

50376
1972
105

50376
1972
105

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

le titre de DOCTEUR de TROISIEME CYCLE

Spécialité Biologie Végétale

Mention Microbiologie

par

Michel WERQUIN



ASPECTS DE L'APPARIEMENT ET ROLE DES F-PILI
AU COURS DES PREMIERES ETAPES DE LA CONJUGAISON
CHEZ ESCHERICHIA COLI K 12

Membres du Jury : MM. J. GUILLAUME, Président
G. MARTIN, Examineur
E. VIVIER, Examineur

Soutenue le 15 MARS 1972

Ce travail a été réalisé à l'Institut Pasteur de Lille, au sein de l'Equipe de Recherche Associée au C.N.R.S. n° 275 (Professeur J.GUILLAUME) et dans les laboratoires de Microscopie Electronique de l'Institut Pasteur et du Centre de Recherche sur la Cellule de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Professeur E. VIVIER).

Ce travail a été effectué sous la Direction Scientifique de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME, que je tiens à remercier vivement et avec les conseils constants et l'aide de Messieurs les Professeurs E. VIVIER et G. MARTIN, auxquels j'exprime ici toute ma gratitude.

Je tiens également à remercier tous mes camarades des Laboratoires de Physiologie et Génétique Microbienne (E.R.A. n° 275) et de Microscopie Electronique, en particulier Madame TERRIEN, Mademoiselle RIFAUT, Monsieur KUSNIERZ et Monsieur PETITPREZ, qui m'ont fait bénéficier de leur précieuse et efficace collaboration.

TABLE DES MATIERES

pages

AVANT PROPOS

INTRODUCTION : LA CONJUGAISON BACTERIENNE

I - <u>GENERALITES</u>	1
II- <u>LES ETAPES DE LA CONJUGAISON BACTERIENNE</u>	2
A) <u>La formation des paires spécifiques</u>	2
B) <u>La formation effective des couples</u>	4
C) <u>La mobilisation du chromosome</u>	4
D) <u>L'étape du transfert et de la recombinaison génétique</u>	6
III - <u>BESOINS ENERGETIQUES</u>	8
<u>Conclusion</u>	9
IV - <u>ETUDE DE LA CONJUGAISON PAR CONTACT DIRECT ENTRE LA CELLULE MALE ET LA CELLULE FEMELLE</u>	10
V - <u>CONJUGAISON PAR CONTACT PAR L'INTERMEDIAIRE DES PILI</u>	13
1) <u>Découverte des pili bactériens</u>	10
2) <u>Morphologie des pili</u>	14
A) <u>Les pili bactériens non sexuels du type I</u>	15
1) <u>Structure fine des pili de type I</u>	15
2) <u>Structure chimique</u>	16
3) <u>Synthèse des pili I</u>	17
4) <u>Contrôle génétique des pili de type I</u>	17
B) <u>Les pili sexuels ou F-pili</u>	18
1) <u>Découverte des F-pili</u>	18
2) <u>Morphologie des F-pili</u>	18
3) <u>Propriétés générales des F-pili</u>	19
4) <u>Synthèse des F-pili par les cellules mâles</u>	20

5) <u>Contrôle génétique des F-pili</u>	21
6) <u>Propriétés antigéniques des F-pili</u>	21
C) <u>Rôle des F-pili</u>	22
1) <u>Rôle des F-pili au cours de l'infection phagique</u>	23
2) <u>Rôle des F-pili au cours de la conjugaison bactérienne</u>	24
 <u>TRAVAUX PERSONNELS</u> 	
<u>CHAPITRE I : ETUDE DU CONTACT DIRECT PAR AUTORADIOGRAPHIE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE</u>	32
<u>INTRODUCTION</u>	33
<u>I - MATERIEL ET METHODES</u>	34
A) <u>Bactériologie</u>	34
1) <u>Souches bactériennes employées</u>	34
2) <u>Milieux de culture utilisés</u>	35
a) <u>Le milieu MSB1</u>	35
b) <u>Milieu de Luria</u>	36
c) <u>Gélose blanche</u>	36
3) <u>Technique de croisement employée pour la numération des recombinants</u>	37
4) <u>Incorporation des radioisotopes</u>	37
B) <u>Techniques de microscopie électronique</u>	38
1) <u>Fixation</u>	38
2) <u>Inclusion</u>	38
3) <u>Autoradiographie</u>	39
<u>II - INCORPORATION DES RADIOISOTOPES CHEZ LES SOUCHES F⁻ 2000 X 17 K et Hfr Thy</u>	40
<u>III- DESCRIPTION DES IMAGES OBSERVEES</u>	41
A) <u>Orientation des cellules en conjugaison et point de contact</u>	41
B) <u>Aspect du pont intercellulaire</u>	41
C) <u>Décollement de la paroi</u>	41

