

École Nationale
supérieure de
Bibliothécaire
D.S.B.

Université ¹⁰⁹⁰
C. Bernard
Lyon 1
DESS _{Informatique}

Documentaire

Projet de recherche
Note de synthèse

1990

1990
ID
6

**COLE NATIONALE
UPERIEURE DE
BIBLIOTHEQUES**

**UNIVERSITE
CLAUDE BERNARD
LYON I**

**DIPLOME SUPERIEUR
DE BIBLIOTHECAIRE**

**DESS INFORMATIQUE
DOCUMENTAIRE**

**PROJET DE RECHERCHE
NOTE DE SYNTHÈSE**



**GUERISONS PLASMIDIQUES
CHEZ LES BACTERIES**

Hélène BREUL

Sous la direction de M. BALLY

Laboratoire d'écologie microbienne
Université de LYON I

MAI 1990

1990
ID
6

GUERISONS PLASMIDIQUES CHEZ LES BACTERIES

Breul Hélène

Résumé :

La guérison des plasmides des bactéries Gram négatives consiste à inhiber la réplication de l'ADN plasmidique grâce à l'utilisation de différentes méthodes : utilisation d'agents colorants, mutagènes, d'élévation de température et électroporation ainsi que l'étude de la cinétique de la croissance bactérienne. Chaque agent agit spécifiquement sur un groupe de plasmide.

L'utilisation des transposons a permis de déterminer le rôle des plasmides cryptiques.

Descripteurs :

Plasmide; Guérison; Bacteria; Transposon.

Abstract :

The cure of plasmids in Gram-negative bacteria consist in inhibiting the plasmid replication thanks to different methods : the use of curing agents, mutagens, the increase temperatures and electroporation as well as the kinetic study of the growth of bacteria. These agents are individually effective only against some plasmids.

The use of transposon has allowed to determine the role of cryptic plasmids.

Keywords :

Plasmid; Curing; Bacteria; Transposon.

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| I. RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE | 6 |
| I-1. Recherche manuelle | 6 |
| I-2. Recherche automatisée | 7 |
| I-2-1. Interrogation de la base PASCAL | 7 |
| I-2-1-1. <u>Présentation de la base de données</u> | 7 |
| I-2-1-2. <u>Interrogation</u> | 7 |
| a) stratégie | 7 |
| b) équation et résultats | 8 |
| I-2-2. Interrogation de la base BIOSIS | 9 |
| I-2-2-1. <u>Présentation de la base de données</u> | 9 |
| I-2-2-2. <u>Interrogation</u> | 9 |
| a) stratégie | 9 |
| b) équation et résultats | 11 |
| I-2-3. Interrogation sur CDROM de MEDLINE | 12 |
| I-2-3-1. <u>Présentation du CDROM</u> | 12 |
| I-2-3-2. <u>Interrogation</u> | 13 |
| a) stratégie | 13 |
| b) équation et résultats | 13 |
| I-3. Discussion des résultats de la recherche automatisée | 14 |
| I-3-1. Tableau de résultats | 14 |
| I-3-2. Comparaison et discussion | 14 |
| I-3-3. Accès aux documents primaires | 15 |
| I-4. Conclusion | 15 |
| II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE | 16 |
| II-1. Introduction | 17 |
| II-2. Guérison plasmidique par des colorants et des agents mutagènes | 18 |
| II-2-1. Les colorants | 18 |
| II-2-2. Les agents mutagènes | 20 |
| II-3. Méthodes de guérison liées à la cinétique de la croissance bactérienne, à l'élévation de la température et à la technique d'électroporation | 21 |
| II-3-1. Etude cinétique de la croissance bactérienne | 21 |
| II-3-2. Action de la température | 21 |
| II-3-3. Technique d'électroporation | 22 |
| II-4. Guérison par les transposons | 22 |
| II-4-1. Définition | 22 |
| II-4-2. Le transposon Tn5 | 23 |
| II-4-3. Le transposon Tn1 | 24 |
| II-4-4. Les gènes Sac | 24 |
| II-5. Conclusion | |
| III. BIBLIOGRAPHIE | 28 |

REMERCIEMENTS

Le sujet de cette synthèse bibliographique a été proposé par M. BALLY, chercheur au laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Lyon 1 qui a bien voulu m'aider de ses conseils. Je tiens à le remercier chaleureusement.

LA RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

- I - RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

Le laboratoire d'écologie microbienne de M. Bally s'occupe de l'interaction bactérie-plante dans la rhizosphère (lieu de relations privilégiées entre les microorganismes, la plante et le sol). Ces études portent sur des mesures d'activités microbiennes (fixation d'azote...), des études morphologiques (visualisation au microscope optique, électronique des racines inoculées par la bactérie) et biochimiques.

Mais les progrès récents sur l'étude de l'association bactérie-plante sont venus de la génétique avec l'implication de plasmides.

Le but de cette recherche bibliographique est de déterminer les types de guérisons plasmidiques chez les bactéries.

Il y a trois types de guérisons :

- par l'utilisation de colorants
- par des expériences d'électroporation, de cinétique et action de la température
- à l'aide de transposons.

On veut obtenir un maximum de références sur ces trois types de guérisons plasmidiques. Il convient pour cela d'effectuer une recherche manuelle et une recherche automatisée par l'interrogation de trois bases de données: PASCAL, BIOSIS, MEDLINE.

Un entretien avec Mr Bally qui travaille sur ce sujet m'a permis de clarifier le sujet et de dégager les termes nécessaires à la mise en place d'une stratégie d'interrogation.

I-1. Recherche manuelle

La recherche manuelle est le point de départ de toute recherche automatisée car elle permet de déterminer les mots importants qui entrent dans la définition du sujet pour pouvoir les utiliser ensuite comme mots clés lors de la recherche automatisée.

J'ai analysé cinq articles pertinents traitant des deux types de guérisons pour pouvoir en extraire des références bibliographiques concernant notre sujet. Avec cette méthode, j'ai recueilli 39 références que j'ai ensuite séparées en deux groupes correspondant aux deux types de guérisons (par les colorants et par les transposons).

Lors de l'analyse de ces références, nous avons remarqué que les colorants donnaient des références assez anciennes datant de 1960 à 1977. Nous avons donc trié les références en éliminant les articles trop vieux, ceux qui ne cernaient pas assez le sujet, ceux que Mr Bally avaient déjà dans le laboratoire et ceux qui étaient extraits de livres, références qu'on ne peut commander.

Le résultat de ce tri, nous a conduit à retenir 24 références dont 15 concernaient les agents colorants et 9 les transposons ou la cinétique.

L'analyse de quelques références nous a permis de déterminer les mots clés que l'on utilisera pour la recherche automatisée.

La recherche manuelle ne nous permet donc pas de récupérer des articles récents et de croiser les termes de recherche, ce qui va être possible avec la recherche automatisée. Celle-ci s'est aussi imposée car elle est plus rapide, moins fastidieuse, plus performante et exhaustive (si elle est bien menée !!)

I-2. Recherche automatisée

Il nous a été possible d'utiliser trois bases de données appropriées à notre étude: PASCAL, BIOSIS, MELDINE.

I-2-1. Interrogation de la base PASCAL

L'interrogation de la base PASCAL a été réalisée dans le cadre des travaux pratiques à l'ENSB sur le serveur Questel+.

I-2-1-1. Présentation de la base

Base multidisciplinaire couvrant tous les domaines scientifiques et techniques.

Domaines couverts:

Biologie: Biochimie - Biologie moléculaire et cellulaire - Immunologie - Génétique - Biotechnologies - Microbiologie - Zoologie - Ecologie - Physiologie - Psychologie...

Médecine: Pharmacologie - Toxicologie - Médecine clinique (toutes spécialités) - Pathologie expérimentale - Techniques d'exploration et de diagnostic - Traitements - Informatique médicale...

Disciplines fondamentales de la physique et de la chimie.

Terre. Océan. Espace.

Science de l'ingénieur: Informatique - Electronique - Energie - Génie chimique - Métallurgie - Génie mécanique - BTP - Industries agroalimentaires - Agronomie.

Période couverte: depuis 1973.

Nombre de documents: 6 500 000 + 500 000 réf./an. -
12 500 périodiques sont dépouillés

Nature: références bibliographiques.

Mise à jour: mensuelle.

Aide à la recherche: lexique, thésaurus, manuel d'utilisation PASCAL.

Publications: bulletins signalitiques.

Producteur: INIST/CNRS

Institut National de l'Information Scientifique et Technique
26, rue Boyer
75971 PARIS cedex 20
Tél. (1) 48-58-35-59 Téléx 220 880

Serveurs: Télésystèmes.
Accès vidéotex.

Logiciel d'interrogation : Queste

I-2-1-2. Interrogation

a) stratégie de recherche

Avant toute interrogation en ligne, il convient tout d'abord de bien définir les mots clés à utiliser.

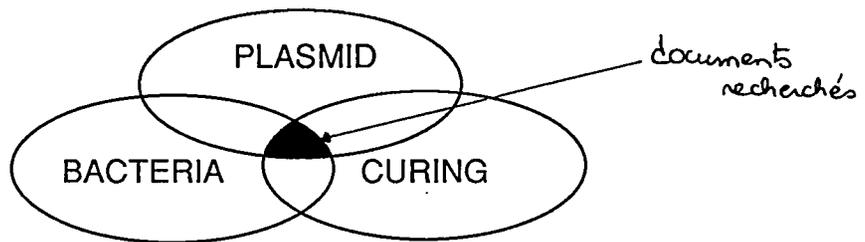
Cette détermination est effectuée au cours d'une discussion avec le

chercheur et en s'aidant des résumés et des mots clés donnés dans les articles obtenus lors de la recherche manuelle. De plus, le choix des termes d'interrogation a été guidé par l'utilisation du lexique PASCAL qui est une liste alphabétique de descripteurs contrôlés. Il s'agit d'un lexique de 9 000 termes, de noms chimiques et de descripteurs ajoutés automatiquement (biosystématique, géographique, enzyme etc...)

Les 3 mots clés que nous avons retenus sont:

PLASMID
CURING
BACTERIA

Pour notre sujet, il convient donc de faire l'intersection entre ces 3 mots clés. (voir le schéma ci-dessous)



Il nous faudra donc utiliser l'opérateur booléen: ET

Si avec cette stratégie, on obtenait trop de réponses, nous avons décidé de combiner cette étape avec chaque agent guérisseur.

b) équation et résultats

La recherche dans PASCAL peut se faire en langue anglaise ou française. J'ai d'abord essayé d'interroger en français mais n'ayant obtenu aucune réponse, il a donc fallu faire l'interrogation en anglais.

EQUATION

PLASMID? ET CURING ET BACTERIA

Le résultat de cette interrogation a donné 30 références. On a donc jugé inutile de recombinaison cette équation avec chaque agent guérisseur. En effet, il était plus facile et plus rapide de lire les 30 références et de faire un tri en fonction des mots clés et des rares résumés attribués à chaque référence.

Après dépouillement, sur les 30 articles obtenus, 18 articles étaient pertinents et on en a commandé 12 soit un taux de pertinence de 60%. Nous n'avons pas pris 6 articles pertinents car 3 articles avaient déjà été trouvés manuellement, les autres étaient soit trop difficiles à se les procurer soit faisaient double emploi avec d'autres articles sur le même agent guérisseur comme l'acridine orange, le SDS et le bromure d'éthidium... Les 18 références pertinentes proviennent de 13 périodiques différents.

I-2-2. Interrogation de la base BIOSIS

L'interrogation de BIOSIS s'est effectuée dans le cadre d'un stage de trois jours sur cette base à l'URFIST (Unité Régionale de Formation et de Promotion pour l'Information Scientifique et Technique).

I-2-2-1. Présentation de la base

Domaines couverts: BIOLOGIE; MEDECINE

Agriculture, Bactériologie, Botanique, Biologie, Biologie moléculaire, génétique, Immunologie, Nutrition, Pharmacologie, Zoologie.

Période couverte: suivant le serveur

Dialog: 1969

Datastar: depuis 1970

Nombre de documents: articles de 9 000 périodiques (Europe: 38%, Amérique du Nord: 25%, Asie et Océanie: 15%, Moyen Orient: 12%, Amérique du Sud et Centrale: 6%, Afrique: 6%)

Actes de congrès, rapports de recherche, ouvrages, brevets américains.

Volume: 5,7 millions + 480 000 réf/an.

Nature: références bibliographiques.

Mise à jour: Mensuelle.

Aide à la recherche: Biosis Search Guide 1989.

