt	85 110-2516
914	85 106	1	1b	85 46-2516
	85 112	1	1a	2177-2177
	85 110	2	nt	85 110-2516
	85 124	2	nt	85 30-2177
934-35	85 13	1	nt	2177-2177
	85 40	1	nt	2177-2177
934-39	85 37	1	nt	2177-2177
908-1 A12	85 95	2	nt	2520
	85 96	2	nt	2520
908-1 A11	85 97	2	nt	2520
808-111 6	85 178	2	nt	85 178
	85 186	2	nt	2520-2516
706-2	85 183	2	nt	85 30
	85 187	2	nt	85 30
	85 189	2	nt	85 30
604-21	85 194	2	nt	2178

# I. 2. Echantillonnage PEY 2A

n° tumeur	n° isolat	Bv.	Sg.	Génotype (chr.-pTi)
1109	M2	1	1b	2516-1903
	M42	1	1a	2177-2177
1114	M288	1	1b	85 3-2516
	M3	2	nt	85 30-1903
612	M9	1	1b	M9-2516
	M10	1	1b	M9-2516
624	M15	1	nt	M15-1903
	M290	1	1a	2177-292
	M13	2	nt	85 30-1903
1254	M20	1	1a	2177-2177
1102	M29	2	nt	M29-M80
1273	M274	1	1b	85 46
	M32	2	nt	85 30-M80
649	M56	1	1a	2177-2177
1186	M291	1	1a	85 104
538	M61	1	1a	2177-2177
	M62	2	nt	M62
438	M73	1	1c	2516-1903
	M74	1	1a	2177
1369	M80	2	nt	85 30-M80
	M81	2	nt	85 30-M80
858	M83	1	1b	85 3-2516
	M84	2	nt	85 30-1903
873	M97	1	1b	85 3-2516
448	M102	1	1c	2516
912	M111	2	nt	85 30-M80
1358	M119	1	1b	85 3-2516
	M116	2	nt	85 30-1903
1371	M126	1	1b	85 3-2516
	M131	1	1a	2177-2177
	M258	1	1b	85 3
425	M295	1	1b	85 46-2516
	M138	2	nt	85 30-1903
	M139	2	nt	85 30-1903
	M140	2	nt	M140
864	M142	1	1a	2177-292
	M143	1	nt	2177-292
	M145	1	nt	2177
	M146	1	nt	2177
	M147	2	nt	85 30-1903
874	M148	1	1b	85 3-2516
	M150	2	nt	85 30-1903
596	M162	1	1b	85 3-2516
	M163	1	1b	85 3-2516
1329	M166	1	1b	85 46-2516
1327	M171	1	1b	85 3-2516
	M176	1	1b	85 3-2516
	M175	2	nt	85 30-1903
1007	M182	1	1b	M182
	M184	2	nt	85 30-1903
888	M204	1	1a	2177-292
	M206	2	nt	85 30-1903
850	M209	1	i	2177-292
	M210	1	1b	85 3-2516
	M207	2	nt	85 30-1903
1412	M214	1	1b	85 3-1903
13 39	M225	2	nt	85 30-1903
877	M229	1	1b	85 69-1903
	M278	1	1b	85 69-1903
862	M240	1	1a	2177-2177

	M282	1	nt	2177-2177
	M300	1	nt	2177-2177
1542	M246	2	nt	85 30
517	M292	1	1b	M292-M80
599	M301	1	nt	2516
1102	M305	2	nt	M29
?	M121	1	1b	85 3-2516
?	M180	1	1b	85 3-2516
?	M191	1	1a	2177-2177
?	M120	2	nt	2520-2516
?	M122	2	nt	2520-2516
?	M123	2	nt	85 110
?	M189	2	nt	85 30-1903

---



### I. 3. Echantillonnage PEY JT

Clone	n° tumeur	n° isolat	Bv.	Sg.	Génotype (chr.-pTi)
712 8	712 8 c	X88 268	1	1a	2177-292
		X88 269	1	1a	2177
	712 8 e	X88 277	1	1b	85 3-2516
		X88 278	1	1c	2516-1903
		X88 279	1	1c	2516-1903
	712 8 f	X88 282	1	1b	85 46-2516
		X88 283	1	1b	85 46-2516
717 1	717 1 2 a	X88 284	1	1b	85 3
		X88 285	1	1b	85 46-2516
	717 1 2 b	X88 288	1	1b	85 46-2516
		X88 289	1	1b	85 46-2516
		X88 291	1	1b	85 46-2516
	717 1 2 c	X88 292	1	1a	2177-292
		X88 293	1	1a	2177-292
		X88 294	1	1a	2177-292
	717 1 2 d	X88 299	1	1b	85 3-2516
		X88 300	1	1b	B113 3
		X88 301	1	1b	85 3-2516
	717 1 2 e	X88 303	1	1c	2516-1903
		X88 304	1	1c	2516-1903
		X88 305	1	1b	B113 3
712 2	712 2 a	X88 308	1	1a	2177
		X88 309	1	1c	2516-M80
	712 2 b	X88 311	1	1a	2177-292
		X88 312	1	1a	2177-292
	712 2 c	X88 315	1	1a	2177-2177
		X88 317	1	1b	85 46-2516
		X88 318	1	1b	85 46-2516
	712 2 d	X88 322	1	1b	85 46-2516
		X88 323	1	1b	85 46-2516
	712 2 e	X88 327	1	1a	2177-2177
		X88 328	1	1a	2177-292
		X88 329	1	1b	85 46-2516

## I. 4. 1 Echantillonnage PEY VP. 1ère année.

n° tumeur	n° isolat	Bv.	Génotype (chr.-pTi)
A68	A68 3	1	85 3-2516
	A6810	1	2516-M80
	A68 20	1	A68 20-M80
	A68 32	1	85 46-2516
	A68 39	1	2516
	A68 6	1	B113 3
	A68 7	1	2516-M80
	A68 15	1	B113 3
	A68 18	1	A68 18-2516
	A68 19	1	A68 20-M80
	A68 23	2	85 30-1903
	A68 38	2	85 30
	A68 24	2	85 30-1903
	A68 27	2	85 30-1903
	A68 34	2	85 30-1903
	A68 43	2	85 30-1903
	A68 45	2	85 30-1903
A134	A134 3	1	85 46-1903
	A134 6	1	A134 5-1903
	A134 7	1	A134 5-1903
	A134 11	1	A134 5-1903
	A134 15	1	A134 5-1903
	A134 19	1	A134 5-1903
	A134 2	1	A134 5-1903
	A134 4	1	A134 5-1903
	A134 9	1	A134 5-1903
	A134 10	1	A134 5-1903
	A134 13	1	A134 5-1903
	A134 14	1	A134 5-1903
	A134 17	1	A134 5-1903
	A134 21	2	M29-2516
	A134 34	2	M29-2516
	A134 42	2	85 30
	A134 22	2	M29-2516
	A134 23	2	M29-2516
	A134 24	2	M29-2516
	A134 25	2	M29-2516
A135	A135 7	1	85 3-2516
	A135 9	1	85 3-2516
	A135 10	1	85 3-2516
	A135 21	2	85 30-1903
B113	B113 3	1	B113 3
	B113 4	1	85 46-2516
	B113 7	1	B113 3
	B113 8	1	B113 3
	B113 11	1	B113 3
	B113 12	1	B113 3
	B113 13	1	B113 3
	B113 16	1	B113 3
	B113 17	1	B113 3
	B113 19	1	B113 3
	B113 20	1	B113 3
	B113 21	2	85 30-1903
	B113 22	2	85 30-1903
	B113 23	2	85 30-1903
	B113 24	2	85 30-1903
	B113 25	2	85 30-1903
	B113 26	2	85 30-1903
C106	B113 27	2	85 30-1903
	B113 28	2	85 30-1903
	C106 27	2	2178
	C106 28	2	2178-2516