D) <u>Aspect des nucléoplasmes</u>	42
IV - <u>DISCUSSION</u>	42
V - <u>CONDITIONS DU CROISEMENT ENTRE LA SOUCHE F⁻ PA 3091 MARQUEE ET LA SOUCHE HfrH</u>	44
A) <u>Essais en vue d'obtenir un marquage maximum de la souche F - PA 3091</u>	44
B) <u>Détermination du pourcentage de cellules F⁻ marquées par examen d'autoradiogrammes</u>	47
C) <u>Conditions de croisement</u>	48
VI - <u>DESCRIPTION DES IMAGES OBSERVEES</u>	49
A) <u>Accolement entre cellules de sexe différent</u>	49
B) <u>Accolement entre cellules de même sexe</u>	50
VII - <u>DISCUSSION</u>	51
VIII- <u>CONCLUSION</u>	52
<u>CHAPITRE II : ETUDE DU CONTACT PAR L'INTERMEDIAIRE DU F-PILUS DE LA BACTERIE MALE</u>	54
<u>INTRODUCTION</u>	55
I - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	56
A) <u>Bactériologie</u>	56
1) <u>Souches employées</u>	56
2) <u>Milieux de culture utilisés</u>	56
a) <u>Milieu de Lennox (L)</u>	56
b) <u>Milieu Z</u>	57
3) <u>Technique de croisement</u>	57
B) <u>Technique d'obtention et de dosage du stock de phages f2</u>	58
1) <u>Sur le milieu Z solide</u>	58
a) <u>Obtention du stock</u>	58
b) <u>Dosage du stock</u>	59
2) <u>Sur le milieu de Lennox gélosé</u>	59

3) <u>Obtention du stock de phages f2 marqués au ³²P</u>	62
4) <u>Concentration du phage f2 marqué</u>	62
a) <u>Concentration par filtration</u>	63
b) <u>Concentration par centrifugation</u>	63
c) <u>Radioactivité du phage f2</u>	63
C) <u>Technique de microscopie électronique</u>	65
1) <u>Ombrage</u>	65
2) <u>Coloration négative</u>	65
II - <u>ETUDE DES F-PILI EN GRADIENT DE DENSITE</u>	66
- <u>Introduction</u>	66
A) <u>Obtention des pili</u>	66
1) <u>Technique employée</u>	66
2) <u>Examen des pili en microscopie électronique</u>	67
a) <u>En l'absence de phages f2</u>	67
b) <u>En présence de phages f2</u>	68
3) <u>Etude comparative en gradient de densité d'une suspension de pili isolés de souches Hfr et F -</u>	69
B) <u>Purification des pili</u>	73
1) <u>Modification de la technique d'extraction des pili</u>	74
2) <u>Détermination de la position des F-pili dans les gradients de saccharose</u>	75
a) <u>Etude en microscopie électronique après addition de phages f2</u>	75
α) <u>En gradient 20 p.100 - 70 p.100</u>	75
β) <u>En gradient 10 p.100 - 50 p.100</u>	80
- <u>Conclusion</u>	80
b) <u>Estimation de la position des F-pili dans un gradient de saccharose 10 p.100 - 50 p.100. Utilisation d'une suspension de phages f2 marqués au phosphore 32</u>	81
3) <u>Essais de différentes méthodes de fractionnement</u>	84
a) <u>Etude de la suspension de pili additionnée de phages f2</u>	85
b) <u>Essais de fractionnement sur gradient de chlorure de césium</u>	89
- <u>Discussion</u>	92

III - <u>ETUDE DU ROLE DES F-PILI AU COURS DE LA CONJUGAISON</u>	94
A) <u>Etude du rôle des F-pili durant le croisement</u>	95
1) <u>Examen direct d'un croisement</u>	95
2) <u>Examen des F-pili en microscopie électronique sur coupes</u> ...	96
3) <u>Recherche du DNA des les F-pili</u>	97
a) <u>Etude de la radioactivité des F-pili isolés de cellules Hfr cultivées en présence de thymine tritiée</u>	98
b) <u>Etude de la radioactivité des F-pili isolés d'un croisement entre des cellules Hfr marquées et des cellules F - non marquées</u>	101
α) <u>Techniques de marquage et de croisement employées</u>	101
β) <u>Résultats obtenus</u>	102
4) <u>Devenir des F-pili au cours d'un croisement</u>	105
a) <u>Etude de la radioactivité due à l'adsorption des phages f2 marqués sur les pili isolés à partir de bactéries en cours de conjugaison</u>	105
b) <u>Discussion</u>	113
 <u>CONCLUSION GENERALE</u>	 116
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	 118