Publications: Biological Abstracts, Biological Abstracts/RRN (Reports, Reviews, Meetings).

Producteur: Biosciences Information Services (BIOSIS)
2100 Arch Street
PHILADELPHIA, PA 19103-USA
Tél: (215) 587 4800 Téléc: 831 739

Serveurs: Dialog
Datastar
STN depuis 1969
BRS depuis 1970

I-2-2-2. Interrogation

a) stratégie de recherche

La stratégie de recherche est plus complexe que celle de PASCAL.

Les mots clés que nous avons préparés pour notre recherche sont tout d'abord recherchés dans le Biosis Search Guide 1989 afin de vérifier leur contexte d'utilisation de la base.

Voici comment se présente les différents mots clés pour mon interrogation dans le Subject Index:

* CURE

KW CURE(460) CURED(060) CURES(20) CURING(250)
See also CURATIVE, HEADING, PRESERVE.

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de références que l'on trouve avec le mot clé utilisé. Pour ma recherche, l'utilisation du mot clé CURING seul (250 réf.) ne permettrait pas de récupérer un maximum d'articles sur le sujet. Il faut donc le combiner avec le mot clé CURE. Cette combinaison nécessite l'utilisation de l'opérateur booléen OR.

*** PLASMID\$ (9818)**

Pour ce mot clé, il n'y a pas de choix, on doit donc utiliser PLASMID\$.

*** BACTERIA**

KW BACTERIA\$ (32470)

CC BACTERIA

See CC under Bacteriology

BC BACTERIA

1979 see BC 04000-05916 et BC 09100-09114

Pour ce mot clé, la recherche est plus longue et plus compliquée.

• CC= Concept Code

Ces Concept Code permettent la compréhension de la structure de BIOSIS. En effet, à chaque descripteur du thésaurus est associé un code numérique.

Exemple: STUDIES (*1500)

* annonce que l'on a un Concept Code majeur c'est à dire qui illustre le sujet traité dans le texte. Un Concept Code mineur (sans *) indique une méthode ou une technique d'analyse.

Il faut donc se reporter dans la partie Concept Classification du guide de la base qui est organisé par domaine. C'est donc en recherchant chaque mots clés dans le bon domaine de notre recherche c'est à dire en bacteriology que l'on peut vérifier son usage. Je n'ai pas jugé utile d'utiliser ses Concept Code.

• BC= Biosystematic Code

Il permet le classement par espèce.

Il faut donc se reporter dans la partie Biosystematic Code du guide au numéro indiqué qui sont pour moi 04000 à 05916. On a donc la liste de toutes les espèces de bactéries avec leur codes.

Dans mon sujet, je ne recherche pas une espèce de bactérie déterminée. Il faudra donc lors de l'interrogation que je combine tous ces codes entre eux pour pouvoir couvrir toutes les espèces de bactéries.

Il arrive aussi que certains BC changent au cours du temps. Ce qui est le cas ici pour l'année 1979. Il faudra établir 2 questions pour chacune des différentes périodes avec chaque BC appropriés.

*** TRANSPOSON**

KW TRANSPOSON\$ (1400)

Ce mot clé n'a pas été utilisé pour l'interrogation sur la base PASCAL mais c'est aussi un moyen de guérisons.

b) équations et résultats

La recherche se fait en langue anglaise, sur le serveur Datastar où la troncature utilisée est \$.

1ère stratégie:

- 1 BC=06\$ or BC=07\$ or BC=08\$
- 2 BC=04\$ or BC=041\$ or BC=042\$ or BC=044\$
- 3 BC=045\$ or BC=047\$ or BC=048\$ or BC=049\$
- 4 BC=05\$ or BC=052\$ or BC=053\$ or BC=055\$
- 5 BC=056\$ or BC=057\$ or BC=058\$ or BC=059\$
- 6 2 or 3 or 4 or 5
- 7 CURING or CURE
- 8 PLASMID\$
- 9 7 AND 8
- 10 9 AND 1
- 11 9 AND 6
- 12 TRANSPOSON\$
- 13 10 AND 12
- 14 11 AND 12

Résultat: 0

Cette équation nous donne aucun résultat.

On n'a donc pensé que l'ordinateur ne pouvait pas combiner tous les BC car cela donnerait trop de réponses. Mais cela n'explique pas le résultat car une autre élève qui a fait ce stage a utilisé cette stratégie pour sa recherche un jour plus tôt et elle a obtenu des réponses.

N'ayant donc eu aucune réponse, j'ai décidé d'interroger par BACTERIA.

2ème stratégie

- 15 BACTERIA
Result 65 309
- 16 CURING or CURE
Result 3 997
- 17 PLASMID\$
Result 17 258
- 18 16 AND 17
Result 215
- 19 18 AND 15
Result 57
- 20 TRANPOSON\$
Result 1930
- 21 20 AND 19
Result 5

A la fin de cette recherche, j'ai obtenu 57 réponses (cf. résultat19).

La combinaison avec le mot clé TRANSPOSON n'a donné que 5 réponses (cf. résultat 21). En analysant les 5 articles obtenus (cf résultat19), on a remarqué qu'ils étaient déjà sortis dans les 57 réponses obtenues(cf. résultat 19). Cette interrogation (cf. question 20) a été faite pour voir si l'on

2/01/15

pouvait tirer des références supplémentaires, mais d'après les résultats obtenus cela n'a été le cas. Cette interrogation (cf. question 20) a été faite pour voir si l'on pouvait tirer des références supplémentaires, mais d'après les résultats obtenus cela n'a été le cas.

Après dépouillement, sur les 57 articles obtenus, 31 sont pertinents et on en a commandé 17, soit un taux de pertinence de 54,5%.

Les 31 références proviennent de 26 périodiques différents.

La plupart des articles qui constituent le bruit, correspondent à des meetings qui ne nous intéressent pas ainsi qu'à des ouvrages que l'on ne peut se procurer.

I-2-3. Interrogation sur CDROM de MEDLINE

L'interrogation de MEDLINE s'est effectuée à la BU de médecine pharmacie de Grange Blanche. En effet, on avait la possibilité de faire cette interrogation sur le CDROM ce qui permettait de ne pas avoir de coût en ligne.

I-2-3-1. Présentation du CDROM

Domaines couverts: BIOMEDICAL

Médecine clinique et expérimentale, Anatomie, Biologie, Bioingenierie, Dermatologie, Génétique, Hématologie, Immunologie, Pharmacologie, Biochimie, Psychologie, Médecine vétérinaire, Soins infirmiers.

Période couverte: depuis 1972.

Nombre de documents: articles de 3 200 périodiques publiés dans plus de 70 pays (100 périodiques sont en français). 69% des références sont en anglais.

Présence de résumé depuis 1975.

Volume: 5,3 millions +300 000 réf./an.

Nature: références bibliographiques.

Mise à jour: Semestrielle (2 disques par an).

Aide à la recherche: Medical Subject Headings (1989).

Publications: Index Medicus et bibliographies spécialisées dans différents domaines.

Producteurs: Dialog Informations Services, Inc.
3460 Hillview Avenue
Palo Alto, CA 94 304
800-3 DIALOG (800-334-2564).

I-2-3-2. Interrogation

a) stratégie

La stratégie de recherche est plus facile que celle faite en ligne. En effet, ici je n'utilise pas le thésaurus de Medical Science Headings (MeSH) pour déterminer mes mots clés à utiliser.

Il suffit d'inscrire le mot clé désiré ce qui nous envoie à une liste de mots clés qui sont apparentés à celui que j'ai inscrit. Il ne suffit plus alors qu'à sélectionner le ou les mots clés qui conviennent pour notre recherche et à les combiner grâce à l'opérateur booléen OR.

Exemple: pour le mot clé CURING, j'ai sélectionné:
CURING, CURED, CURE.

Pour que notre recherche soit complète, il faut relier chaque question avec l'opérateur booléen AND.

Pour éviter d'avoir trop de doublons avec les interrogations faites en ligne sur PASCAL et BIOSIS, j'ai limité l'interrogation aux disques des années 1989 et 1988.

b) équations et résultats

1er disque: Juillet-Décembre 1989.

1 BACTERIA
2 PLASMID or PLASMIDS and 1
3 CURING or CURED or CURE and 2

TOTAL: 1 réponse.

2ème disque: Janvier-Juin 1989.

1 BACTERIA
2 PLASMID or PLASMIDS and 1
3 CURING or CURE or CURED and 2

TOTAL: 6 réponses.

3ème disque: Janvier-Décembre 1988.

1 BACTERIA
2 PLASMID or PLASMIDS and 1
3 CURING or CURE or CURED and 2

TOTAL: 7 réponses.

En limitant notre recherche aux disques de 1989 et 1988, on a obtenu 14 références qui couvrent les années de 1989 à 1986.

Après dépouillement, sur les 14 références obtenues, 10 articles sont pertinents et 5 articles ont été commandés soit un taux de pertinence de 71,5%.

Les 10 références proviennent de 10 périodiques différents.

I-3. Discssion des résultats de la recherche automatisée

I-3-1. Tableau de résultats

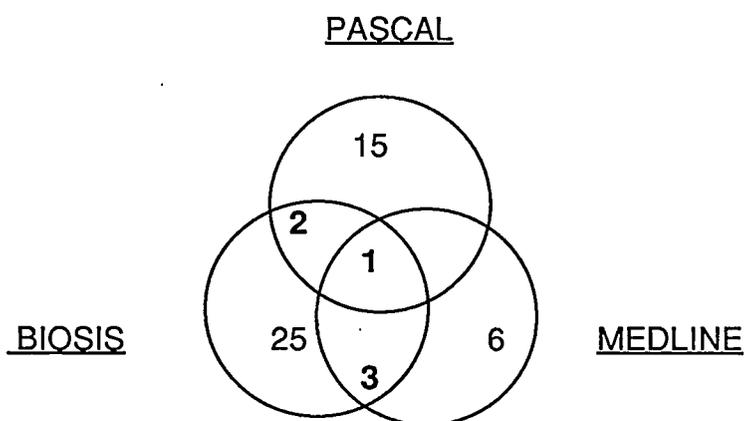
On peut regrouper les résultats obtenus dans les différentes bases de données dans un tableau récapitulatif:

| Bases de données | nombre de doc. sortis | nombre de doc. pertinents | taux de pertinence | nombre de doc. communs |
|------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------|-------------------------|
| PASCAL | 30 | 18 | 60% | Medline: 1 Biosis: 3 |
| BIOSIS | 57 | 31 | 54,5% | Pascal: 3 Medline: 3 |
| MEDLINE | 14 | 10 | 71,5% | Pascal: 1 Biosis: 3 |

I-3-2. Comparaison et discussion

Le tableau montre que l'interrogation des 3 bases de données PASCAL, BIOSIS et MEDLINE a été nécessaire pour obtenir un maximum de références récentes sur ce sujet.

Les 59 références obtenues se répartissent comme le montre le diagramme suivant:



Ce diagramme montre qu'une seule référence est commune aux 3 bases de données. C'est une référence datant de 1987. Ce faible taux de recouvrement est dû à la période couverte par chaque base. En effet, Pascal couvre une période de 1978-1988, BIOSIS de 1984-1989 et MEDLINE de 1986-1989.

C'est dans PASCAL que l'on trouve les références les plus anciennes.

Par contre, entre BIOSIS et MEDLINE, le taux de recouvrement est plus important (3 références): cela est dû aux périodes couvertes qui sont peu différentes.

La cause de l'absence de références entre PASCAL et MEDLINE est due à la couverture de chaque base de données. En effet, PASCAL s'intéresse davantage aux périodiques d'origine européenne alors que MEDLINE s'intéresse plutôt aux périodiques d'origine américaine.

Si l'on observe l'année 1988 (seule année qui peut être comparée) on a:

- 7 références pertinentes / 9 références sur BIOSIS
- 8 références pertinentes / 10 références sur MEDLINE
- 3 références pertinentes / 3 références sur PASCAL

D'après ces résultats, il a bien été nécessaire d'interroger ces 3 bases de données.

I-3-3. Accès aux documents primaires

Les bases de données permettent une recherche bibliographique rapide par opposition à la recherche manuelle. Mais ensuite, l'obtention des documents primaires, pour en effectuer la synthèse s'est révélée être une étape longue pour les documents qui ont été commandés.

Les autres documents c'est à dire la majorité ont été trouvés à la bibliothèque universitaire des sciences de Lyon 1 ainsi que dans la bibliothèque du laboratoire.

I-4. Conclusion

La recherche manuelle nous a donnée 24 références plus ou moins récentes.

Avec la recherche automatisée, nous avons obtenu 59 références.