## I. 4. 2 Echantillonnage PEY VP. 2ème année.

n° tumeur	n° isolat	Bv.	Sg.	Génotype (chr.-pTi)
A34	A34 11	1	nt	B113 3
	A34 21	1	lc	B113 3
	A34 31	1	lc	B113 3
	A34 32	2	nt	85 30-1903
A73	A73 21	1	lb	85 3-1903
	A73 31	1	lb	85 3-1903
A96	A96 11	1	lb	2516-M80
	A96 21	1	lb	2516-M80
B76	B76 11	1	lb	85 46-2516
	B76 21	1	lb	85 46-2516
B80	B80 11	1	la	2177-292
	B80 21	1	la	2177-292
	B80 31	1	lb	2177-292
B81	B81 11	1	la	85 46-2516
	B81 21	1	la	2177-292
B85	B85 11	1	nt	85 46-2516
	B85 21	1	la	2177-292
	B85 31	1	i	2177-292
	B85 12	2	nt	85 30-M80
B89	B89 11	1	i	B89 11
B100	B100 11	1	i	B100 11-1903
	B100 21	1	i	B100 11-1903
C1	C1 11	1	i	85 46-2516
	C1 21	1	lb	85 46-2516
	C1 31	1	lb	85 46-2516
C2	C2 12	2	nt	85 30-1903
	C2 22	2	nt	85 30-1903
	C2 32	2	nt	85 30-2516
	C2 32	2	nt	85 30-2516
C17	C17 11	1	lb	2177-292
	C17 21	1	lb	2177-292
C25	C25 11	1	lb	2516-2516
	C25 21	1	lb	85 3-2516
	C25 12	2	nt	85 30-1903
	C25 22	2	nt	85 30
	C25 32	2	nt	85 30-1903
	C25 32	2	nt	85 30-1903
C80	C80 12	2	nt	85 30-1903
	C80 22	2	nt	85 30-1903
C82	C82 21	1	i	B113 3
	C82 31	1	i	B113 3
	C82 12	2	nt	2520
	C82 32	2	nt	8530
C87	C87 11	1	i	85 46-2516
	C87 21	1	lb	85 46-2516
	C87 31	1	lb	B113 3
	C87 12	2	nt	85 30-M80
	C87 22	2	nt	85 30-M80
	C87 32	2	nt	85 30-M80
C911	C911 11	1	lb	85 3-2516
	C911 21	1	lb	85 46-2516
	C911 22	2	nt	85 30-2516
	C911 32	2	nt	85 30-2516
C100	C100 11	1	i	85 46-2516
	C100 21	1	lb	85 46-2516
	C100 31	1	lb	85 46-2516
	C100 32	2	nt	85 30-1903
C103	C103 11	1	nt	85 3-2516
	C103 21	1	lb	85 3-2516
C104	C104 21	1	lb	85 46-2516
	C104 31	1	lb	85 46-2516
	C104 12	2	nt	C104 12-2516
	C104 22	2	nt	C104 12-2516
	C104 32	2	nt	C104 12

**ANNEXE II. Liste des isolats d'*Agrobacterium* isolés du sol de  
la pépinière de Peyrat.**

N° isolat	Bv.	Sg.	Génotype
C91 1	1	lb	S6
C91 2	1	lb	S4
C91 3	1	lb	S3
C91 4	1	i	S8
C91 5	1	lb	S7
C91 6	1	i	S8
C91 7	1	lb	S3
C91 8	1	lb	S7
C91 9	1	lb	S3
C91 11	1	lb	S3
C91 12	1	i	S9
C91 13	1	i	2517
C91 14	1	lb	S7
C91 15	1	i	S5
C91 16	1	lc	S10
C91 21	1	i	S4
C91 50	1	lb	S3
C91 54	1	i	S2
C91 55	1	lb	S8
C91 56	1	i	S1
C91 57	1	i	S1
C91 58	1	i	S1
C91 59	1	i	S1
C91 60	1	i	S1
C91 61	1	i	S1
C91 62	1	lc	S1
C91 63	1	lc	S1
C91 64	1	lc	S1
C91 65	1	lc	S1
C91 66	1	lc	S1
C91 68	1	i	S1
C91 70	1	i	S3
C91 76	1	i	S8
C91 80	1	i	S8
<hr/>			
C91 206	2	nt	2520
C91 208	2	nt	2520
C91 210	2	nt	2520
C91 213	2	nt	2520
C91 218	2	nt	2520
C91 220	2	nt	2520
C91 222	2	nt	2520
C91 225	2	nt	2520
C91 226	2	nt	2520
C91 227	2	nt	2520

### ANNEXE III.

Ladder 123pb (pb)	Ladder 1kb (pb)
1107	1018
984	517
861	506
738	396
615	344
492	298
369	220
246	201
123	154
	134
	75

Marqueurs de poids moléculaire

Sites de 4 bases		Sites de 5 bases	
enzyme	site	enzyme	site
<i>AluI</i>	AG/CT	<i>ApyI</i>	CC/wGG
<i>CfoI</i>	GCG/C	<i>AvaII</i>	G/GwCC
<i>HaeIII</i>	GG/CC	<i>DdeI</i>	C/TnAG
<i>MspI</i>	C/CGG	<i>DsaV</i>	/CCnGG
<i>NdeII</i>	/GATC	<i>HinfI</i>	G/AnTC
<i>NlaIII</i>	CATG/	<i>NciII</i>	CC/sGG
<i>RsaI</i>	GT/AC	<i>Sau96I</i>	G/GnCC
<i>TaqI</i>	T/CGA		
<i>ThaI</i>	CG/CG		

Enzymes de restriction utilisés et sites correspondants

w: A ou T; s: C ou G; n: A, C, G ou T

## **ANNEXE IV. Taille et nombre des fragments de restriction**

IV.1. Fragments de restriction du gène 16S

IV.2. Fragments de restriction de la région 16S6-23S132

IV.3. Fragments de restriction de la région *virA*2275-*virB*<sub>2</sub>164

IV.4. Fragments de restriction de la région *tmr*530-*nos*975

#### IV.1. Fragments de restriction du gène 16S pour les trois enzymes testés.

(le nombre de bandes obtenues pour chaque profil est indiqué entre parenthèses)