AVANT PROPOS

Les recherches effectuées dans le laboratoire de Physiologie et de Génétique Microbienne (E.R.A. n° 275) de l'Institut Pasteur de Lille, sont orientées depuis plusieurs années vers l'étude des phénomènes intimes du transfert génétique et de la recombinaison chez Escherichia coli K12.

Lorsque des cellules mâles et femelles sont mélangées, on assiste tout d'abord à une phase de reconnaissance entre les deux types de cellules. Elle est suivie de la formation effective des couples, ce qui permet le transfert génétique de DNA de la cellule mâle à la cellule femelle, lui-même précédant la recombinaison chez cette dernière.

Malgré un très grand nombre de travaux, le mécanisme d'aucune de ces phases n'est parfaitement connu. Notre travail a porté sur l'étude des mécanismes physiques du transfert génétique et de son initiation. Deux grands courants d'idées existent à cet égard :

Selon le premier, il semble que les bactéries sont accolées au cours du transfert qui se fait grâce à la formation d'un pont entre les deux membranes. De nombreuses photographies de microscopie optique et électronique sont en faveur de cette hypothèse.

Selon le second, les cellules mâles se fixent sur les cellules femelles grâce à des longs appendices sexuels (F-pili) qui serviraient soit au passage du matériel génétique, soit simplement au rapprochement des deux cellules, afin de déterminer un contact plus intime. Ici encore, des photographies de microscopie électronique montrent ce phénomène.

Deux hypothèses aussi dissemblables méritaient d'être réétudiées en employant des techniques nouvelles. Nous avons voulu examiner le contact direct entre cellules en marquant sélectivement les cellules mâles ou femelles avec des radioisotopes, afin de déterminer si les nombreux couples paraissant être en cours de transfert, étaient formés de cellules de polarité sexuelle différente.

Afin d'étudier le rôle des F-pili, nous avons utilisé d'autres techniques que la microscopie électronique, dans le but de déterminer s'ils servent au passage du DNA au cours du transfert génétique ou s'ils constituent des organes de reconnaissance appelés à se rétracter ultérieurement. Nous avons adopté le plan suivant :

Après une étude bibliographique des travaux réalisés sur les premières étapes de la conjugaison, nous avons étudié dans le premier chapitre le contact direct entre cellules mâles et femelles en microscopie électronique après autoradiographie.

Le second chapitre a été consacré aux recherches sur les F-pili faisant intervenir, outre la microscopie électronique, des techniques d'obtention et de séparation de ces éléments.

I N T R O D U C T I O N

LA CONJUGAISON BACTERIENNE

I - GENERALITES

La conjugaison bactérienne découverte et décrite par LEDERBERG et TATUM en 1946 (62), aboutit à la formation de recombinants. C'est le phénomène par lequel le matériel génétique est transféré d'une cellule mâle dans une cellule femelle, lors de leur contact.

Les premiers travaux ont été effectués en utilisant des mutants d'Escherichia coli K12 (62, 61, 23). Ces auteurs ont montré que l'efficacité du transfert dépendait du contact étroit entre les membranes des deux cellules.

Cependant, des échanges de matériel génétique par conjugaison ont été démontrés chez de nombreuses autres espèces d'Enterobacteriacées, telles Vibrio (5), Salmonella (93, 68, 81), Enterobacter (24) et Shigella (82). Des conjugaisons interspécifiques ont également été mises en évidence entre des souches d'Escherichia et de Shigella (67), de Salmonella (93, 3, 4), de Serratia (28), de Pasteurella (69, 59, 35) et de Proteus (4, 29). Il existe aussi des conjugaisons entre certaines espèces de Pseudomonas (44) et de Pasteurella (59) et chez une espèce de Rhizobium (43).