La supériorité de l'interrogation en ligne par rapport aux instruments papier réside:

- dans l'abondance de descripteurs ou mots clés disponibles (souvent structurés dans un thésaurus).
- dans la possibilité de combiner les mots clés entre eux à l'aide d'opérateurs booléens (ET, OU, SAUF).
- dans la possibilité de chercher dans toute la base (et non pas par quinzaine ou par article).
- dans la rapidité d'accès aux références.

L'utilisation de plusieurs bases de données a permis d'accroître le nombre de documents pertinents et par conséquent, de diminuer le silence. En effet, presque chacune d'elles contenaient des références trouvées nulle part ailleurs.

Enfin, une bonne interrogation nécessite la connaissance parfaite des différents champs de la base et donc des lexiques se rapportant à chacun de ces champs. De plus, une fois l'équation de recherche établie, il faut pouvoir la moduler en fonction du nombre de références obtenues ce qui nécessite un apprentissage de l'interrogation et une bonne connaissance du sujet à traiter.

Tout au long de ce travail, le dialogue avec le chercheur s'est révélé être nécessaire. Cela a permis de bien cerner le sujet, de définir les mots clés les plus significatifs, de discuter les résultats obtenus et de sélectionner les références les plus pertinentes en fonction de ses propres préoccupations. Les bases de données apportent donc une aide précieuse aux documentalistes et aux chercheurs.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE
Guérisons plasmidiques chez les bactéries

- II - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

La synthèse bibliographique a été effectuée à l'aide des articles les plus pertinents et les plus récents, dans la mesure du possible.

En effet, on a sélectionné 25 articles qui couvrent les différents types de guérisons plasmidiques.

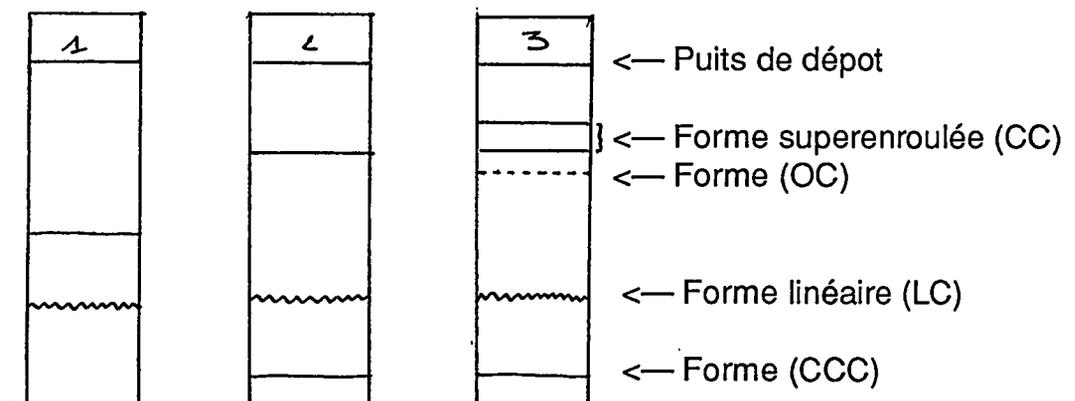
II -1. Introduction

L'équipe de M. Bally du laboratoire d'Ecologie Microbienne (URA697, CNRS) à l'université C.B. Lyon 1, travaille sur les interactions bactéries-planté dans la rhizosphère. La rhizosphère peut être définie comme cette zone d'interactions fortes entre la microflore et les racines de la plante. En effet, lorsqu'une plante entre en contact par ses racines avec le sol, elle induit localement des modifications importantes du milieu qui constituent une pression de sélection à laquelle les bactéries telluriques doivent s'adapter.

Les développements récents des recherches en génétiques bactériennes ont permis l'obtention et l'utilisation de mutants. L'étude de ces mutants a permis d'expliquer les mécanismes intervenant dans l'interaction bactéries-plantes. Les effets de ces interactions sont souvent le résultat de l'expression de gènes portés par des plasmides de taille moléculaire élevée. C'est par exemple le cas, des gènes codant pour la symbiose *Rhizobium* bactéries fixatrices de l'azote atmosphérique associées aux légumineuses. Ces gènes sont portés par des plasmides pSym de taille moléculaire très importante (> 1500 Md.).

Les bactéries de la rhizosphère possèdent des plasmides souvent de taille élevée. Ces plasmides contrairement aux pSym sont cryptiques c'est à dire qu'on ne connaît pas encore leurs fonctions. Leur étude en vue de leurs implications dans les mécanismes d'interaction plante bactéries est en cours. Ainsi, il a pu être mis en évidence dernièrement chez *Azospirillum* un certain nombre de propriétés d'adaptation à la vie rhizosphérique dont les gènes sont portés par des plasmides de grande taille. C'est le cas de la production d'exopolysaccharides nécessaire à l'attachement de la bactérie aux racines de la plante, de la production de mélanine permettant la détoxification par la bactérie des phénols produits par la plante et qui sans cette possibilité seraient toxiques.

Ces plasmides ont été mis en évidence par électrophorèse en gel d'agarose. La migration de ces plasmides en fonction de leur taille moléculaire a permis de les visualiser sous leur différentes formes (CCC, OC, LC).



ELECTROPHORESE

Il convient avant d'aborder le sujet de cette recherche de donner quelques définitions nécessaires à la compréhension des techniques utilisées.

Une **bactérie** est un organisme procaryote possédant un chromosome et un cytoplasme non différencié. Le chromosome bactérien est constitué d'un ADN circulaire double brin.

Plusieurs bactéries de différents types sont maintenant connus pour abriter un ADN plasmidique. (voir table 1)

Les **plasmides** sont des molécules d'ADN superenroulées extrachromosomal, autonome et autorépliatif. En effet, ils peuvent exister à l'état autonome mais peuvent aussi faire partie intégrante du chromosome bactérien. De plus, ils peuvent se trouver dans une bactérie en multiples copies (10 à 20) quand leur taille moléculaire est petite. Ils portent des gènes de résistance aux antibiotiques et des gènes codant pour les caractères non essentiels de la cellule hôte. Ils ne sont pas codés par le chromosome de la cellule. Leur réplication est indépendante du chromosome bactérien et lors de la phase de conjugaison, ils assurent la transmission des gènes entre bactéries. (voir figures 1 et 2).

Des expériences de guérison en utilisant des agents colorants, mutagènes, des transposons, des techniques d'élévation de la température, d'électroporation et d'étude de la cinétique permettent de déterminer par comparaison des souches bactériennes avec la souche parentale, le rôle des plasmides cryptiques de différentes bactéries Gram négatives.

II-2. Guérison plasmidique par des colorants et des agents mutagènes.

Le premier type de guérison plasmidique a été obtenu grâce à l'utilisation de colorants ou d'antibiotiques et d'agents mutagènes qui agissent tous deux en inhibant la réplication du plasmide.

II-2-1. Les colorants

**Acridine orange*

C'est une des méthodes les plus utilisées : c'est pourquoi on trouve le plus d'articles sur ce sujet.

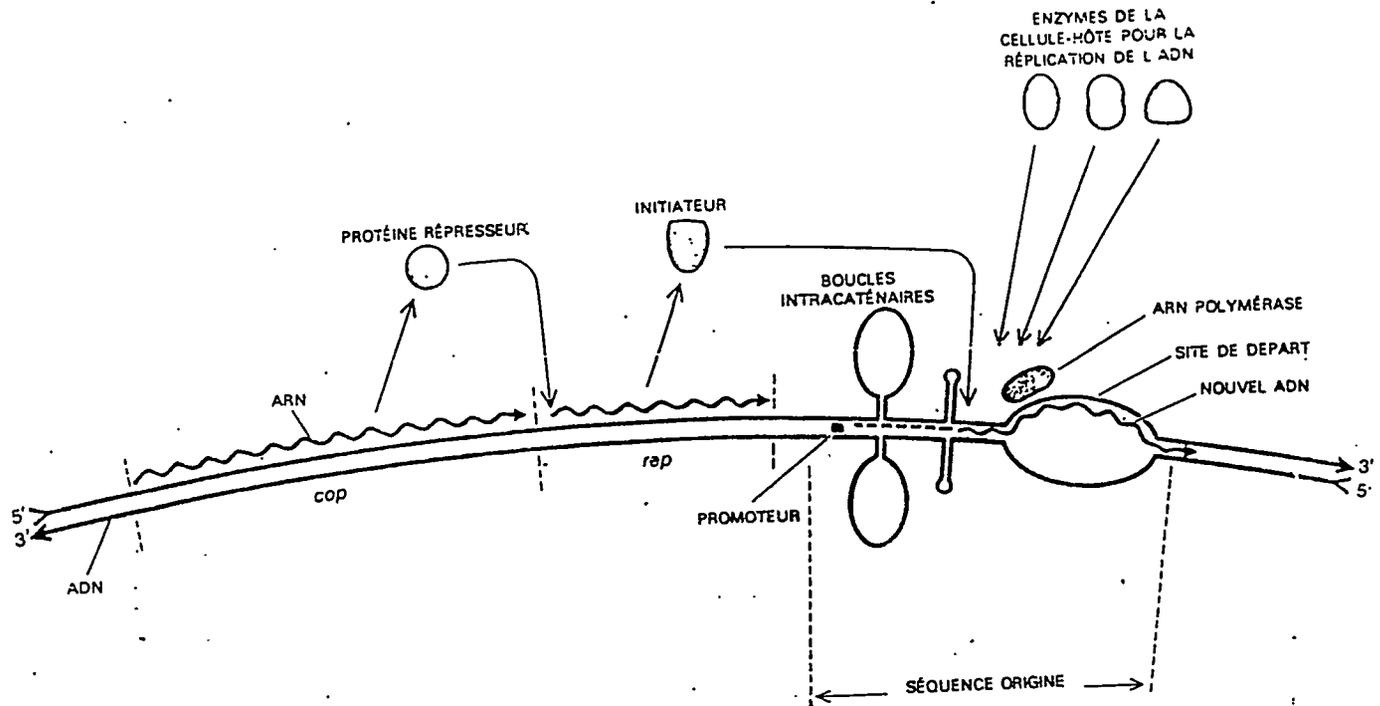
En étudiant l'action de l'acridine orange sur le facteur sexuel F⁺gal C1857 dans *Escherichia coli*, Hohn et Korn (1969) ont montré que ce colorant produisait un arrêt complet et immédiat de la réplication de l'épisome (facteur sexuel F⁺) ainsi que sa perte. En effet, ils ont émis l'hypothèse que l'acridine orange guérit le facteur sexuel dans les cellules d'*Escherichia coli* en bloquant l'attachement de l'épisome à son site de réplication et en prévenant l'initiation de la synthèse de l'ADN épisomial. Les résultats obtenus montrent que pendant la guérison avec l'acridine orange, il y a une coségrégation de l'épisome avec le chromosome parental bactérien.

Plus tard, Tomes et Kay (1984) ont élaboré une méthode simple et rapide permettant l'élimination des plasmides résistants aux antibiotiques des bactéries intestinales d'*Escherichia coli*. En effet, ils font pousser les bactéries sur une concentration subléthale d'antibiotiques et les sélectionnent grâce à la pénicilline ce qui aboutit à une guérison de 98%. De plus, ils montrèrent que cette méthode était aussi applicable avec quelques modifications pour les autres bactéries intestinales comme *Klebsiella pneumoniae*.