	Taille des fragments (pb)														
	<i>NdeII</i>					<i>TaqI</i>					<i>HaeIII</i>				
<i>A. radiobacter</i> C58	945,	221,	165,	83,	24	838,	316,	220,	48,	36	486,	205,	179,	175,	107, 135, 85, 66
	(5)					(5)					(8)				
<i>A. radiobacter</i> 1904	945,	221,	165,	83,	24	838,	316,	220,	48,	36	486,	185,	179,	175,	135, 107, 85, 66, 20
	(5)					(5)					(9)				
<i>A. rhizogenes</i>	710,	221,	175,	165,	83, 60, 24	468,	364,	313,	220,	57, 36	486,	282,	205,	179,	135, 85, 66
	(7)					(6)					(7)				
<i>A. vitis</i>	945,	221,	165,	83,	24	838,	316,	220,	48,	36	571,	282,	205,	179,	135, 66
	(5)					(5)					(6)				
<i>A. rubi</i>	945,	221,	165,	83,	24	838,	316,	220,	48,	36	486,	205,	179,	175,	135, 107, 85, 66
	(5)					(5)					(8)				

## IV.2. Fragments de restriction de la région 16S6-23S132

(les bandes de faible intensité sont indiquées entre parenthèses, les bandes soulignées correspondent aux parties 16S)

### Population tumorale - Enzyme *TaqI*:

Types	Nb	Taille des fragments (pb)	Somme (pb)
85 3	12 (14)	<u>835</u> , 453, (357), (342), <u>322</u> , (279), <u>226</u> , 153, 140, 131, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2437 (978)
85 46	13	<u>835</u> , 453, 342, <u>322</u> , <u>226</u> , 140, 131, 74, 69, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2769
2177	12	<u>835</u> , 453, 322, <u>322</u> , <u>226</u> , 153, 140, 131, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2758
2517	13	<u>835</u> , 453, 357, <u>322</u> , 202, 153, 140, 131, 105, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2875
85 69	12 (14)	<u>835</u> , 453, 357, (342), <u>322</u> , (279), <u>226</u> , 153, 140, 131, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2794 (621)
85 104	14	<u>835</u> , 389, 342, <u>322</u> , 202, 153, 140, 131, 105, 74, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2871
2516	12	<u>835</u> , 453, 342, <u>322</u> , <u>226</u> , 153, 140, 131, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2779
B113 3	11	<u>835</u> , 453, 322, <u>322</u> , 279, <u>226</u> , 140, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2753
M15	12	<u>835</u> , 342, <u>322</u> , 315, 279, <u>226</u> , 143, 140, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2779
M9	11 (13)	<u>835</u> , 453, (342), <u>322</u> , (279), <u>226</u> , 153, 140, 131, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2437 (621)
M182	11	<u>835</u> , 453, 342, <u>322</u> , 279, <u>226</u> , 140, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2774
M292	13	<u>835</u> , 389, 357, <u>322</u> , 202, 153, 140, 131, 105, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2811
A134 5	12	<u>835</u> , 453, 342, <u>322</u> , 239, 189, 105, 74, 69, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2882
A68 18	13	<u>835</u> , 453, 342, <u>322</u> , <u>226</u> , 140, 131, 113, 74, 69, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2882
A68 20	14	<u>835</u> , 389, 322, <u>322</u> , <u>226</u> , 202, 153, 140, 131, 105, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2799
B89 11	(6)	<u>835</u> , 453, 322, <u>322</u> , 279, 140,	(2351)
B100 11	10 (11)	<u>835</u> , 550, (453), 322, <u>322</u> , 279, 140, <u>61</u> , <u>51</u> , 37, 28	2625 (453)

### Population du sol - Enzyme *TaqI*:

Types	Nb	Taille des fragments (pb)	Somme (pb)
S 1	9 (12)	<u>835</u> , 453, (389), (357), <u>322</u> , 321, <u>226</u> , (202), 153, 140, 131, 105	2686 (948)
S 2	8 (9)	<u>835</u> , 453, 357, (342), <u>322</u> , <u>226</u> , 153, 140, 131	2617 (342)
S 3	8 (11)	<u>835</u> , 453, (389), 357, (342), <u>322</u> , ( <u>226</u> ), 202, 140, 131, 105	2545 (957)
S 4	8 (9)	<u>835</u> , 453, (357), 342, <u>322</u> , 202, 140, 131, 105	2530 (357)
S 5	8	<u>835</u> , 389, 357, <u>322</u> , 202, 140, 131, 105	2481
S 6	8	<u>835</u> , 389, 342, <u>322</u> , <u>226</u> , 153, 140, 131	2538
S 7	5 (10)	<u>835</u> , (453), (389), <u>322</u> , 321, (279), ( <u>226</u> ), (202), 140, 105	1723 (1549)
S 8	8	<u>835</u> , 550, <u>322</u> , 321, 153, 140, 139, 131	2571
S 9	9	<u>835</u> , 389, <u>322</u> , 321, 202, 153, 140, 131, 105	2598
S10	9 (10)	<u>835</u> , 453, 342, <u>322</u> , ( <u>226</u> ), 202, 153, 140, 131, 105	2683 (226)

NB. La partie basse des gels étant illisibles, les tailles totales et le nombre de fragments obtenus sont sous-estimés.



Population tumorale - Enzyme *Hae*III:

Types	Nb	Taille des fragments (pb)	Somme (pb)
85 30	10	554, <u>491</u> , 402, 402, <u>276</u> , <u>228</u> , <u>181</u> , <u>89</u> , 72, <u>72</u>	2767
2520	12	597, <u>491</u> , 425, <u>276</u> , <u>228</u> , 185, <u>181</u> , 164, <u>89</u> , 87, 72, <u>72</u>	2867
85 110	11	<u>491</u> , 402, 402, 402, <u>276</u> , <u>228</u> , <u>181</u> , 134, <u>89</u> , 72, <u>72</u>	2749
85 178	10	524, <u>491</u> , 491, 349, <u>276</u> , <u>228</u> , <u>181</u> , <u>89</u> , 72, <u>72</u>	2773
2178	11	<u>491</u> , 402, 402, 355, <u>276</u> , <u>228</u> , <u>181</u> , 134, <u>89</u> , 72, <u>72</u>	2702
M29	13	554, <u>491</u> , 402, 402, (304), <u>276</u> , <u>228</u> , <u>181</u> , (134), (109), <u>89</u> , 72, <u>72</u>	2767 (547)
M62	10	597, <u>491</u> , 466, 349, <u>276</u> , <u>228</u> , <u>181</u> , <u>89</u> , 72, <u>72</u>	2821
M140	11	554, <u>491</u> , 402, 304, <u>276</u> , <u>228</u> , <u>181</u> , 109, <u>89</u> , 72, <u>72</u>	2778
C104 12	10	<u>491</u> , 491, 402, 402, <u>276</u> , <u>228</u> , <u>181</u> , <u>89</u> , 72, <u>72</u>	2704