Pour CURTISS (19), le phénomène de la conjugaison chez les bactéries, peut être divisé schématiquement en cinq étapes :

a) La formation de paires spécifiques définie comme une union stable entre la cellule donatrice et la cellule réceptrice, union résistant aux dilutions faites avec précaution.

b) La formation de paires effectives qui se traduit par l'établissement d'une connection intercellulaire entre les deux cellules de sexe opposé.

c) La mobilisation du chromosome du donneur ou du facteur de fertilité F, c'est à dire la préparation au transfert chromosomique.

d) Le transfert du chromosome ou du facteur F.

e) L'intégration éventuelle des fragments chromosomiques transférés au sein du chromosome du receveur, c'est à dire l'étape de la recombinaison. Le transfert et la recombinaison génétique sont étudiés ensemble car, expérimentalement, il n'est possible de séparer ces deux étapes que chez les mutants incapables d'effectuer la recombinaison. On ne connaît donc pas avec précision la chronologie des faits lors d'une conjugaison normale.

II - LES ETAPES DE LA CONJUGAISON BACTERIENNE

A) La formation des paires spécifiques

Il est généralement admis que la présence de F-pili chez la bactérie mâle est essentielle à la formation de paires spécifiques (71, 87). Cette constatation est basée sur un certain nombre d'observations.

- Un examen minutieux au microscope optique d'un mélange de bactéries de sexe différent montre la présence de couples qui se déplacent ensemble, bien que n'étant pas en contact étroit, mais certainement reliés par un fil invisible d'une longueur en rapport

avec celle d'un F-pilus (8).

- Les pili des bactéries mâles peuvent être enlevés, ce qui entraîne une perte de leur aptitude à conjuguer. Une nouvelle synthèse des F-pili leur redonne une capacité normale de conjugaison (8).

- La fréquence de formation des couples est directement proportionnelle au nombre de F-pili par cellule donatrice (20).

- La privation des cellules mâles en éléments nutritifs (32) ou en acides aminés exigés (54), détermine une perte de fertilité en même temps qu'une perte des pili et de l'aptitude à conjuguer (20,21). Ces résultats suggèrent que la perte de pili est d'origine métabolique.

- La plupart des mutants défectifs du point de vue du transfert, ne possèdent pas de pili. Ces mutants semblent incapables de transférer leur matériel génétique, même si le croisement est filtré sur membrane de cellulose pour obtenir un maximum de contact entre les cellules mâles et femelles.

Prises dans leur ensemble, les observations précédentes suggèrent que les pili de la cellule mâle jouent un rôle déterminant au cours de la formation des paires spécifiques. Il est possible que les cellules réceptrices possèdent des sites spécifiques qui réagissent avec l'extrémité des pili de la bactérie donatrice. Si cela est vrai, il est nécessaire de postuler que ces sites ne sont pas présents sur la cellule donatrice.

B) La formation effective des couples

La formation effective des paires implique l'établissement d'un pont de conjugaison entre la cellule donatrice et la cellule réceptrice, par lequel le matériel génétique peut être transféré. Le tube de conjugaison ne doit pas avoir un diamètre beaucoup plus important que le diamètre de la chaîne de DNA transférée, car il a été démontré (78,84) que le transfert de cytoplasme était négligeable. D'après CURTISS (19) la formation effective des couples se déroulerait en deux étapes : dans un premier temps, le F-pilus de la cellule donatrice serait tiré à l'intérieur de celle-ci avec dépense d'énergie dans le but de former un contact intime entre les deux cellules. La deuxième étape requièrerait la présence chez le donneur, d'une substance spécifique qui agirait pour joindre les membranes des deux cellules. Ce phénomène serait commandé par la cellule donatrice et ne se produirait pas s'il y a eu mutation au niveau de la cellule réceptrice ou si celle-ci a été traitée par des agents physiques.

C) La mobilisation du chromosome

Selon les hypothèses émises par la plupart des auteurs précédemment cités, la première étape de l'initiation de la mobilisation du chromosome impliquerait la transmission d'un signal provoqué, soit par l'interaction entre l'extrémité du F-pilus et la surface de la cellule réceptrice, soit par la formation du couple lui-même.

KUSNIERZ et coll. en 1971 (56) ont étudié les effets d'un nouveau contact cellulaire sur la mobilisation du chromosome après interruption du processus en cours, par séparation mécanique des couples en conjugaison.

Un croisement est effectué dans des conditions normales et après des temps de contact variables, les mâles et les femelles sont séparés par action d'un agitateur "Vortex" durant 3 min. L'introduction immédiate d'une quantité égale d'une seconde femelle permet de suivre le deuxième transfert sans l'interférence des premiers zygotes.

L'apparition des nouveaux recombinants, portant les caractères chromosomiques proximaux Th^+ , Leu^+ 10 min après le blocage du premier transfert, montre qu'une nouvelle conjugaison reprend immédiatement après l'interruption. Quel que soit le moment de l'interruption, chaque gène passe dans un ordre identique à celui du témoin, mais retardé de la période qui précède l'interruption. Les Hfr exconjuguants peuvent donc s'apparier et conjuguer une seconde fois.