Cette méthode de guérison avec l'acridine orange a été utilisée pour traiter avec

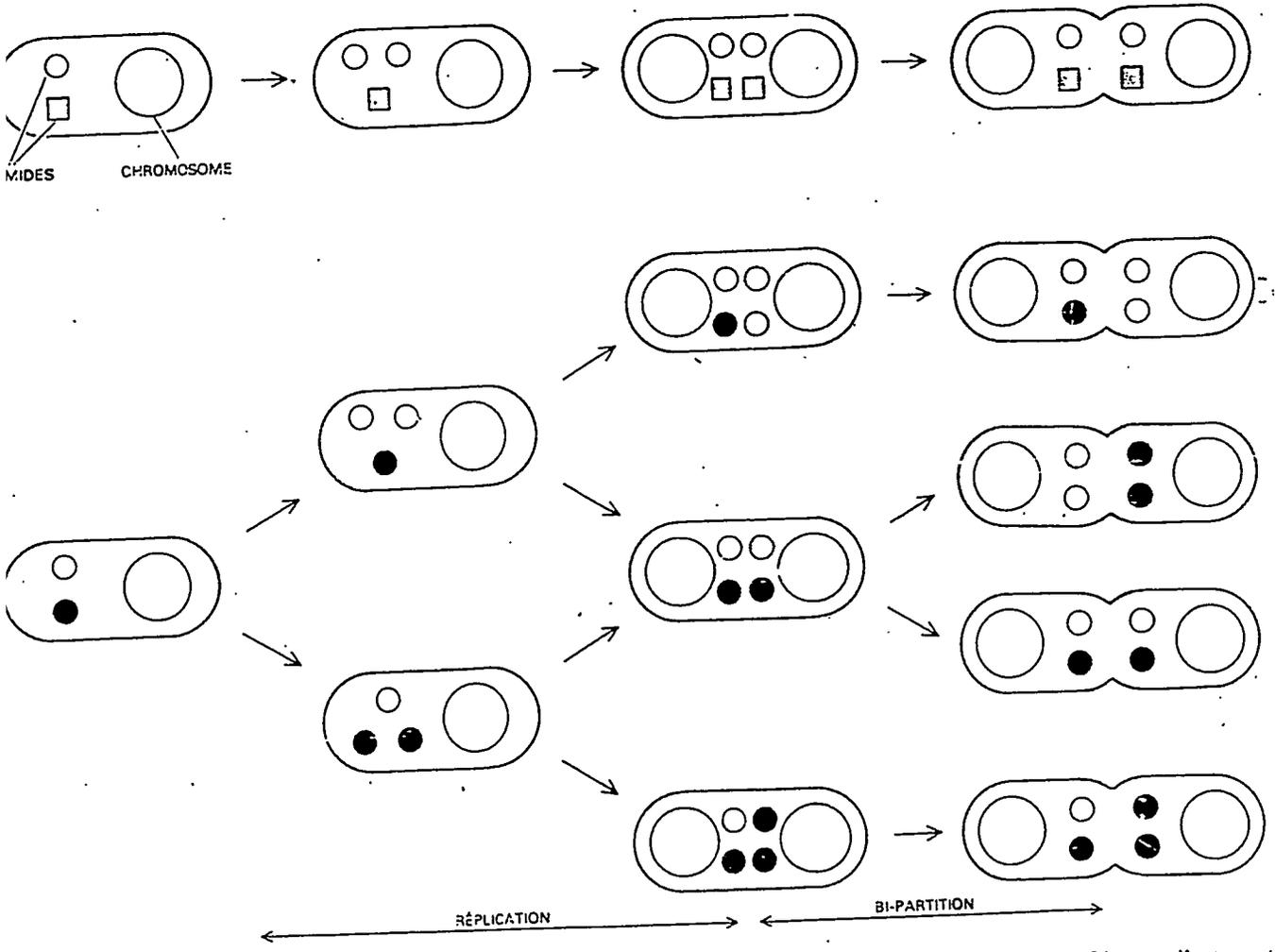
TABLE I
 Genera of bacteria in which plasmids or extrachromosomal DNA have been detected

| | |
|---|---|
| Phototrophic bacteria and blue-green algae | |
| <i>Rhodospseudomonas</i> | <i>Vibrio</i> |
| <i>Chromatium</i> | <i>Providencia</i> |
| <i>Anacystis</i> | <i>Aeromonas</i> |
| <i>Agmenellum</i> | <i>Haemophilus</i> |
| <i>Synechococcus</i> | <i>Citrobacter</i> |
| <i>Synechocystis</i> | |
| <i>Nostoc</i> | Gram-negative anaerobic bacteria |
| | <i>Bacteroides</i> |
| Gliding bacteria | |
| <i>Myxococcus</i> | Gram-negative cocci and coccobacilli |
| | <i>Neisseria</i> |
| Spiral and curved bacteria | <i>Acinetobacter</i> |
| <i>Campylobacter</i> | Gram-positive cocci |
| Gram-negative aerobic rods and cocci | <i>Staphylococcus</i> |
| <i>Pseudomonas</i> | <i>Streptococcus</i> |
| <i>Xanthomonas</i> | |
| <i>Rhizobium</i> | Endospore-forming rods |
| <i>Agrobacterium</i> | <i>Bacillus</i> |
| <i>Halobacterium</i> | <i>Clostridium</i> |
| <i>Alcaligenes</i> | |
| <i>Bordetella</i> | Gram-positive asporogenous rod-shaped bacteria |
| <i>Thermus</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| Gram-negative facultatively anaerobic rods | Actinomycetes and related organisms |
| <i>Escherichia</i> | <i>Corynebacterium</i> |
| <i>Salmonella</i> | <i>Mycobacterium</i> |
| <i>Shigella</i> | <i>Streptomyces</i> |
| <i>Klebsiella</i> | |
| <i>Enterobacter</i> | Mycoplasmas |
| <i>Serratia</i> | <i>Mycoplasma</i> |
| <i>Proteus</i> | <i>Acholeplasma</i> |
| <i>Yersinia</i> | |
| <i>Erwinia</i> | |



g.1 LA RÉGULATION DE LA RÉPLICATION DU PLASMIDE pourrait avoir lieu comme suggéré ci-dessus. Une protéine initiateur est codée par un gène de répliation (*rep*) dont l'activité est commandée par une protéine répresseur qui est elle-même codée par un gène de contrôle de copie (*cop*). L'initiateur reconnaît les boucles dans les deux brins d'ADN du plasmide; les boucles se forment par appariement intracaténaire des bases lorsque les brins sont dissociés

sous l'action de l'ARN polymérase, enzyme qui parcourt la séquence d'origine en commençant au promoteur, pour synthétiser un ARN qui servira d'amorce pour la répliation de l'ADN. Le complexe résultant, formé par l'initiateur et les boucles polymérase qui catalyse la synthèse de la cellule-hôte dont l'ADN polymérase qui catalyse la synthèse de l'ADN; ces enzymes permettent d'attacher de nouveaux nucléotides à l'amorce d'ARN, déclenchant un nouveau cycle de répliation.



LA RÉPLICATION ET LA BIPARTITION sont comparées chez des plasmides compatibles (a) et chez des plasmides incompatibles (b). Des plasmides non apparentés sont « compatibles » et peuvent exister dans une cellule. Ils peuvent se réplier à différents stades du cycle cellulaire; les deux types se réplient et les copies sont également réparties au cours de la division de la cellule. Des plasmides

étroitement apparentés sont « incompatibles ». L'un ou l'autre est choisi au hasard pour la répliation (*colonnes du milieu*) et est distribué au hasard au moment de la division de la cellule (*à droite*). c'est-à-dire que les copies sœurs du plasmide ne se séparent pas toujours l'une de l'autre. Il en résulte inévitablement la formation de lignées cellulaires dépourvues de l'un ou l'autre plasmide.

succès les Enterobacteriacées portant le plasmide F et ses dérivés (Hirota, 1960), le ColV-K94 (Kahn et Helinski, 1964) et certains plasmides résistants aux antibiotiques (Bouanchaud *and al.*, 1969).

Par contre, certains plasmides sont réfractaires à ce type de guérison comme ColE1, ColE2 (Kahn et Helinski, 1964), les plasmides résistants aux antibiotiques de FII et FI (Salisbury *et al.*, 1972) et pSC101 (Wechsler et Kline, 1980).

* *Coumermycine A1, novobiocine et chlorobiocine*

Ces trois antibiotiques sont des inhibiteurs de l'ADN gyrase bactérienne.

L'ADN gyrase bactérienne est une topo-isomérase de type II qui est capable d'introduire des supertours négatifs dans une molécule circulaire fermée, relâchée. Elle est faite de deux sous unités *gyrA* et *gyrB*.

La coumermycine A1, la novobiocine et la chlorobiocine inhibent l'ADN gyrase B.

La coumermycine élimine efficacement un nombre élevé de copies de ColE1 dérivés des plasmides pBR322 et pMB9 d'*Escherichia coli* K12. L'action «guérisseur» de la coumermycine semble résulter de la dégradation du plasmide et pas seulement de l'inhibition de la réplication (Danilevskaya et Gragerov, 1980).

La chlorobiocine élimine des plasmides de différentes tailles (R28K résistant à l'ampicilline, un mini plasmide dérivé de R1 drd-19) qui sont synthétisés par différents streptomyces (Cejka, Holubova et Hubacek, 1982).

Il est à noter que ces plasmides ont été traités auparavant sans succès à l'acriflavine, à la rifampicine et au bromide d'éthidium. Par contre, le plasmide ColE1 est resté résistant à la chlorobiocine.

* *La rifampicine*

La rifampicine, un inhibiteur de l'ADN polymérase, a été utilisée dans la guérison plasmidique d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*. L'effet de cet antibiotique est probablement une inhibition de l'ADN polymérase dépendant de la réplication de certains plasmides.

Cette technique a permis aussi la guérison du plasmide F et de ses dérivés dans *Escherichia coli* (Riva *and al.*, 1973).

* *Le SDS = Sodium DodecylSulfate*

La base de cette méthode de guérison est la différence de sensibilité au SDS des cellules d'*Escherichia coli* K12 abritant des plasmides résistants aux antibiotiques ou le facteur sexuel F avec des cellules sans plasmide ou F⁻. Les cellules porteurs de plasmides sont sensibles au SDS. (Tomoeda, 1968)

Cette technique a été employée pour guérir les Enterobactériacées du plasmide F (Tomoeda, 1968), le FII réfractaire à la guérison par les colorants (Tomoeda, 1968; Salisbury, 1972).

Elle a aussi été utilisée mais avec un succès moindre pour la guérison des plasmides de *Staphylococcus aureus* (Sonstein et Baldurin, 1972).

* *Sodium lauryl sulphate*

L'enrichissement des cultures bactériennes avec du Sodium lauryl sulphate amène la perte des plasmides de souches d'*Escherichia coli* pathogènes pour l'homme.

* *Ciprofloxacine et quinolones*

La ciprofloxacine et les dérivés 4 quinolones permettent l'élimination dans *Escherichia coli*, des plasmides résistants aux antibiotiques. Toutes les quinolones ont éliminé 3 plasmides résistants aux antibiotiques (R446b, R386, S-a) et un plasmide virulent (pWR105) mais plus lentement. Deux plasmides (pWR24 et pWR110) n'ont été éliminés que par la flumenquine et la péfloxacine.

La perte lente des plasmides peut être expliquée par l'induction du système ReCA. Ce système permet la réparation et la recombinaison mais aussi le blocage de la division cellulaire et prévient de l'élimination du plasmide (réponse SOS). De plus, l'impossibilité d'éliminer certains plasmides peut être due à leur présence en grand nombre par cellules (Michel-Briand *et al.*, 1986).

L'étude de l'action de la ciprofloxacine *in vivo* a été étudiée sur un plasmide d'une souche de *Serratia marcescens*. Elle permet l'élimination du grand plasmide de *Serratia marcescens* particulièrement quand il y a une réduction sensible de ciprofloxacine.

Cette étude *in vivo* montre une altération de la configuration du plasmide affectée par la ciprofloxacine, ce qui amène à la perte du plasmide (Mehtar and Blackemore, 1987).

* *Les composés cannabispéro*

Plusieurs composés cannabispéro et d'acide tétrahydrocannabidiolique ont été testés pour l'inhibition du transfert plasmidique F'lac d'*Escherichia coli*. En effet, tous ces composés, excepté l'acétylcannabispéro tuent sélectivement le plasmide porté par les bactéries. Ils inhibent la transformation avec l'ADN du plasmide de pBR322 ainsi que la pénétration de l'ADN plasmidique dans l'autre cellule pendant la croissance bactérienne.

Seuls 2 composés ont été capables de guérir le plasmide F'lac ce qui amène à conclure que l'élimination du plasmide dans ce cas est un processus qui dépend strictement de la configuration stéréochimique de l'agent guérisseur (Molnar *and al.*, 1986).

* *Le plumbagin*

Le plumbagin (5-hydroxy-2méthyl-1,4-naphthaquinone), un composé dérivé de la racine de la plante *Plumbago zeylanica* s'est révélé être efficace dans l'élimination sélective de plasmides multirésistants aux médicaments de souches d'*Escherichia coli*. Cependant, ces plasmides sont réfractaires au traitement à l'acridine orange ainsi qu'au SDS. (Lakshmi *and al.*, 1987)

* *Complexes de Platinum(II)*

Ces complexes de Platinum(II) éliminent les plasmides multicopies ayant comme origine de réplication ColE1 dans les souches d'*Escherichia coli* avec une fréquence de 100%. Cependant, les plasmides de ImcFI, H1 et des groupes X sont totalement réfractaires à ces agents. (Lakshmi *and al.*, 1988)

II-2-2. Les agents mutagènes

Une mutation est un accident aléatoire survenant au cours de la reproduction conforme. Elle décrit tout changement dans la séquence de l'ADN génomique. Les agents mutagènes sont des composés physiques (U.V.) et chimiques (Bromure d'éthidium, EMS, ..) qui induisent des mutations. Ils peuvent agir sur une base donnée de l'ADN, soit s'incorporer dans un acide nucléique.