#### IV.3. Fragments de restriction de la région *virA2275-virB2164*

Type	Taille des fragments (pb)			
	<i>CfoI</i>	<i>DdeI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>
VIR1	434, 275, 256, 189, 159, 136, 125, 80, 19	752, 344, 270, 168, 73, 66	593, 475, 352, 196, 25, 22, 10	969, 164, 158, 110, 106, 56, 51, 34, 25
VIR2	434, 411, 256, 189, 159, 125, 80, 19	752, 344, 270, 241, 66	593, 475, 352, 196, 25, 22, 10	969, 164, 158, 110, 106, 56, 51, 34, 25
VIR3	434, 411, 256, 189, 159, 125, 80, 19	752, 344, 270, 168, 73, 66	593, 475, 352, 196, 25, 22, 10	969, 164, 158, 110, 106, 56, 51, 34, 25

#### IV.4. Fragments de restriction de la région *tmr530-nos975*

pTi	Taille des fragments (pb)		
	<i>DdeI</i>	<i>TaqI</i>	<i>RsaI</i>
2516	680, 585, 545, 460, 405, 232, 194, 163, 139, 125, 96, 78	461, 412, 319, 262, 240, 202, 180, 172, (12, 3702) <sup>a</sup> 155, 155, 145, 141, 141, 112, 105, 90, 60, 55, 50 (19, 3607)	1245, 1147, 757, 201, 179, 140 (6, 3669)
2177	680, 585, 545, 405, 367, 232, 194, 163, 139, 125, 96, 96, 78	461, 412, 319, 297, 262, 240, 202, 180, (13, 3705) 172, 155, 150, 141, 141, 112, 105, 90, 60, 55, 50 (19, 3604)	1245, 1147, 757, 201, 179, 140 (6, 3669)
1903	680, 585, 545, 460, 405, 232, 194, 163, 139, 125, 96, 78	461, 412, 319, 297, 262, 240, 202, 180, (12, 3702) 172, 155, 150, 141, 141, 112, 105, 90, 60, 55, 50 (19, 3604)	1245, 1147, 757, 201, 179, 140 (6, 3669)
M80	680, 585, 545, 425, 405, 367, 163, 139, 125, 96, 96, 78	412, 319, 297, 270, 248, 220, 202, 202, (12, 3704) 180, 172, 155, 150, 141, 141, 112, 105, 90, 60, 55, 50 (20, 3581)	1245, 1147, 757, 201, 179, 140 (6, 3669)
T37	680, 585, 545, 405, 367, 232, 194, 163, 139, 125, 96, 96, 78	461, 412, 319, 297, 262, 240, 202, 180, (13, 3705) 172, 155, 150, 141, 141, 112, 105, 90, 60, 55, 50 (19, 3604)	1245, 757, 674, 532, 201, 179, 140 (7, 3728)

(a): nombre de bandes obtenues pour chaque profil et somme des tailles des fragments (pb).

# ANNEXE V. Fréquences des ribotypes dans les quatre populations tumorales

Les effectifs supérieurs ou égaux à 4 sont soulignés.

Fréquences des ribotypes des isolats de biovar1.

	ORL 2A		PEY 2A		PEY JT		PEY VP	
	nb	%	nb	%	nb	%	nb	%
<u>85 3</u>	<u>21</u>	48,8	<u>15</u>	31,9	4	12,1	<u>10</u>	18,5
<u>85 46</u>	<u>7</u>	16,3	3	6,4	<u>11</u>	33,3	<u>17</u>	31,4
<u>2177</u>	<u>8</u>	18,6	<u>17</u>	36,2	<u>11</u>	33,3	<u>8</u>	14,8
<u>2517</u>	<u>4</u>	9,3	0	0	0	0	0	0
85 69	2	4,7	2	4,3	0	0	0	0
85 104	1	2,3	1	2,1	0	0	0	0
<u>2516</u>	0	0	<u>4</u>	8,5	<u>5</u>	15,2	<u>4</u>	7,4
M15	0	0	1	2,1	0	0	0	0
M9	0	0	2	4,3	0	0	0	0
M182	0	0	1	2,1	0	0	0	0
M292	0	0	1	2,1	0	0	0	0
<u>B113 3</u>	0	0	0	0	2	6,1	<u>8</u>	14,8
A134 5	0	0	0	0	0	0	2	3,7
A68 20	0	0	0	0	0	0	1	1,9
A68 18	0	0	0	0	0	0	1	1,9
B89 11	0	0	0	0	0	0	1	1,9
B100 11	0	0	0	0	0	0	2	3,7
Total	43	100	47	100	33	100	54	100

Fréquences des ribotypes des isolats de biovar2.

	ORL 2A		PEY 2A		PEY VP	
	nb	%	nb	%	nb	%
<u>85 30</u>	2	50,0	<u>19</u>	70,4	<u>25</u>	75,7
<u>2520</u>	<u>5</u>	27,8	2	7,4	1	3,0
85 110	2	11,2	1	3,7	0	0
85 178	1	5,5	0	0	0	0
2178	1	5,5	0	0	2	6,1
M29	0	0	3	11,1	2	6,1
M62	0	0	1	3,7	0	0
M140	0	0	1	3,7	0	0
C104 12	0	0	0	0	3	0
Total	18	100	27	100	33	100

# ANNEXE VI. Fréquences des types plasmidiques dans les quatre populations tumorales.

Les effectifs supérieurs ou égaux à 4 sont soulignés.

Fréquences des types de plasmides Ti associés aux isolats de biovar1.

	ORL 2A		PEY 2A		PEY JT		PEY VP	
	nb	%	nb	%	nb	%	nb	%
<u>2516</u>	<u>27</u>	73	<u>17</u>	45	<u>14</u>	50	<u>25</u>	57
<u>2177</u>	<u>7</u>	27	<u>2</u>	23,5	<u>2</u>	7	<u>0</u>	0
M80	0	0	<u>1</u>	2,5	<u>1</u>	4	<u>4</u>	9
<u>1903</u>	0	0	<u>6</u>	16	<u>4</u>	14	<u>7</u>	16
<u>292</u>	0	0	<u>5</u>	13	<u>7</u>	25	<u>8</u>	18
Total	34	100	38	100	28	100	44	100

Fréquences des types de plasmides Ti associés aux isolats de biovar2.