Lorsqu'une deuxième conjugaison est effectuée après interruption d'une première, un nouveau cycle de transfert commence immédiatement à partir de l'origine caractéristique de transfert. Cela impliquerait l'existence d'un signal de cellule à cellule, lié au contact des membranes, induisant un nouveau cycle de transfert d'une copie de DNA différente de celle qui intervient dans le premier transfert.

D) L'étape du transfert et de la recombinaison génétique

L'information génétique est transmise de la cellule mâle à la cellule femelle au cours du transfert chromosomique. Son étude peut se faire de différentes façons.

Habituellement on étudie l'apparition de recombinants au cours de croisements effectués entre des cellules donatrices et des cellules réceptrices différant par un certain nombre de caractères chromosomiques. JACOB et WOLLMAN (51) ont employé l'induction zygotique.

On peut également étudier le transfert en mettant en évidence la synthèse immédiate d'une enzyme chez la cellule réceptrice après croisement avec une cellule donatrice, capable de la synthétiser (78).

Enfin, la méthode la plus directe est d'employer des cellules donatrices dont le DNA est marqué à la thymidine ou à la thymine radioactive dans des croisements avec des cellules réceptrices non marquées.

Les travaux effectués sur le transfert chromosomique ont eu pour but de déterminer la nature monocaténaire ou bicaténaire du DNA transféré au cours de la conjugaison.

La synthèse de DNA chez l'un des deux parents a été étudiée par privation en thymine de mutants Thy , en utilisant l'inhibition de la synthèse du DNA par l'édéine (55) et l'acide nalidixique (37 , 38) et en employant des mutants thermosensibles

incapables de synthétiser leur DNA à certaines températures. Dans tous les cas, il s'agit de conditions particulières et les résultats doivent être interprétés avec la plus grande prudence.

JACOB, BRENNER et CUZIN (49) ont montré que l'ADN transféré durant la conjugaison, n'est pas composé de deux brins synthétisés antérieurement au croisement, mais qu'il est formé d'un brin synthétisé avant celui-ci, le deuxième brin étant formé pendant.

OHKI et TOMIZAWA (75) ont observé que la majorité des extrémités des chaînes chromosomiques transférées dans les bactéries réceptrices, sont de nature 5'. Ils pensent qu'il y aurait transfert d'une chaîne parentale, l'extrémité 5' en tête et d'une chaîne fille nouvellement synthétisée. Dans cette cellule réceptrice, la chaîne fille serait dégradée à partir de son extrémité 3' et seule la chaîne possédant l'extrémité 5' serait effectivement transférée.

L'étape du transfert chromosomique aboutit à la formation de zygotes incomplets ou mérozygotes chez lesquels la recombinaison génétique pourra se faire.

Récemment, CURTISS et coll. (21) ont démontré qu'une certaine homologie était nécessaire entre le chromosome de la cellule donatrice et le matériel génétique de la cellule réceptrice. Cette homologie permettrait à la recombinaison d'aboutir à la faveur de crossing-over vrais entre les chromosomes des deux cellules (70, 86).

III - BESOINS ENERGETIQUES

En 1957, FISHER (31) a étudié les exigences en éléments nutritifs des cellules réceptrices ou des cellules donatrices ou des deux ensemble . Il a démontré que la formation des zygotes dépend de l'énergie fournie par le cycle de Krebs ; en effet, l'addition simultanée à des cellules en croisement de glucose et d'un acide dicarboxylique du cycle de Krebs stimule la formation des zygotes. Quant aux corps connus pour leur action inhibitrice sur le cycle de Krebs, ils inhibent la formation des zygotes.

FISHER (32) a montré également qu'au cours de la formation des zygotes, l'énergie n'était utilisée que par la cellule donatrice. Ainsi il admet que pendant le transfert chromosomique, la cellule donatrice est active, tandis que la cellule réceptrice est passive.

Cependant, CURTISS et coll. (21) pensent que les cellules Hfr et F⁻ requièrent toutes deux un métabolisme actif au cours du transfert chromosomique ; le parent Hfr pour initier le transfert chromosomique et le parent femelle pour en contrôler le taux.