On peut éliminer le Flac mérogénote d'*Escherichia coli* par des agents mutagènes. On montre, en effet, que le NMG (N-méthyl-N'-nitroguanidine), l'EMS (Ethyl Méthane Sulphonate) et les U.V. (Ultra Violet) sont des agents mutagènes

efficaces pour éliminer l'épisode Flac dans des cultures en croissance. La différence de temps de guérison observée résulte de la différence de stabilité des agents mutagènes (les périodes d'action efficace sont différentes), des différents produits utilisés et du transfert de l'épisode pour guérir les cellules. (Willetts, 1967)

L'étude de souches de bactéries isolées d'un lac de Suède révèle de multiples résistances aux antibiotiques et aux métaux lourds. Il a été montré que seule la souche parentale S-68 pouvait être guérie par l'un de ses deux plasmides. En effet, cette souche héberge 2 plasmides cryptiques pQQ32 et pQQ70 de 32 et 70 Mdal. Le pQQ70 a été séparé par un traitement au bromure d'éthidium (agent mutagène). De plus, cette souche montrait une résistance aux antibiotiques ainsi qu'aux métaux lourds comme Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+} .

La souche dérivée de S-68-41 perd cette résistance au nickel (Ni^{2+}), ce qui suggère la séparation du plasmide pQQ70 codant pour la résistance au nickel. (Schitt, 1989)

II-3. Méthodes de guérison liées à la cinétique de la croissance bactérienne, à l'élévation de la température et à la technique d'électroporation.

Les guérisons plasmidiques peuvent aussi être étudiées à partir d'analyses de la cinétique, de l'élévation de la température et de la technique d'électroporation.

II-3-1. Cinétique de la croissance bactérienne

La première méthode que l'on utilise est l'analyse du mode de répartition des plasmides bactériens pendant la division cellulaire d'après la cinétique apparente des cellules ne contenant pas de plasmide. Cette étude a été faite pendant la croissance exponentielle à la température non permissive pour la réplication d'un plasmide rep(ts). On obtient une régularisation de cette méthode si la distribution du nombre de copies à la division cellulaire est inconnue.

Ce même type d'expérience a été utilisé par Hashimoto-Gotoh et Ishir (1982) comme base de proposition d'un nouveau modèle : le «simple site inheritance model». Cette méthode ne doit pas donner de résultats concluants à moins que la distribution du nombre de copies à la division ne soit connue. Cette distribution peut être large à cause du contrôle du système de réplication et non seulement à cause du hasard de la répartition. (Nordström, 1984)

Un modèle mathématique sur l'effet des agents guérisseurs provoquant l'élimination plasmidique en fonction du taux de croissance dépendant de la densité et des transferts plasmidiques a aussi été étudié. Ce modèle a été testé sur les cinétiques de l'acridine orange guérissant le plasmide F'lac. On observe une population dynamique non linéaire de plasmides conjugués pendant les expériences de guérisons in vitro. Hohn et Korn (1969) concluaient qu'il n'y avait pas de sélection significative avec l'acridine orange pour les cellules ne contenant pas de plasmide. Mais, l'étude de la cinétique révèle une différence entre les taux de croissance de cellules abritant des plasmides et des cellules sans plasmide due à l'acridine orange. La valeur de ce coefficient de sélection est $s = 0.23 - 0.33$.

Donc, la comparaison des résultats de cinétique avec les résultats expérimentaux est importante pour l'étude de la guérison plasmidique. (Sykora, 1989)

II-3-2. Action de la température

Les gènes impliqués dans la nodulation des légumineuses et des non-légumi-

neuses *Parasponia sp.* ainsi que les gènes de la nitrogénase se trouvent sur un grand plasmide de *Rhizobium sp.*. Ce plasmide peut être guéri par l'incubation à une température élevée. (Morrison *and al.*, 1983)

L'élimination des plasmides pTT8 et pTF62 des bactéries respectivement *Thermus thermophilus HB8* et *Thermus flavus AT-62* a pu être faite grâce à des techniques impliquant la croissance de ces souches à une température élevée ou grâce à l'utilisation d'agents guérisseurs comme le SDS, le bromure d'éthidium, l'acridine orange et la novobiocine. (Vasquez *and al.*, 1983)

L'hexamine ruthenium(III) chloride (HRC) a été trouvée pour éliminer le plasmide pBR322 d'*Escherichia coli HB101* avec une fréquence de 100%. Cependant, ce plasmide n'a pas été éliminé par les autres agents curatifs comme l'acridine orange, la température... Il a alors été étudié la sensibilité d'un variant de ce plasmide à ces agents guérisseurs qui étaient inefficaces sur la souche parentale.

On sait que les mutations du chromosome sensibles à la température et d'origine plasmidique pourraient affecter la réplication de plasmide ColE1. Les températures que l'on utilise sont : 37°C, 42°C et 45°C. Bien que pBR322 était complètement vulnérable au traitement HRC, il est totalement réfractaire au traitement avec l'acridine orange et la rifampicine. L'élévation de la température (42°C et 45°C) n'affecte pas le pBR322 (0% de guérison). Mais, si on utilise une variante de pBR322, on observe une augmentation de la fréquence de guérison (37°C = 14,1% et 42°C = 38,7%). Donc, le plasmide variant obtenu après traitement avec le HRC, est devenu vulnérable aux agents guérisseurs ainsi qu'à l'élévation de la température. (Durga *and al.*, 1987)

II-3-3. Technique d'électroporation

L'électroporation est une technique qui utilise un courant électrique faible et pulsé pour fragiliser la membrane d'une cellule afin de la transformer avec des fragments d'ADN hétérologue ou de fusionner des cellules entre elles (électrofusion).

La technique d'électroporation a récemment révolutionné la transformation bactérienne. Il a été montré de même que l'électroporation pourrait être utilisée comme une méthode rapide de guérison plasmidique. Contrairement aux méthodes de guérison plasmidique classiques qui requièrent plusieurs repiquages avec la présence d'agents guérisseurs dans un premier temps dans un milieu non sélectif puis le transfert dans un milieu sélectif pour déterminer les clones guéris.

La guérison du plasmide pUG2 d'*Escherichia coli DH1* a été effectuée par la technique d'électroporation. Le courant électrique envoyé est de 2,50 kV, 25µF. Avec cette technique, on a obtenu une fréquence de guérison de 80 à 90% pour le plasmide pUG2 dans DH1 ce qui est considérablement élevé par rapport à la fréquence normalement obtenue en utilisant une technique de guérison traditionnelle.

Cette technique d'électroporation est couramment utilisée pour la guérison plasmidique pour d'autres genres de bactéries. (Heery *and al.*, 1989)

II-4. Guérison par les transposons

III-4-1. Définition

Un transposon est une séquence d'ADN capable de se répliquer et d'insérer une de ses copies à un nouveau site dans le génôme à l'aide d'une enzyme, la transposase.

Il est constitué de gènes codant pour les protéines situées entre deux séquences

d'insertion répétées inversées.

L'événement de transposition lui même peut causer des délétions ou des inversions ou peut conduire au transport d'une séquence de l'hôte vers une nouvelle localisation.

Certains transposons portent des marqueurs de résistance aux drogues ou autres en plus des fonctions impliquées dans la transposition.

La présence d'un transposon provoque une mutation car le transposon se place généralement au milieu des gènes. Cette mutation permet d'identifier le transposon car la bactérie devient résistante à l'antibiotique.

La guérison plasmidique peut s'effectuer grâce aux méthodes de mutagenèse:

- mutagenèse dirigée par un gène connu
- mutagenèse au hasard par conjugaison.

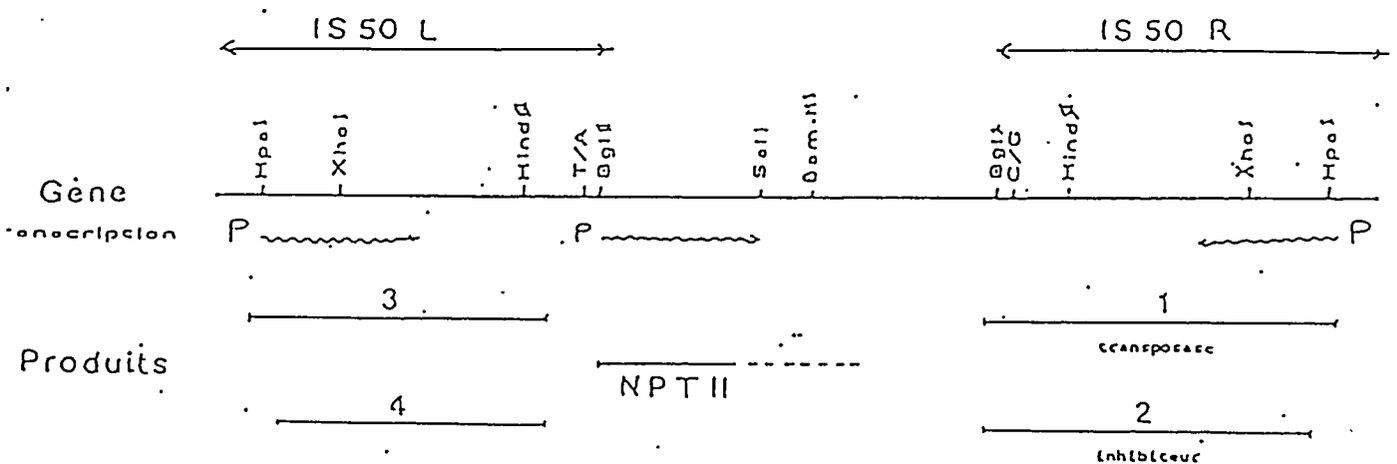
Dans ce dernier cas, il s'agit d'un marquage au hasard du génôme bactérien sans préjuger du gène marqué. Ce gène peut être situé soit sur le chromosome, soit sur un plasmide. Le pourcentage de plasmides marqués est fonction du contenu et du nombre de copies de plasmides de la bactérie étudiée.

Cette méthode nécessite le choix d'un bon marqueur et d'un bon vecteur plasmidique pour l'amener dans la bactérie. Le marquage du plasmide peut être effectué grâce aux transposons tels que Tn5 et Tn1 qui sont porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques ou de gènes suicides (gènes Sac).

II-4-2. Le transposon Tn5

C'est un transposon qui est constitué d'une région centrale qui porte le(s) marqueur(s) de résistance (qui sont sans rapport avec la transposition), bordée de chaque côté par des bras (IS). Les bras sont constitués de séquences proches qui peuvent être soit dans la même orientation, soit dans l'orientation opposées (le plus fréquent). (Cf. figure 3)

FIGURE 3 : CARTE PHYSIQUE ET FONCTIONNELLE DU TN5



Le Tn5 a été choisi parmi les autres transposons pour la guérison car

- il code pour la Néomycine phosphotransférase(NPTII).
- sa fréquence de transposition est loin d'être négligeable, notamment sur les plasmides.
- sa spécificité d'insertion est faible.

Le marquage de l'ADN chromosomique par un élément transposable Tn5 lui confère un phénotype particulier : la résistance à la kanamycine-néomycine.

Pour pouvoir utiliser ce transposon et l'insérer dans un plasmide, il faut utiliser des vecteurs plasmidiques de large spectre d'hôte et incapable de se répliquer dans la cellule hôte. Ces vecteurs ont permis d'insérer ce transposon sur des plasmides de beaucoup de souches bactériennes. Les marqueurs d'antibiotiques ou les phénomènes d'incompatibilité ont ensuite permis de guérir la souche ayant intégrée ce transposon par conjugaison et transposition dans le génôme d'un ou de plusieurs plasmides.