	ORL 2A		PEY 2A		PEY JT		PEY VP	
	nb	%	nb	%	nb	%	nb	%
<u>2516</u>	<u>8</u>	80	<u>3</u>	13,5	-	-	<u>8</u>	31
2177	<u>1</u>	10	<u>0</u>	0	-	-	<u>0</u>	0
<u>M80</u>	<u>1</u>	10	<u>5</u>	23	-	-	<u>4</u>	15
<u>1903</u>	0	0	<u>14</u>	63,5	-	-	<u>14</u>	54
292	0	0	<u>0</u>	0	-	-	<u>0</u>	0
Total	10	100	22	100	-	-	26	100

# ANNEXE VII. Fréquence des génotypes dans les quatre populations tumorales

## Fréquences des génotypes des isolats de biovar1.

	ORL 2A		PEY 2A		PEY JT		PEY VP	
	nb	%	nb	%	nb	%	nb	%
<u>85 3 / pTi2516</u>	16	47	13	34	3	11	8	18
85 3 / pTi1903	0		1	2,5	0		2	4,5
<u>85 46 / pTi2516</u>	5	14,5	2	5	11	39	16	36
85 46 / pTi1903	0		0		0		1	2
<u>2177 / pTi2177</u>	7	20,5	2	23,5	2	7	0	
<u>2177 / pTi292</u>	0		5	13	7	25	8	18
2517 / pTi2516	3	9	0		0		0	
85 69 / pTi2516	2	6	0		0		0	
85 69 / pTi1903	0		2	5	0		0	
85 104 / pTi2516	1	3	0		0		0	
2516 / pTi2516	0		0		0		1	2
<u>2516 / pTi1903</u>	0		2	5	4	14	0	
2516 / pTiM80	0		0		1	4	3	7
M15 / pTi1903	0		1	2,5	0		0	
M9 / pTi2516	0		2	5	0		0	
M292 / pTiM80	0		1	2,5	0		0	
A134 5 / pTi1903	0		0		0		2	4,5
A68 18 / pTi2516	0		0		0		0	
A68 20 / pTiM80	0		0		0		1	2
B100 11 / pTi1903	0		0		0		2	4,5
Total	34	100	38	100	28	100	44	100

## Fréquences des génotypes des isolats de biovar2.

	ORL 2A		PEY 2A		PEY VP	
	nb	%	nb	%	nb	%
<u>85 30 / pTi2516</u>	5	50	0		3	11
<u>85 30 / pTi1903</u>	0		14	64	14	52
<u>85 30 / pTiM80</u>	0		4	18	4	15
85 30 / pTi2177	1	10	0		0	
2520 / pTi2516	1	10	2	9	0	
85 110 / pTi2516	2	20	0		0	
2178 / pTi2516	0		0		1	4
2178 / pTiM80	1	10	0		0	
M29 / pTiM80	0		1	4,5	0	
M29 / pTi2516	0		1	4,5	2	7
C104 12 / pTi2516	0		0		2	7
C104 12	0		0		1	4
Total	10	100	22	100	27	100

## **ANNEXE VIII. Comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques**

- Alignement entre les séquences nucléotidique des IS292 et ISR/1.
- Alignement entre les séquences nucléotidiques de l'IS292 et du Tc-DNA15955.
- Alignement entre les séquences nucléotidiques de l'IS292 et du fragment C25.
- Alignement entre les ORFs de l'IS292 et les séquences protéiques des bases de données NBRF et GenBank.

```

=====
Query sequence name      =      ;is292
Query sequence length    =      2494
Query seq. file name     =      is292
Search K-Tuple size      =          4
Subsequence length       =      5000
Database                  =      GenBank/EMBL DNA sequence database
No. top scores saved     =          30
No. sequences searched   =      1619
=====

```

```

-----
INSISRL1A      : Insertion sequence ISRL1 (from R.leguminosarum) complete seq

```

```

Sequence Length =      2495
Subsequence #    =          1
Initial score    =      476

```

```

1  TAAGCGGCAAGCTGACGCCGTTTCAGGCCTTGTAGCTCCACGGCATAAGAGTATGGATTTC      60
   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
2  TAAGCGACAAGCCGGGGCCGTTTCAGGCGGCTAGTTCATGGCATGAGGGCGTCGATTTC      61
   ^           ^           ^           ^           ^           ^           ^
61 GCTGCTAGGCCAGCCATTTGCGAGGCGCTCGAGCGTCTGCGTCAGCCAAGCCTGGGGATC      120
   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
62 ACTGTTGGGCCATCCATTCGCAAGGGCCTCAAGCGTCTGGGTCAACCAGGCTTGC GGATC      121
   ^           ^           ^           ^           ^           ^           ^
121 GACAGAATTCATCTTTGCAGTCTGCAGCAGCGACGCGATTGTGCGCCATGCCCTGCCTCC      180
   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
122 GACGGCATTCATCTTTGCCGTTTG CAGGAGCGTCGCGATGGTCGCCCAGTCCGGCCGCC      181
   ^           ^           ^           ^           ^           ^           ^
181 GCCGTCGCTGCCGGCAAAGAGACTGTTTTTCTTGTGATCGCCTGAGGTCTGATCGCTCG      240
   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
182 ACCGTCGCTTCCAGCGAATAGACTATTTTTTCTCGTGATCGCTTGGGGTCTGATTGCTCG      241
   ^           ^           ^           ^           ^           ^           ^
241 CTCGACGATGTTGGAGTCGAGCTCGACACGGCCGTCGGTCAGAAAGCGTTCGAAGACGTC      300
   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
242 CTCGACTATGTTGGAGTCGAGTTCGATCGGCCGTCGGTCAGGAAGCGCTCGAAGATGTC      301
   ^           ^           ^           ^           ^           ^           ^
301 ACGACGCTTGATCGAGTACCGTAGAGCTTCGGCGA-GATTGGATTGCTGATACTCGCG      359
   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
302 TCGACGCGAGATGGCATAACGCAGAGCCTCGGCGAGGTTTGGATTTCCAGAGACCCGCG      361
   ^           ^           ^           ^           ^           ^           ^
360 GCAAAGTCGTCTGCCAGAGAGTGAAGAGGCATCGGACTATCGCCGCCGAGCGTTCTTGTC      419
   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
362 GCAGGGTCGCCTGCCAGAGAGTGAAGAGGTCACGGACGATCGCTGCGGAGATCTCCTGGC      421
   ^           ^           ^           ^           ^           ^           ^
420 GGGCAGCGACACGCGCCTCAGGGCTTTGACCACGGACGGTATCTTCTATTTCCAGAGCG      479
   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
422 GTGCAGCGACACGAGCTTCAGGGCTTTGGGCGCGCACACGCTCCTCGATCTCCCATAAAC      481
   ^           ^           ^           ^           ^           ^           ^
480 TTGCCATTGCTCGAGGGTCTCTGTTGCCACCTTGAGCTTTTCGCGATATGCAATTCAT      539
   : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
482 TCGCCATACGCTCGACGGTGTCTGGTAGCGACTTTTCGAGCTCTTTCGACATGCAACTCGT      541