En 1970, GUILLAUME et coll. (41) ont étudié l'influence sur le nombre de recombinants, des conditions de culture et d'incubation lors des différentes phases de la conjugaison. Ils ont ainsi montré que la présence de glucose et l'anaérobiose pour la culture de la cellule Hfr sont des éléments conditionnant un taux d'appariement convenable. Par contre, les cellules F⁻ présentent une activité maximale quand elles sont cultivées sur milieu riche et en aérobiose, l'addition du glucose n'apportant aucune modification. L'aptitude des cellules Hfr à former des paires, qu'elle soit due à l'abondance des F-pili ou à une autre cause, est donc sous l'influence du métabolisme intermédiaire.

Par ailleurs, si la présence de glucose ou d'une source d'azote n'est pas nécessaire au milieu d'appariement, une concentration suffisante en sels minéraux est indispensable ; cela suggère l'importance des charges de surface dans le phénomène du contact entre Hfr et F⁻.

Enfin, lorsque le métabolisme de l'Hfr et de la F⁻ est réduit dans le milieu de transfert, le nombre de recombinants est dans les deux cas nettement diminué. Il apparaît donc qu'une activité métabolique suffisante des deux types de cellules est indispensable au transfert.

De ces résultats, on peut retenir que les deux cellules en conjugaison jouent un rôle actif durant le transfert, rôle en rapport avec leurs besoins en énergie métabolique. La bactérie Hfr aurait un rôle tout au moins dans l'initiation du transfert ; la bactérie réceptrice contrôlerait le taux de transfert chromosomique.

Conclusion

Les deux premières étapes de la conjugaison, c'est à dire le contact et la formation du pont intercellulaire, sont particulièrement importantes. En effet, elles impliquent une reconnaissance des deux cellules qui vont s'apparier. La nature des phénomènes intervenant au cours de cette reconnaissance n'est pas encore connue ainsi que l'origine, la nature et la structure du pont intercellulaire.

Les recherches relatives à ces deux étapes de la conjugaison ont permis de dégager deux grandes hypothèses quant à l'origine et la structure du pont intercellulaire.

Pour certains, le pont intercellulaire se formerait après un contact effectif entre les deux cellules de sexe différent. Pour d'autres, ce contact se ferait par l'intermédiaire du F-pilus de la bactérie mâle. Le DNA de la cellule mâle serait alors injecté dans la cellule femelle par l'intermédiaire du F-pilus ou bien il servirait à la suite de sa rétraction dans la cellule mâle à rapprocher les deux cellules et les mettre ainsi en contact intime.

Nous verrons tout d'abord l'état de nos connaissances sur le contact direct entre la cellule mâle et la cellule femelle et ensuite, nous entreprendrons une étude bibliographique sur la structure des pili et le rôle qu'ils peuvent jouer au cours de la conjugaison.

IV - ETUDE DE LA CONJUGAISON PAR CONTACT DIRECT ENTRE LA CELLULE MALE ET LA CELLULE FEMELLE

L'existence d'une recombinaison génétique chez E. coli a été démontrée par LEDERBERG et TATUM en 1946 (62). Ces auteurs ont observé qu'un mélange de mutants auxotrophes donnait naissance à de rares individus prototrophes. Les exigences multiples des souches parentales excluant le retour de ces bactéries à l'état sauvage, ces auteurs concluaient que les cellules prototrophes étaient nées d'un contact entre deux cellules auxotrophes.

Plus tard, TATUM et LEDERBERG (85) et DAVIS (23) confirmaient ces résultats. Seul un contact effectif entre deux cellules parentales pouvait donner naissance à des recombinants. La recombinaison génétique

était donc la conséquence d'une conjugaison.

La fréquence de recombinaison était cependant si faible (10^{-5} à 10^{-6}) qu'elle donnait à penser que la fréquence de conjugaison devait elle même être trop faible pour que celle-ci puisse être observée.

Avec la découverte de souches à haute fréquence de recombinaison (Hfr) (17, 42), cette difficulté disparaissait et la conjugaison entre bactéries devenait accessible à l'observation directe.

En réalité, la fréquence de recombinaison n'est qu'une mesure indirecte de la fréquence de conjugaison. Il a été démontré (17, 42) que lorsque des bactéries donatrices Hfr et des bactéries réceptrices F^- sont mélangées à parties égales, c'est pratiquement la totalité des bactéries qui entrent en conjugaison. Avec un tel système, LEDERBERG en 1956 (60) a pu décrire des figures de conjugaison aussi bien après examen direct au microscope à contraste de phase, que sur des préparations fixées et colorées ou par examen au microscope électronique.