Le transposon Tn5 a été inséré dans des plasmides transmissibles de la souche 1062 de *Rhizobium leguminosarum* (un dérivé de la souche 300). On obtient plusieurs dérivés résistants à la kanamycine qui sont deux petits plasmides (pRL8JI et pIJ1001). Les dérivés sensibles à la kanamycine (chacun guéri de pRL8JI ou pIJ1001) semblent induire les nodules de la fixation de l'azote et ne sont pas phénotypiquement distincts de la souche parentale. Quand on transfère le transposon Tn5 marqué de pIJ1001 dans une souche de *Rhizobium phaseoli*, la majorité des transconjugants perdent leur habilité de noduler les haricots *Phaseolus*, l'hôte normal de cette espèce. Cela est dû à la perte dans *Rhizobium phaseoli* du plasmide de nodulation, lequel était apparemment incompatible avec pIJ1001. (Johnston *and al.*, 1982)

Azospirillum lipoferum 4B est une bactérie qui possède 5 plasmides cryptiques dont 4 ont une taille moléculaire supérieure à 140 Mdal.

Pour étudier la guérison plasmidique, il faut faire un marquage de l'ADN plasmidique par un élément transposable Tn5-Mob qui confère au plasmide-hôte le phénotype sélectionné (Km-Mob et Nm-Mob). Plusieurs plasmides suicides ont été utilisés pour transférer le Tn5-Mob à *Azospirillum lipoferum*. (Cf. figure 4). Les mutants obtenus par l'insertion de Tn5-Mob ont été utilisés dans des conjugaisons bactériennes avec une souche receveuse d'*Agrobacterium tumefaciens* sans plasmide (Cf. figure 5). Des expériences de guérison, en utilisant des antibiotiques comme marqueurs (rifampicine, ampicilline,...) ont alors été effectuées. La mobilisation, le transfert et la réplication d'un plasmide d'*Azospirillum lipoferum* chez *Agrobacterium tumefaciens* ont été trouvés pour la première fois. De plus, un transconjugant qui avait perdu un plasmide indigène a été trouvé.

Il est possible que l'insertion du transposon Tn5-Mob inactive un transfert de gènes ou que le transfert de plasmide de *Azospirillum lipoferum* dépende d'une induction comme cela a été rapporté pour le plasmide Ti avec la présence d'opines. (Bally, 1988)

II-4-3. Le transposon Tn1

Il fait partie de la famille des transposons TnA. Il confère au plasmide hôte la résistance à l'ampicilline.

Acetobacter xylinum contient un système complexe de molécules d'ADN plasmidique. L'analyse d'une souche particulière contenant une insertion du transposon Tn1 a indiqué l'existence d'interactions complexes entre les plasmides et l'ADN chromosomal.

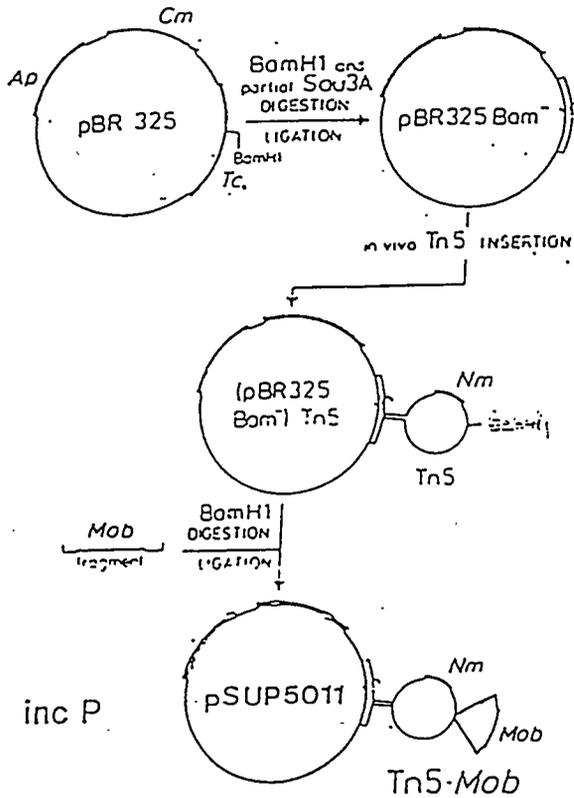
Ces expériences montrent que le système génétique de *Acetobacter xylinum* est inhabituel si on le compare avec le système génétique des autres bactéries. (Valla, 1987)

II-4-4. Les gènes Sac

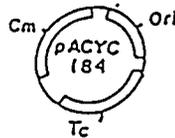
Il a été construit une cassette nptI-sacB-sacR.

Le système de gènes sacB-sacR utilisé est issu de *Bacillus subtilis*. Le gène sacR est un locus de régulation agissant comme un atténuateur. Le gène sacB code pour l'enzyme levansucrose et a été montré pour conférer la sensibilité au

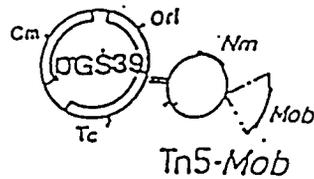
Fig.4 Construction des vecteurs suicides pGS81 et pSUP5011



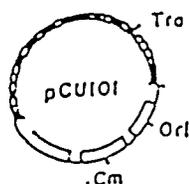
D'après Simon (1984)



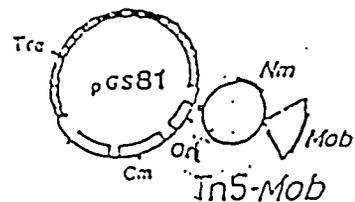
Tn5-Mob



D'après Iyer (communication personnelle)

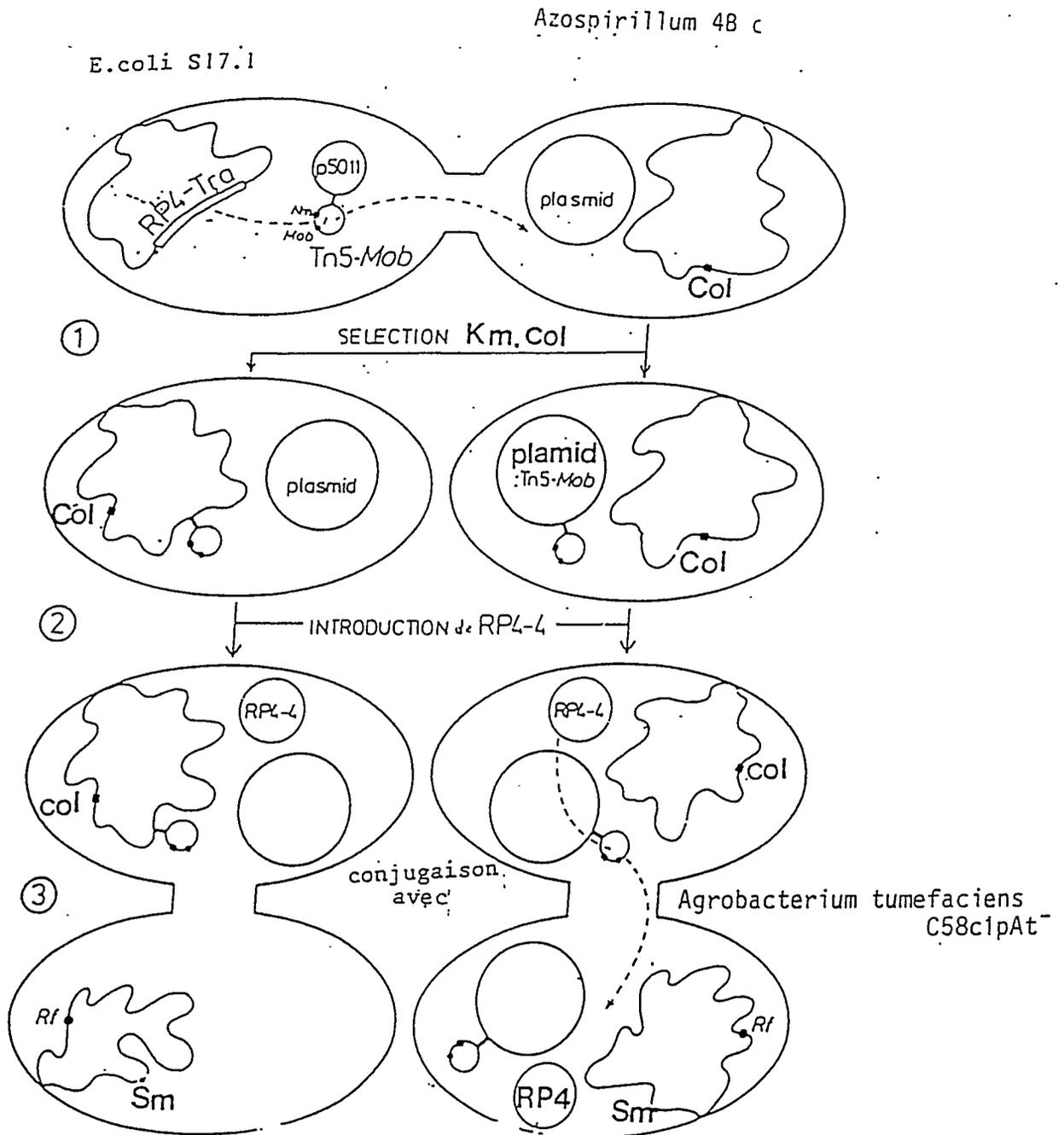


$\xrightarrow{\text{ClaI EcoRI Ligation}}$
 pGS81 (Tra, Ori, Cm) Tn5-Mob



inc N

Fig. 5 : Schéma de mobilisation des plasmides d'*Azospirillum lipoferum* 4B dans *Agrobacterium tumefaciens*



1: Introduction du Tn5-Mob par conjugaison entre la souche donneuse *E. coli* S.17.1 et les souches rhizosphériques (*Azospirillum lipoferum*, 4B): les gènes de transfert du RP4 clonés dans le chromosome permettent la mobilisation du plasmide suicide (pSUP5011) dans la souche receveuse (4B) où la disparition du vecteur et l'intégration du Tn5-Mob sont observées. 2 types de transconjugants sont décrits: l'insertion peut avoir lieu soit sur le chromosome soit sur le plasmide.

2-3: Conjugaison triparentale entre *E. coli* K12.J5-3 (RP4.4), les transconjugants Tn5-Mob et la souche receveuse C58C1pAt⁻. Les gènes de transfert du plasmide mobilisateur activent en trans la région Mob insérée dans le plasmide d'*Azospirillum* et ainsi permet son transfert dans *Agrobacterium*.

sucrose chez les bactéries Gram négatives.

Avec ce système, on veut montrer que les gènes *Sac* constituent un outil puissant pour la guérison plasmidique et l'apparition de délétions dans les plasmides.

Donc, les gènes *sacB-sacR* permettent la sélection directe pour la perte ou pour la guérison de plasmides car seules les souches qui ne contiennent plus un gène *sacB* actif sont capables de pousser sur un milieu contenant du sucrose.

Les gènes *sacB-sacR* ont été clônés dans un fragment *BamH1* du transposon *Tn5-Mob*. Les transposons ont été alors testés dans 4 souches de *Rhizobium leguminosarum* et dans 2 souches de *Rhizobium meliloti* ce qui a permis la guérison de plusieurs larges plasmides cryptiques et la génération de grandes délétions dans plusieurs autres plasmides.

De plus, cette méthode a permis de montrer que les plasmides de *Rhizobium leguminosarum* *pRL12JI* et *pR1eVF39f* portent des marqueurs d'auxotrophie et que le plasmide *pR1eVF39c* porte des gènes qui affectent la morphologie de la colonie. (Hynes *and al.*, 1989)

II-5. Conclusion

Il en résulte que la bactérie peut donc être traitée avec des agents guérisseurs tels que les colorants, les antibiotiques, des agents chimiques ou physiques ou par élévation de la température pouvant entraîner des mutations dans l'ADN en interférant soit spécifiquement avec la réplication ou en affectant des organites particuliers ou des enzymes de la cellule bactérienne.

Bien que tous ces agents aient été utilisés pour guérir les bactéries de leurs plasmides, ils ont des effets différents en fonction de la souche bactérienne étudiée. Ainsi, le plasmide F est éliminé par l'acridine orange, le SDS et la rifampicine alors que d'autres plasmides sont réfractaires à ces agents (Ex. *pBR322*).

Cependant, *pBR322* peut être éliminé de sa cellule hôte *Escherichia coli* avec la coumermycine A1 et le HRC.