```

540	AGAACTTGCGACGGCTATGTGCCCAGCAGCCAGCCAGAACAACGCCGTCGTTGCCGCCCGT	599
542	AGAACTTTCTCCGGCTGTGCGACCAACAGCCGGCCAGGATGGCGCTGTTATTGCCTCCAT	601
600	CCTTGCGGACAAGCTTGCTGTAGGCCCCGTACCCGTCAACCTGCA-GAATCCGCGATAGC	658
602	CTTTCCGGACGAGCTTGTTATAAGCGGCATATCCATCGACCTGCAGGATTCCACGATAGC	661
659	CGCTGAGGTGCCGTGCCACGCAGTCGGTCGCCCGACTGTCTTCGAAGCGATAGGCCACCA	718
662	CGTTCAGGTGTGCTGCGACACACTCGGTGGCTCGACTGTCTTCGAAGCGATAGGCTACCA	721
719	TGGGCGGGCCATTGCCCTCCGAACGGTCGGTCATCCCTGGCATAGGCCACAGCCATGCGG	778
722	TCGGTGGACCGCTGCC-CCCAAAGTCGGTCATCCCTGGCATACGCCCATAGCCATGCCG	780
779	TTTTCGCCGACCCGGACCCAGGCGCCAGTGTGCGCAGGGTCGTCTCGTCGGCAAATATTC	838
781	TCTTCGCTGATCCGGAACCAGGAGCAAGTGTGGGCAAGGTCGTTTCGTTCGGCAAAGATCC	840
839	GTTCCGCCTTCTTGATTTCGTTTCAAGATGTAATCGGCGAGGATGTGCGAGCTCGAACCCCA	898
841	GTTCCGCCTTCTTGATCTCATCGAGGATGTAGTCGGCGAGGATATTGAGCTCGAACCCCA	900
899	GCTTTCCCATCCATTGAGCCATGAGCCTGCGGTTCGAGTTCGACCTTGTCGCGGGCGTAAA	958
901	GCTTGCCCATCCATTGAGCCATTAGCTTGC-GTCGAGTTCGACCTTGTCGCGTGCCTAGA	959
959	TCGCCTCCTGCCGATAGAGTGGTAGGCCATCGGCATATTTGGACACGGCGATCTGAGCCA	1018
960	TGGCTTCTCGCGATAGAGTGGCAGCCCGTCGGCATATTTGGAAACGGCGATCTGGGCCA	1019
1019	GAAGCGCTTCTGTTGGAATGCCCGCCTCAATGATATGTGTGCGGGCCGCGAGCCTGGATCA	1078
1020	GAAGTGCTTCCGTGGGAATGCCACCTTCGATGATGTGTGCCGGAGCCGCGCCTGGACGA	1079
1079	CGCCGTCTTCGTTCTTAAAGCGTATTTGGGACGGCGCGTAACAATGACACGGAACCTTCG	1138
1080	CACCATCCTCGTTTCTTAAAGGCATACTTCGGCCGGCGGGTGACGATGACACGGAACCTTCG	1139
1139	CTGCAACGACATCCAAGCGTTCGGGATATGTCCTCTCCGATCAGGATTTTGGTCTTACCC	1198
1140	CTGCCACGACATCCAGCGCTC-GGAGACGTCTTCGCCAATCAGGATCTTGGTCTTACCT	1198
1199	GCATGCTCCGGCAAATCTTCCGGCTCGATCACCACCTCGATACGCTCCAGATGCGCCGCA	1258
1199	GCATGTTCTGGAAGCTCTTCCGGTTCGATCACGACCTCGACGCGCTCAAGATGAGGCGCA	1258
1259	AAGCCCTTGCGTGGCCCTCGGTTGACGTTTGCCATCTTTGTT---GATGCCACTCGTAACC	1315
1259	AAGCCCTTGCGTGGCCCGGAGCGGTTTGCTGTCCGCGCTACCGCGGCCCTTCGTGACC	1318



1316	TTGGCCCTGATCGCCGCAATACCGGTCTCGATCTCCTCAAAGACAAAAGCATGCTGCTCG	1375
1319	TGAGCCTTGATCGTCGCAATGCCGGTCTCGATCTCTTGAAGACAAAGGCATGCTGCTCG	1378
1376	TCATC-AACACTGGCCGCTGCAAGTTTCTCTGAACGCCGTCCGAAGCGCGCGCGGTCAAA	1434
1379	TCATCGACCGGTGGATGATGCAAGCCTTTCCGAGCGTCGGCCAAATCGGGCGCGATCGAA	1438
1435	AGCTTTCAGGATC-TGTGTCAGCCGCTCGATGCGCTCATCGGCATCAGCATTTCGGGCCT	1493
1439	AGCCTTCAGGATCTTGCGTCAGCCGCTCGATGCGCTCATCGGCGTCCGCGTTGC-GGCCT	1497
1494	CGAGATCATCGACCTGCTTTTCCAAAGCCTCGACGCGAGCGGCCTTTTCGGCCATGGCAA	1553
1498	CTAGATCGTCAACCTGTTTCTCCAAAGCCTCGACGCGGGCTG-CTTTTGACAGTGGCAA	1556
1554	GAACCATGGCCTTGAGTGCCTCTACATCATCCGGGAGCTCTATATCGGGTCGCGTCATGG	1613
1557	GAACCATGGCTTTGAGAGCCTCTACATCATCCGGGAGCTCAATCTCGGGCCGCGTCATGG	1616
1614	GTATGATCAGAGCATATTTTGCTGTGATCCGCCCCGAGTTTCAGGTGCATGATTCAATTC	1673
1617	GTATGATCAGAGCATATTTTGCCGCGCTCCGCCCATGCTTTCAGGGACCTGATTCACCTC	1676
1674	GCCGCAGGGGTTTTACCCAAACAATCTCTGGTGGCTTGATGGGTGTTGATCGAACGCGTTT	1733
1677	GCCGCAGCGGTTTTACCCAAACAATCTCGGGAGGCTTCACCGGCGCGGATCGAACTCGCTT	1736
1734	CCAGTCCATTCCATCCACCAAAGCCAGAAGCTGGGCATTGTTGAGCTGGACCTGGCTGTG	1793
1737	CCAGTCCATTCCGTCGACCAAAGCCAGAAGCTGGGCATGATTGAGCTGGACGCGATGATG	1796
1794	TCCGATGCGCGGCCAGCAGAACTGGGCTTTCTCCAGCCGCTTGGCGTAAAGGCAAACGCC	1853
1797	GCC-ATCCGGGGCCAGCAGAACTGGGCTTTTTCCAGCCGCTTCGCATAGAGGCAAACGCC	1855
1854	GGAGCCATCCCACCATAACGATCTTGATACGGTCTGCTCGTTTCGCCCCGAAGACATAAAG	1913
1856	-GAGCCATCCCACCACACGATCTTGACTCGGTCTGCTCTCTTGGCCCCGAAAGACATAAAG	1914
1914	AGCTCCGTTGAACGGATCACTGCCAGCATCTCGAACCAGTGATAGCAAGCTGTCAGGTCC	1973
1915	TGCACCGTTGAAC-GATCACTGCCAGCATCCCGTACCAGCGAAAGCAAGCTGTCGGCCCC	1973
1974	TTACGGAAGTCGATCGGATGGCTCGCCAGAAAGACTTTCA-GTTCGACGGGATCATGCCG	2032
1974	TTTCGGAAGTCGATGGGATGGCTCGCAAGAAAGACCTTCACGCCGGACGGGATCATGCCG	2033
2033	ACGGACGCTC---GATCACGCGACTGAGGTGTGCTTCATCGGCATCCACCCCCGCCCGGA	2089
2034	ACCGCACCGCTCGGATCACCCGCTGCAGCTGTGCTTCGCCGATATCTGCGTCGGCACGGA	2093