En 1957, ANDERSON et coll. (2) ont étudié les aspects morphologiques en microscopie électronique après coloration négative de différentes variétés de croisements. Ils ont montré que les aspects de conjugaison ne sont pas de simples accolements mais de véritables fusions intéressant des régions limitées de la surface des bactéries. On sait que la conjugaison a pour conséquence le passage orienté de matériel génétique de la bactérie donatrice vers la bactérie réceptrice (91). Il y a alors tout lieu de penser que le passage du DNA s'effectue par la connection intercellulaire. Il semble ne pas exister sur la surface des bactéries de zones de conjugaison caractéristiques. Le pont qui unit

des bactéries accouplées semble très solide et résiste au pipetage doux.

En 1966, GROSS et CARO (39) ont étudié en microscopie électronique sur coupes, l'aspect de cellules en cours de conjugaison. Pour cela, ils ont utilisé des souches mâles et femelles morphologiquement différentes et montré des contacts intimes entre des bactéries de sexe différent. Pour ces auteurs, le pont intercellulaire a un diamètre de $0,1\mu$ et est formé de l'accolement étroit des enveloppes bactériennes.

SHREIL et CHRISTENSEN (83), utilisant une technique semblable ont abouti à la conclusion que le contact entre cellule mâle et femelle a lieu par l'intermédiaire de "bulles", structures arrondies constituées des deux feuilletts externes de la paroi. Ces auteurs pensent que le tube de conjugaison observé par ANDERSON et coll. se forme au moment du séchage de la préparation par l'écartement des deux cellules qui, à l'origine, étaient en contact intime.

Ces résultats sont controversés par LANCASTER et SKVARLA (57) qui ont observé dans des cultures pures de bactéries mâles ou femelles, des images semblables à celles décrites par GROSS et CARO et par SHREIL et CHRISTENSEN.

Comme nous le verrons dans la suite de ce travail, nos observations rejoignent celles de LANCASTER et SKVARLA.

V - CONJUGAISON PAR CONTACT PAR L'INTERMEDIAIRE DES PILI

Les pili ont des dimensions trop faibles pour être observables au microscope optique ; on ne peut les étudier qu'au microscope électronique après coloration négative ou après ombrage. Leur diamètre est relativement constant pour un type donné, mais leur longueur varie parmi les pili d'une même cellule. Contrairement aux flagelles, ils sont droits ; quelques uns semblent être rigides. Ils sont habituellement distribués régulièrement sur toute la surface de la cellule.

1) Découverte des pili bactériens

Ce sont ANDERSON (1), HOUWINK (45), HOUWINK et VAN ITERSON (46) qui, les premiers, ont montré qu'il existait des appendices différents des flagelles à la surface des bactéries, telles que Bacterium coli, Pseudomonas pyocyaneus et Proteus mirabilis. ANDERSON pensait à cette époque qu'il s'agissait d'artefacts apparaissant au cours du séchage des préparations microscopiques. HOUWINK par contre, les considérait comme des structures présentes sur la bactérie avant le séchage de l'échantillon. Quant à HOUWINK et VAN ITERSON, ils pensent que ces filaments servent d'organes de fixation de la bactérie sur le substrat.

Ces appendices sont plus courts, plus fins et plus nombreux que les flagelles. DUGUID et coll. (27) proposèrent en 1955 de leur donner le nom de "fimbriae" qui signifie fils, fibres ou franges.

Plus tard, BRINTON (12) propose le terme "pilus", signifiant cheveu, qui lui semble être plus descriptif en raison de la disposition,

de la dimension et de la croissance de ces appendices. Pour BRINTON, la présence des pili se manifeste fréquemment chez les bactéries Gram négatif, particulièrement chez les souches fraîchement isolées à partir de sources naturelles. Ils ne s'avèrent pas nécessaires à la croissance ou à la vitalité des bactéries dans les conditions de cultures habituelles.

2) Morphologie des pili

Pour BRINTON (8) il existe six types morphologiquement distincts de pili, qui ont été numérotés par ordre de découverte. Les pili non sexuels sont numérotés de I à V ; les pili sexuels sont nommés F-pili. Les caractéristiques des types de pili sont les suivantes :

type	diamètre	longueur typique en microns	nombre typique par cellule
I	70 Å	0,5 - 2	100 - 200
II	48 Å	0,5 - 2	100 - 200
III	30 Å	2 - 6	200 - 400
IV	70 Å hélicoïdal	1 - 2	100 - 200
V	250 Å	1 - 2	1
F	85 Å	1 - 20	1 - 4

TABLEAU I

Dans les conditions normales de culture, on rencontre des pili du type I chez la plupart des Enterobacteriacées. BRINTON (8) a

montré que les cellules d'Escherichia coli F⁻ sont pourvues de nombreux pili du type I. On peut également rencontrer des pili de type I, III et IV chez Proteus ; des pili du type I et du type IV peuvent être présents aux côtés des F-pili chez Escherichia coli HfrC.