L'action des différents agents guérisseurs sur le(s) plasmide(s), le lieu où ils agissent et leur fréquence de guérison est récapitulée dans le tableau ci-dessous.

| Colorants Techniques | Bactéries | Plasmides | Fréquence de guérison |
|--------------------------|------------------------------|---|------------------------------|
| Acridine orange | -E.Coli -intestinales | -résistant aux antibiotiques -facteur sexuel F | 98% |
| Coumermycine A1 | -E.Coli C6000 -E.Coli K12 | -ColE1 dérivé de pMB9 -ColE1 dérivé de pBR322 | 90% 20 à 100% |
| SDS | -E.Coli K12 | -Facteur sexuel F -résistant aux antibiotiques | 99 à 100% |
| Ciprofloxacine (2 µg/ml) | -Serratia marcescens | -résistant aux antibiotiques | jusqu'à 50% |
| Fluméquin | -E.Coli | - pWR24 - pWR110 | 21% |
| Péfloxacin | -E.Coli | - pWR24 - pWR110 | 4% |
| Novobiocine | -E.Coli | - R446b | 98% |
| Quinolone | -E.Coli | - R446b -R38b - S-a | 30% |
| HRC | -E.Coli HB101 | - pBR322 | 100% |
| complexe Platine(II) | -E.Coli | - pBR322 - pBR329 | 100% |
| Plumbagin | -E.Coli | - F'lac - TP181 | 48% 100% |
| Electroporation | -E.Coli DH1 | -PUG2 | 80 à 90% |
| Température | -E.Coli HB101 | variante de - pBR322 | 14,1% à 37°C 38,7% à 42°C |

L'étude de la cinétique a permis de comparer des courbes avec les résultats expérimentaux pour mieux comprendre la guérison plasmidique. De plus, il a été découvert récemment une technique plus rapide qui est l'électroporation et qui augmente la fréquence de guérison.

Enfin, l'utilisation de transposons Tn5, Tn1, gènes Sac a permis de déterminer le rôle des plasmides cryptiques.

Il existe une autre technique qui permet aussi la perte du plasmide grâce à l'utilisation de protoplastes. En effet, les expériences faites sur *Staphylococcus aureus* (Novick, 1980) et *Streptomyces coelicolor* (Hopwood, 1981) suggèrent que la perte du plasmide peut résulter directement de l'enlèvement de la paroi cellulaire bactérienne peut être à cause de la perte associée du matériel mésosomal.

Cette méthode pourrait être applicable à toutes les formes variées de bactéries c'est à dire aux bactéries Gram positives qui sont relativement facilement convertibles en protoplastes par le traitement de la penicilline avec le lysozyme ainsi qu'aux bactéries Gram négatives et *Streptomyces* pour qui les procédures complexes de protoplastes ont été développées.

. Les bactéries Gram positives et Gram négatives se distinguent par la technique de coloration dite de Gram qui exprime la capacité qu'ont certaines bactéries de fixer le colorant appelé cristal violet, propriété que les Gram négatives n'ont pas contrairement aux Gram positives.

Cette propriété est due à la structure de leurs membranes (Cf. figure 6).

Les bactéries Gram positives les plus utilisées pour les guérisons plasmidiques sont les *Lactobacillus* (Schillinger, 1989), les *Streptococcus salivarius* guéris par la novobiocine (Tampkins, 1986), *Bacillus subtilis* pour lequel le SDS est utilisé comme agent guérisseur ainsi que la diminution de la résistance à l'ampicilline qui détermine la guérison. (Lee, 1986)

L'obtention de souches bactériennes guéries de leurs plasmides est un objectif important de l'équipe "Rhizosphère" du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'URA 697 du CNRS de Lyon.

En effet, cette équipe étudie les mécanismes qui régissent les interactions bactéries- plante dans le cas de la rhizosphère des graminées associées aux bactéries non symbiotiques fixatrices d'azote atmosphérique.

Les effets de ces bactéries sur les plantes proviennent souvent de l'expression de gènes plasmidiques en réponse aux informations fournies par la plante. C'est le cas, par exemple, de la reconnaissance par la bactérie de molécules signales produites par la plante, ou de son attachement grâce à la reconnaissance spécifique de protéines-lectines exsudées par la plante où enfin de sa pénétration dans le cortex racinaire de la plante. Ces gènes sont, en effet, souvent portés par des plasmides cryptiques et donc pour cette raison difficile à étudier.

Pour mener à bien ces études, la seule possibilité est la guérison de ces plasmides par mutagenèse.

Il n'existe pratiquement peu ou pas de résultats sur les guérisons de tels plasmides (à part les recherches effectuées sur les bactéries symbiotiques comme *Rhizobium*, et seulement dans le cas de plasmides symbiotiques et non dans le cas de plasmides intervenant dans les interactions primaires entre la bactérie et la plante).

Cette recherche bibliographique importante et détaillée permettra bien entendu d'entreprendre d'une manière plus efficace les études sur la guérison des plasmides rhizosphériques et donc de comprendre enfin les mécanismes des relations privilégiées entre une plante et une bactérie. Cette connaissance est d'un intérêt capital pour les recherches en agronomie et pour l'amélioration des rendements des céréales. L'utilisation d'engrais provoquent, en effet, des dommages importants pour l'environnement. L'innoculation de bactéries spécifiques de l'interaction permettra de diminuer les quantités de ces engrais ajoutés dans le sol et donc de diminuer la pollution de l'environnement (sol, air, eau).

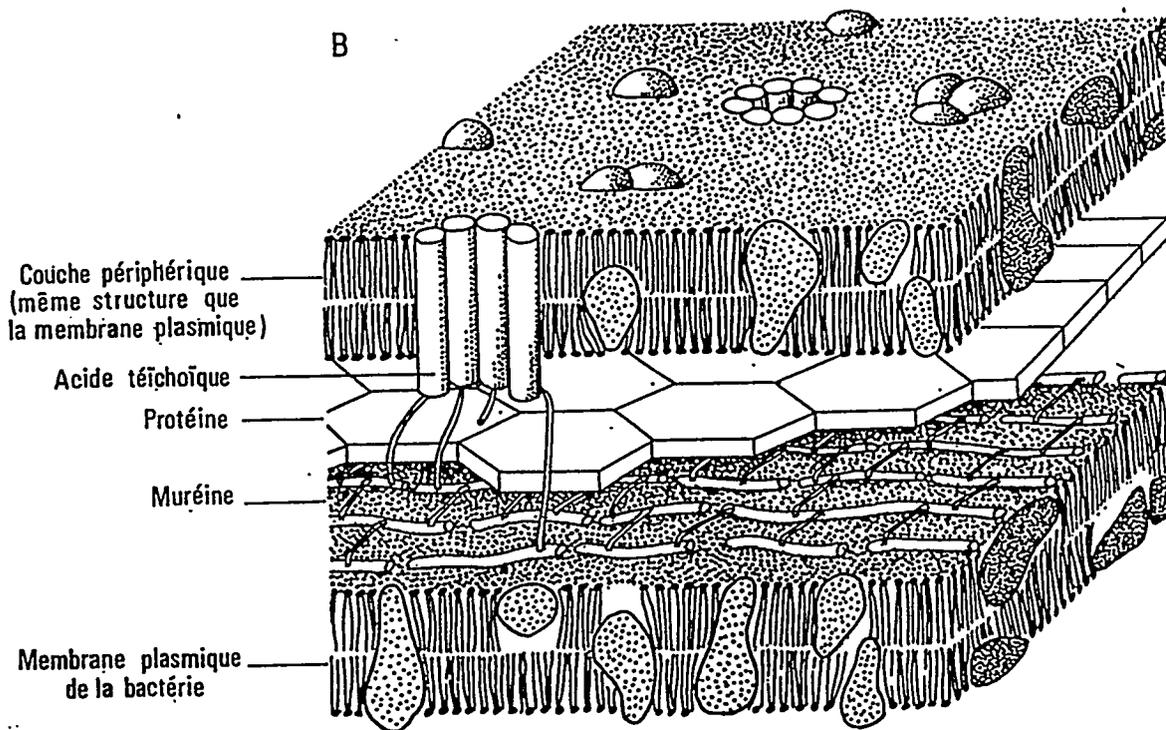
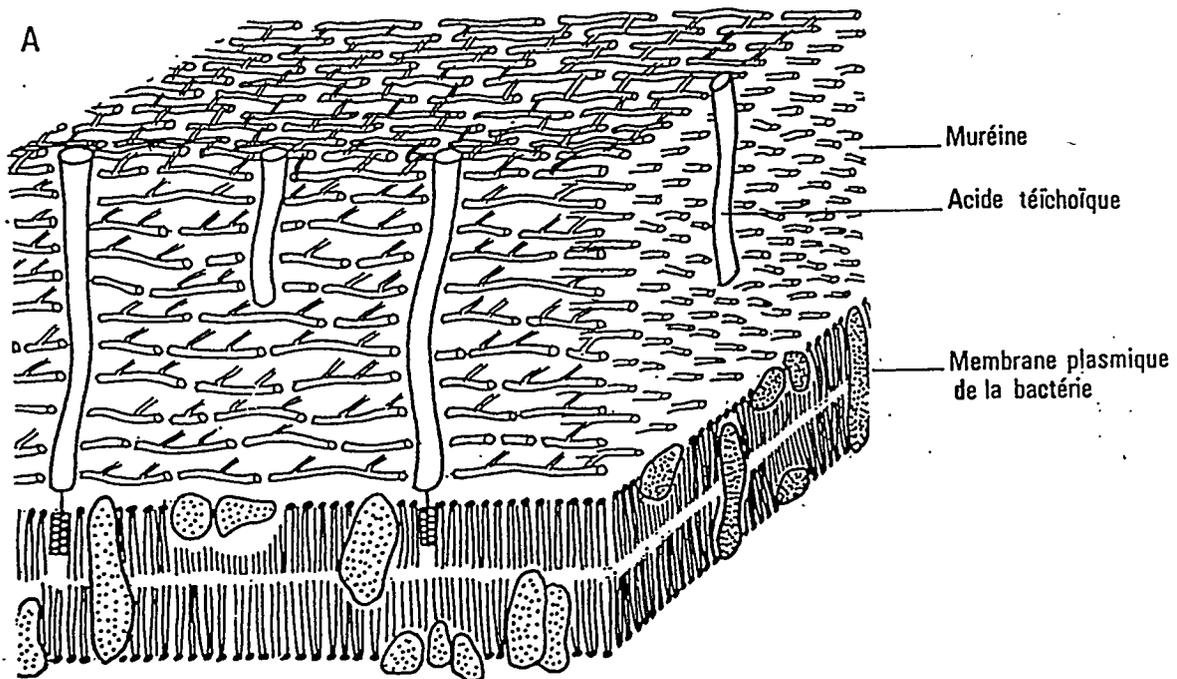


FIG. 6 A. - *Paroi d'une bactérie Gram +*
B. - *Paroi d'une bactérie Gram -*

BIBLIOGRAPHIE

-III- BIBLIOGRAPHIE

Les articles qui sont précédés par * sont des articles qui ont été commandés lors de la recherche bibliographique, les autres étant intéressants mais non commandés.

REFERENCES D'ORDRE GENERAL

A

Abdalla-Galal, S., Ramuz, M., Schmitt-Slomska, J. 1988. Plasmid curing in *Staphylococcus aureus* by antibiotics affecting the bacterial cell wall. F.E.M.S. Microbiol. Letters **49**:367-370.

B

* **Becker, D.A., Glass, K.A., Starzyk, M.J.** 1986. Isolation and curing of extra-chromosomal DNA in *Thermus aquaticus*. Microbios. **48**(195):71-79.

Bello, H., Del Solar, E., Gonzalez, C. and al. 1988. Bacteriological studies with ampicillin/sulbactam on selected strains of gram-negative bacteria. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **11**(2):1009-1015.

* **Borthakur, D., Barker, R.F., Latchford, J.W.** and al. 1988. Analysis of pss genes of *Rhizobium leguminosarum* required for exopolysaccharide synthesis and nodulation of peas: their primary structure and their interaction with psi and other nodulation genes. Mol. Gen. Genet. **213**(1):155-162.

C

* **Caro, L.** 1984. Curing and segregation of plasmids. Methods in Microbiol. **17**:114-122.

Cookson, B., Talsania, H., Naidoo, J. 1986. Strategies for typing and properties of epidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Clin. Microbiol. **5**(6):702-709.

D

* **Durga, R., Sridhar, P., Polasa, H.** 1988. Increased susceptibility of plasmid pBR322 in *Escherichia coli* HB101 to curing agents after pretreatment with hexamine ruthenium(III) chloride. F.E.M.S. Microbiol. Letters **50**:25-28.

E

* **Edger, N.F., McDonald, K.O., Burke, W.F.J.R.** 1981. Plasmid curing in *Bacillus subtilis*. F.E.M.S. Microbiol. Letters **12**(2):131-133.

F

* **Falkenstein, H., Zeller, W., Geider, K.** 1989. The 29 Kb plasmid common in strains of *Eruinia amylovora* modulates development of fireblight symptoms. J. Gen. Microbiol. **135**(10):2643-2650.