[illegible]

```

=====
Query sequence name      =      ;is292
Query sequence length    =      2494
Query seq. file name     =      is292
Search K-Tuple size      =          4
Subsequence length       =      5000
Database                  =      GenBank/EMBL DNA sequence database
No. top scores saved     =          1
No. sequences searched   =          1
=====

```

ATACH5 : Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid pTi15955 T-DNA region

```

Sequence Length = 5000
Subsequence #   = 3
Initial score   = 42

```

```

      2 AAGCGGCA-----AGCTGACGCCGTTGAGGCTTGTAGCTCCACGGCATAA      47
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
4558 AGGCCGCAGGTCAGGCCGCCTGAGCACTCAGTGTCTTGGATGTCCAGTTCACGGCAGCT 4617
      ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^

      48 GAGTATGGATTTTCGCTGCTAGGCCAGCCATTTGCGAGGCGCTCGAGCGTCTGCGTCAGCC      107
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
4618 GTTGCTCAAGCCTGCTGATCGGAG---CGTCCGCAAGGTCGGCGCGGACGTCGGCAAGCC 4674
      ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^

      108 AAGCCTGGGGATCGACAGAATTCATCTTTGCAGTCTGCAGCAGCGACGCGATTGTCGCCC      167
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
4675 AGGCCTGCGGATCGATGTTATTGAGCTTGGCGCTCATGATCAGTGTGCCATGAACGCCG 4734
      ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^

      168 ATGCCCTGCCTCCGCCGTCGCTGCCGGCAAAGAGACTGTTTTTCTTGTGATCGCCTGAG      227
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
4735 CACGTTCAGCACAAACGATCCGATCCGGCAAACAGCCATGACTTCCTGCCGAGTACATAGC 4794
      ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^

      228 GTCTGATCGCTCGCTCGACGATGTTGGAGTCGAGCTCGACACGGCCGTCGGTCAGAAAGC      287
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
4795 CTCTGAGCGTTCGTTTCGGCAGCATTGTTTCGTCAGGCAAATCGGGCCGTCATCGAGGAATG 4854
      ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^

      288 GTTCGAAGACGTCACGACGCTTGATCGAGTACCGTAGAGCTTCGGCGAGATTGGATTTGC      347
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
4855 ACGTAATGCCATCCCATCGCTTGAGCATGTAATTTATCGCCTCGGCGACGGGAGAACTGC 4914
      ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^

      348 CTGATACTCGCGGCAAAGTCGTCTGCCAGAGAGTGAAGAGGCATCGGACTATCGCCGCCG      407
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
4915 GCGACAATTTCC-CCCCTCGGTTTCGAGCCAATCATGCAGC-----TCTTCGGCG 4964
      ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^

      408 AGCGTTCTTG-TCGGGCAGCGACACGCGCCTCAG      440
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
4965 AGTGACCTTGATCAGGCCACCGCCACGACCGCGG      4998
      ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^

```

TIPCDREG : Plasmid pTiC58 promoter-active fragment CD25 DNA.

Sequence Length = 209

Subsequence # = 1

Initial score = 36

```
711 GGCCACCATGGGCGGGCCATTGCCTCCGAACGGTCGGTCATCCCTGGCATAGGCCCACAG 770
    : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
    1 GTCGACC-----CGGGATCCGCGGCGATAATTCATAAG 33
      ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^

771 CCATGCGGTTTTTCGCCGACCCGGACCCAGGCGCCAGTGTG--GCAGGGTCGTCTCGTCG 828
    : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
    34 TAATGTAGTAATT----ACCTGATTTTATATTTCAATTTTATTGTAATATAATTTCAATT 89
      ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^

829 GC-----AAATATTCGTTCCGCCTTCTTGATTTTCGTTTCAGGATGTAATCGG 874
    : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
    90 GTAATAATATAAAAATAAATATCCCTTATGTGTTCTTGATTTTCGTTT----TGTATATGG 145
      ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^

875 CGAGGATGTCGAGCTCGAACCCCAGCTTTCCCATCCATTGAGCCATGAGCCTGCGGTCGA 934
    : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
    146 CTAGATTCCTCATCTGCCACGACGAGGAAATGCTACGGCGGGGCAA-----GTTCA 195
      ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^

935 GTTCGACCTTGTGCG 948
    : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
    196 GATC--CCGGGTGCG 207
      ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^
```

```

=====
Query sequence name      =      ;cecileorf7
Query sequence length    =      172
Query seq. file name     =      xavier/cecileorf7
Search K-Tuple size     =        2
Subsequence length      =     5000
Database                 =      GenBank Tra
No. top scores saved     =       30
No. sequences searched  =   88026
=====

```

```

-----
DABPS2.BPS2      :  D.ambivalens gene bps2

```

```

Sequence Length =    582
Initial score   =    102

```

```

      7  ELPDDVEALKAMVLAMAEKAARVEALEKQVDDLEARNADADERIERLTQILKAFDRARFG      66
      :: . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :
    345  ELDQISSEISKLMRSSELENRIESVKSTIDDLERQRREMEERFNRNAEYRVYDINDSI      404
           ^         ^         ^         ^         ^
      67  RRSEKLAAASVDDEQHAFVFEEIETGIAAIRAKVTSGINKDGKRQPRPRKGFAAHLE--R      124
           . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :
    405  NKRIEELKKKKDEYELAINGIPSTILNKISEKQKELQEVQKMVDDLEKEYMRRLTIAR      464
           ^         ^         ^         ^         ^
    125  IEVVIEPEDLPEHAGTKILIGEDISRTLGCRCSEVPCHCYAPSQIR                      171
           : : . . : . . : . . : . . : . . : . . : . . :
    465  EEFVKIANYLLKELEFDLRAEIDENDRLVVKRNDATLELRKLSSSER                      511
           ^         ^         ^         ^         ^

```

```

LOCUS      DABPS2      3381 bp      DNA      BCT      22-JAN-1992
DEFINITION D.ambivalens gene bps2
ACCESSION  X64202
KEYWORDS   bps2 gene.
SOURCE     Desulfurolobus ambivalens
  ORGANISM Desulfurolobus ambivalens
            Prokaryota; Bacteria; Mendosicutes; Archaeobacteria;
            Thermoproteales; Desulfurococcaceae.
REFERENCE  1 (bases 1 to 3381)
  AUTHORS  Kletzin,A.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-JAN-1992) A. Kletzin, Max-Planck-Institut fuer
            Biochemie, Am Klopferspitz 18a, D W-8033 Martinsried, FRG
  STANDARD full automatic
REFERENCE  2 (bases 1 to 3381)
  AUTHORS  Kletzin,A.
  JOURNAL   Unpublished
  STANDARD full automatic
COMMENT    *source: strain=DSM 3772;

```

overlap of sequenced fragments.