G

* **Galli, R., Leisinger, T.** 1988. Plasmid analysis and cloning of the dichloromethane utilization genes of methylbacterium-sp DM4. *J. Gen. Microbiol.* **134**(Part.4):943-952.

Guan, M.L., Li, Z.F., Li, Z.Y. 1989. Experimental studies on transference of gene resistance to drug for *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. *Clin. J. Antibiot.* **14**(3):208-211.

H

* **Heery, D.M., Powell, R., Gannon, F.** 1989. Curing of plasmid from *E. coli* using high-voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **17**(23):10131.

* **Hynes, M.F., Quandt, J., O'connell, M.P.** and al. 1989. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis* sacB gene. *Gene.* **78**:111-120.

I

* **Innes, R.W., Hirose, M.A., Kuempel, P.L.** 1988. Induction of nitrogen-fixing nodules on clover requires only 32 kilobase pairs of DNA from the *Rhizobium trifolii* symbiosis plasmid. *J. Bacteriol.* **170**(9):3793-3802.

J

* **Johnston, A.W.B., Hombrecher, G., Brewin, N.J.** and al. 1982. Two transmissible plasmids in *Rhizobium leguminosarum* strain 300. *J. Gen. Microbiol.* **128**:85-93.

K

* **Kawahara, K., Haraguchi, Y., Tsuchimoto, M.** and al. 1988. Evidence of correlation between 50-kilobase plasmid of *Salmonella choleraesuis* and its virulence. *Microb. Pathog.* **4**(2):155-163.

M

* **Mathis, J.N., Mark Barbour, W., Elkan, G.H.** 1985. Effect of Sym plasmid curing on symbiotic effectiveness in *Rhizobium fredii*. *Environ. Microbiol.* **49**(6):1385-1388.

* **Molnar, J.** 1988. Antiplasmid activity of tricyclic compounds. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **10**(7):467-474.

* **Morrisson, N.A., Hau, C.Y., Trinick, M.J.** and al. 1983. Heat curing of Sym plasmid in a fast-growing *Rhizobium sp.* that is able to nodulate legumes and the nonlegume *Parasponia sp.* *J. Bacteriol.* **153**(1):527-531.

* **Mulkry, W.W., Karns, J.S., Kearney, P.C.** and al. 1986. Identification of a plasmid borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium sp.* by southern hybridization with *opd* from *Pseudomonas diminuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**(5):926-930.

N

* **Niepold, F., Huber, S.J.** 1988. Surface antigens of *Pseudomonas syringae* Puthovar *syringae* are associated with pathogenicity. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **33**(3):459-472.

* **Nordström, K.** 1984. Equipartition and other modes of partition : on the interpretation of curing kinetics using *rep(ts)* plasmids. *Mol. Gen. Genet.* **198**:185-186.

P

* **Potter, A.A., Loutit, J.S.** 1983. FP2 plasmid curing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* **29**(6):732-733.

R

* **Reddy, G., Shridhar, P., Polasa, H.** 1986. Elimination of Col E1 (pBR322 and pBR329) plasmids in *Escherichia coli* on treatment with hexamine ruthenium (III) chloride. *Curr. Microbiol.* **13**(5):243-246.

S

* **Schillinger, U., Lucke, F.K.** 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(8):1901-1906.

* **Sharma, P.K., Laxminarayana, K.** 1989. Effect of high temperature on plasmid curing of *Rhizobium spp.* in relation to nodulation of pigeonpea (*Cajanus cajan*(L.) Millosp.). *Biol. Fertil. Soils.* **8**:75-79.

* **Shields, M.S., Hooper, S.W., Sayler, G.S.** 1985. Plasmid mediated mineralization of 4 chlorobiphenyl. *J. Bacteriol.* **163**(3):882-889.

* **Stanisich, V.A.** 1984. Identification and analysis of plasmids at the genetic level. *Methods in Microbiol.* **17**:5-32.

* **Sykora, P., Foltynova, Z., Smitalova, K.** 1989. A kinetic model for plasmid curing. *Plasmid* **21**:85-98.

T

* **Toh-E, A., Wickner, R.B.** 1981. Curing of the 2 microns DNA plasmid from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **145**(3):1421-1424.

* **Trevors, J.T.** 1986. Plasmid curing in bacteria. *F.E.M.S. Microbiol. Letters* **32**(3-4):149-157.

V

* **Valla, S.V., Coucheron, D.H., Ksombakken, J.** 1987. The plasmids of *Acetobacter xylinum* and their interaction with the host chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **208**(1-2):76-83.

* Vasquez, C., Villanueva, J., Vicuna, R. 1983. Plasmid curing in *Thermus thermophilus* and *Thermus flavus*. F.E.B.S. Letters **158**(2):339-342.

W

* Willets, N.S. 1967. The elimination of Flac⁺ from *Escherichia coli* by mutagenic agents. Biochem. Biophys. Res. Comm. **27**(1):112-117.

* Williams, S.M., Noble, W.C. 1988. Plasmids in coryneform bacteria of human origin. J. Appl. Bacteriol. **64**(6):475-482.

REFERENCES CLASSEES PAR AGENTS GUERISSEURS

Acridine

* Ahluwalia, A.S., Meynell, G.G. 1977. Marked temperature optimum for acridine curing of an Flac faeta in *Escherichia coli* K12. F.E.M.S. Microbiol. Letters **1**(6):363-365.

Wada, C., Yura, T. 1984. Control of F plasmid replication by a host gene evidence for interaction of the MAF-A gene product of *Escherichia coli* with the mini F Inc. region. J. Bacteriol. **160**(3):1130-1136.

Acridine orange

Ahn, T.I., Ahn, K.S. 1987. Effects of the bacterial genetic components on the maintenance of the nucleus morphology of the symbiotic strain of ameba proteus. Korean. J. Genet. **9**(1):19-28.

* Hohn, B., Korn, D. 1969. Cosegregation of a sex factor with the *Escherichia coli* chromosome during curing by acridine orange. J. Mol. Biol. **45**:385-395.

Labuzek, S., Chmielowski, J., Mamok, G. 1985. Elimination of plasmid from *Pseudomonas putida*. Pr. Nauk. Univ. Slask. Katowicach. **0**(725):107-117.

Moncada, M.A., Zemelman, R., Montoya, R. 1987. Beta lactamase diversity in *Shigella* ssp. Rev. Latinoam. Microbiol. **29**(3):271-276.

Repin, V.E., Potapova, I.A., Shchelkunon, S.N. 1985. Investigation of the bacterial cell plasmid stability. Izv. Sib. Otd. Akad. Nauk. SSR. Ser. Biol. Nauk. **0**(2):106-110.

* Sykora, P., Foltynova, Z., Smitalova, K. 1989. A kinetic model for plasmid curing. Plasmid. **21**(2):85-98.

Cannabispino

* Molnar, J., Csiszar, K., Nishioka, I. 1986. The effects of cannabispino compounds and tetrahydrocannabidiolic acid on the plasmid transfer and maintenance in *Escherichia coli*. Acta. Microbiol. Hung. **33**(3):221-232.

Ciprofloxacin

* Mehtar, S., Blakemore, P.H., Ellis, K. 1987. Brief report: in vivo curing of plasmids from multi-drug-resistant *Serratia marcescens* by ciprofloxacin. Am. J. Med. 82(4A):55-57.

* Michel-Briand, Y., Ucelli, V., Laporte, J.M. 1986. Elimination of plasmids from enterobacteriaceae by 4-quinolone derivatives. J. Antimicrob. Chemother. 18:667-674.

Clorobiocin

* Cejka, K., Holubova, I., Hubacek, J. 1982. Curing effect of clorobiocin on *Escherichia coli* plasmids. Mol. Gen. Genet. 186:153-155.

Coumermycin

* Danilevskaya, O.N., Grageron, A.I. 1980. Curing of *Escherichia coli* K12 plasmids by coumermycin. Mol. Gen. Genet. 178:233-235.

Ethidium bromide

* Crameri, R., Davies, J.E., Hutter, R. 1986. Plasmid curing and generation of mutations induced with ethidium bromide in streptomycetes. J. Gen. Microbiol. 132(3):819-824.

* Nascimento, G.G.F.D., Tavares, F.C.A. 1987. Detection of bacterial plasmids in non-symbiotic fixer strains. Rev. Microbiol. 18(4):344-348.

Yamamoto, T. 1985. Analysis of plasmids of *Serratia marcescens* clinically isolated the relationship between drug resistance and fimbrial determinants. Med. Bull. Fukuoka Univ. 12(4):393-404.

Imipramine

* Molnar, J., Beladi, I., Holland, I.B. 1978. The plasmid curing action of imipramine in *Escherichia coli* K12. Genet. Res. 31(2):197-201.

Molnar, J., Schneider, B., Mandi, Y. and al. 1980. New mechanism of plasmid curing by psychotropic drugs. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 27(4):309-315.

Mitomycin c

* Chakrabarty, A.M. 1972. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. J. Bacteriol. 112(2):815-823.

Kim, H.Y., Lim, Y.B., Lee, Y.N. 1987. Characterization of sal plasmid isolated from *Pseudomonas putida*. Korean. J. Microbiol. 25(1):9-16.

Labuzek, S., Fertala, A. 1985. Growth of *Pseudomonas putida* strain in one and two substrate media containing catechol. Pr. Nauk. Univ. Slask. Kataricach. 0(725):118-131.

Lee, J.B., Koo, B.S., Yoon, S.H. and al. 1988. Plasmid characteristics of antagonistic bacteria against soil borne plant pathogenic fungi. Res. Rep. Rural. Dev. Adm. **30**(3):34-43.

Nickel-cobalt

Mergeay, M., Houba, C., Gerits, J. 1978. Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas*. Arch. Internation. Physiol. Biochim. **86**(2):440-442.

* Schmidt, T., Schlegel, H.G. 1989. Nickel and cobalt resistance of various bacteria isolated from soil and highly polluted domestic and industrial wastes. F.E.M.S. Fed. Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Ecol. **62**(5):315-328.

Schuett, C. 1989. Plasmids in the bacterial assemblage of a dystrophic lake evidence for plasmid encoded nickel resistance. Microb. Ecol. **17**(1):49-62.

Novobiocin

Gado, I., Toth, I., Szvoboda, G. 1987. Curing of plasmid PE-194 with novobiocin and coumermycin A1 in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Zentralbl. Bacteriol. Microbiol. Hyg. Ser. A. **265**(1-2):136-145.

Tompkins, G.R., Tagg, J.R. 1987. Bacteriocin-like inhibitory activity associated with beta-hemolytic strains of *Streptococcus salivarius*. J. Dent. Res. **66**(8):1321-1325.

Penicillin

* Chakrabarty, A.N., Balganes, T.S., Dastidar, S.G. 1988. Transfer of antibiotic resistances from *Bacillus spp.* to *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholerae*. Indian. J. Exp. Biol. **26**(1):18-21.

* Cofre, G., Sanchez-Rivas, C. 1983. Curing of plasmids during a protoplast cell wall regeneration cycle in *Bacillus subtilis* strains. F.E.M.S. Microbiol. Letters **19**:11-15.

* Tomas, J.M., Kay, W.W. 1984. A simple and rapid method for elimination of R plasmids from enteric bacteria. Current Microbiol. **11**:155-158.

Platinum II

* Lakshmi, V.V., Sridhar, P., Taqul Khan, B. 1988. Mixed-ligand complexes of platinum (II) as curing agents for pBR322 and pBR329 (ColE1) plasmids in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. **134**:1977-1981.

Rifampicin

* Michel-Briand, Y., Laporte, J.M., Dupont, M.J. 1988. Elimination of different virulence plasmids by antibiotics. Pathol. Biol. **36**(2):159-162.

Sodium Dodecyl Sulfate

* Lakshmi, V.V., Padma, S., Polasa, H. 1987. Elimination of multi-drug resistant plasmid in bacteria by plumbagin A compound derived from a plant. *Curr. Microbiol.* **16**(3):159-162.

* Tomoeda, M., Inuzuka, M., Kubo, N. 1968. Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Bacteriol.* **95**(3):1078-1089.

Sodium Lauryl Sulfate

* Hill, W.E., Carlisle, C.L. 1981. Loss of plasmids during enrichment for *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**(4):1046-1048.

Urea

* Ozaki, M., Kuwatsuka, S. 1986. Reduction degradation of the herbicide isouran and its related compounds by *Pseudomonas putida*. *J. Pestic. Sci.* **11**(3):427-432.



BIBLIOTHEQUE DE L'ENSSIB



8016745