<RETURN> key to continue or ST to stop

```

FEATURES             Location/Qualifiers
 .PE1 CDS             complement(<1..514)
                      /note="ORF2"
                      /codon_start=1
                      /translation="MPRYAIIDSDTASDDTIAILLASKFFKLLGITIVAGNVKFENEI
                      KNALFTVEYFNLDVPVFIGSSRPIMGKWSTVEEVHGNNIGDVKIEPKISPEKEHAI
                      DAIIRLSKEYEGELEILAVSPLTNLALAYLKDPTIVKRIKKVWIMGGAFSRGNTTPIA

```





```
Sequence Length = 526
Subsequence #   = 1
Initial score   = 76
```

```
ENTRY          S33799          #Type Protein
TITLE          RNA-binding protein, nuclear - human
DATE          12-Aug-1993 #Sequence 12-Aug-1993 #Text 12-Aug-1993
PLACEMENT      0.0          0.0          0.0          0.0          0.0
SOURCE         Homo sapiens #Common-name man
ACCESSION      S33799
REFERENCE
#Authors      Crozat A., Aman P., Mandahl N., Ron D.
#Journal      Nature (1993) 363:640-644
#Title        Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in
               human myxoid liposarcoma.
#Reference-number S33798
#Accession    S33799
#Status       preliminary
#Residues     1-526 <CRO>
SUMMARY        #Molecular-weight 53426 #Length 526 #Checksum 9348
///
```

```

20 RFEGAPRQFRRRWSDDFKERAVAEAMEPGPSVSA-----IARRTRHYIHNNYSAGVMP      73
   : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
221 RENSLTTTFSSVNTRDFDGTGALEFPSEEILVEALERLNNIEFRGSVITVERDDNPPPIR    280
       ^             ^             ^             ^             ^             ^
       .             .             .             .             .             .
74 RAEQGGSSGACVCRGGFGAGLRA-----GGDRGGYRRRNYPGGGG      113
   : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
281 RSNRGGFGRGGFGRGGFGRGGFGRGGFSRGGFGGPRGGFGGPRGGYGGYSGGGYGG      334

```

```
ENTRY      A44401      #Type Protein
TITLE      nucleolar protein NOP3 - yeast (Saccharomyces
            cerevisiae)
DATE       30-Sep-1993 #Sequence 30-Sep-1993 #Text 30-Sep-1993
PLACEMENT  0.0      0.0      0.0      0.0
SOURCE     Saccharomyces cerevisiae
```









NOM : PONSONNET

(avec précision du nom de jeune fille, le cas échéant)

DATE de SOUTENANCE: 8/06/1994

Prénoms : Cécile

TITRE : STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS D'AGROBACTERIUM . APPORT À L'ÉCOLOGIE DES PLASMIDES TI

NATURE :

DIPLOME  
DE DOCT.DOCTEUR-  
INGENIEURDOCTORAT  
D'ÉTATDOCTORAT  
DE 3<sup>e</sup> CYCLE

Numéro d'ordre : 115-94

Spécialité : Microbiologie

Cote B.I.U. -LYON :

CLASSE :

**Résumé** *Agrobacterium* est une bactérie saprophyte du sol. Les souches pathogènes d'*Agrobacterium* sont caractérisées par la présence du pTi, plasmide conjugal support du pouvoir tumorigène. La structure génétique des populations naturelles d'*Agrobacterium* a été étudiée à partir d'une épidémie de crown gall sur peuplier afin de préciser le rôle de la dissémination des plasmides Ti sur le maintien des souches tumorigènes dans le sol.

L'épidémie étudiée concernait les pépinières d'Orléans origine de l'épidémie, et de Peyrat plantée en boutures de peuplier en provenance d'Orléans. Cette étude de la structure génétique des populations d'*Agrobacterium* nécessitait de prendre en compte les plasmides Ti et les fonds chromosomiques. La méthode de PCR-RFLP offre la possibilité de cibler, d'une part les fonds chromosomiques (opéron ribosomique), et d'autre part les plasmides Ti (région de virulence et T-DNA). L'analyse de l'opéron ribosomique par la méthode de PCR-RFLP permet une discrimination au niveau de l'espèce par le polymorphisme du gène 16S, et au niveau infraspécifique par le polymorphisme de l'intergène entre les gènes 16S et 23S (définissant les ribotypes). L'analyse du polymorphisme de la région comprise entre les gènes *trn* et *nos* du T-DNA a permis l'identification des plasmides Ti en cause dans l'épidémie étudiée.

L'identité des types de plasmide Ti et des ribotypes détectés dans les différentes populations d'*Agrobacterium* issues des deux pépinières étudiées a permis de confirmer le lien épidémiologique entre celles-ci. Les populations d'*Agrobacterium* sont caractérisées par la présence de différents génotypes d'abondances relatives variées. Cette complexité est déjà observable à l'échelle de la tumeur, avec des isolats de différentes espèces, types chromosomiques et types plasmidiques. Ces résultats ont permis de montrer l'intérêt de l'outil PCR-RFLP pour l'étude des populations d'*Agrobacterium*. La présence d'une population d'*Agrobacterium* majoritaire transmise par la plante ou par le sol, indique une prolifération des plasmides Ti par multiplication clonale des *Agrobacterium* tumorigènes prépondérante en conditions naturelles. Par ailleurs, il apparaît que les populations tumorales ayant été en contact avec le sol sont plus diverses. Cette diversité est due à la présence de différents génotypes minoritaires spécifiques à la pépinière de Peyrat hébergeant des types plasmidiques détectés dans la pépinière d'Orléans. Ce résultat, et le fait que différents fonds chromosomiques soient associés à un même type de plasmide Ti, suggèrent l'existence de transferts de plasmides Ti. D'autre part, un nouvel élément d'insertion, IS292, a été caractérisé dans les populations de plasmides Ti. Son rôle dans la diversité des plasmides Ti des populations d'*Agrobacterium* a été suggéré. La détection de cet élément dans différents génotypes composant les populations étudiées pose la question de l'importance d'événements de transposition dans la stabilité des génomes composant les populations naturelles d'*Agrobacterium*.

**MOTS-CLES :** *Agrobacterium*, population, plasmide Ti, PCR-RFLP, élément d'insertion, sol.

Laboratoire de recherches: Laboratoire d'Ecologie Microbienne du sol CNRS URA 1450, Université Claude Bernard- Lyon 1

Directeur de recherches : Philippe NORMAND

Président du Jury : Philippe NORMAND

Composition du jury : L. JOUANIN, J. PINON, P. NORMAND, H. BOUZAR, X. NESME

B.U. LYON 1 - SCIENCES/THESES



\*20028957\*