Comme nous le verrons dans la suite de ce travail, les F-pili semblent jouer un rôle important lors du phénomène de la conjugaison. Nous avons cherché un moyen de les isoler des autres types de pili. Cependant, lorsque nous isolons les fimbriae d'une bactérie mâle, nous retrouvons dans notre préparation des F-pili et des pili du type I. Afin d'essayer de reconnaître ces derniers à l'observation directe au microscope électronique, il nous a semblé intéressant d'étudier tout d'abord leur structure et leur aspect.

Nous verrons donc dans un premier temps les pili du type I et ensuite, nous nous intéresserons aux F-pili.

A) Les pili bactériens non sexuels du type I

1) Structure fine des pili de type I

Les pili du type I peuvent être isolés, concentrés et purifiés (15). Ils sont séparés des bactéries par agitation mécanique et concentrés par centrifugation. Leur structure fine a été étudiée par diffraction aux rayons X et examen au microscope électronique.

BRINTON a montré (8) que les pili I sont des filaments creux à structure hélicoïdale d'un diamètre externe de 70 Å. Le trou central a un diamètre de 20 à 27 Å. Le pili est constitué de sous-unités agencées les unes sur les autres, à raison de une sous-unité pour trois tours 1/8 de spire. Ces sous-unités ont la densité des protéines et un poids moléculaire d'environ 16.000.

2) Structure chimique

Les pili du type I peuvent être dépolymérisés en sous-unités de piline en rompant les ponts hydrogènes ou hydrophobes par action de la chaleur, de l'acide acétique, du salicylate ou du chlorhydrate de guanidine (BRINTON et HUANG, 14). L'analyse chimique de la piline montre qu'elle a un poids moléculaire de 16.600. Elle est constituée d'au moins 163 résidus d'acides aminés. La piline contient une grande proportion d'acides aminés avec des chaînes latérales hydrocarbonées et une faible proportion d'acides aminés basiques. De plus, le nombre de résidus NH_3^+ indique que la proportion des groupements carboxyles est faible. La prépondérance des chaînes latérales non polaires peut influencer sur le caractère hydrophobe des pili de type I. Ce caractère leur confère la propriété d'agglutiner les cellules sanguines, comme l'ont montré les travaux de BRINTON (7) et de DUGUID et GUILLIES (26).

3) Synthèse des pili I

La régénération des pili I demeure possible, même après quatre cycles d'enlèvement et de régénération successifs en présence de chloramphénicol (8). Il semble donc que leur croissance s'effectue par assemblage de sous-unités présynthétisées, plutôt que par la synthèse de protéines de novo. Cette observation se confirme en constatant l'absence d'acides aminés radioactifs dans les protéines des pili en présence de chloramphénicol.

4) Contrôle génétique des pili de type I

Les travaux de BRINTON et BARON (10), de BRINTON et coll. (13) et de GEMSKI (34), ont montré que la synthèse des pili I était contrôlée par des gènes localisés sur le chromosome d'Escherichia coli, au niveau du locus arabinose. Ils ont prouvé que lorsque l'on croisait Escherichia coli avec Salmonella typhosa, les pili produits par Salmonella typhosa étaient sérologiquement identiques à ceux d'Escherichia coli.

BRINTON et coll. (13) ont démontré que le gène responsable de la synthèse des pili de type I se trouvait localisé sur le chromosome d'Escherichia coli K12 à 2 mm du locus thréomine du côté opposé à la leucine.

B) Les pili sexuels ou F-pili

1) Découverte des F-pili

LOEB en 1960 (65) et LOEB et ZINDER en 1961 (66) montrent qu'il existe des bactériophages à RNA spécifiques des bactéries mâles. Plus tard, CRAWFORD et GESTELAND (18) observent que lorsqu'une suspension de phages R17 à RNA est mise en contact avec des bactéries mâles, ceux-ci se fixent sur certains de leurs pili. Le bactériophage R17 montre une affinité marquée pour les fimbriae des bactéries Hfr et F^+ ; par contre, il ne se fixe pas sur ceux des bactéries F^- .

En 1964, BRINTON et coll. (12) donnent à cette nouvelle sorte de pili le nom de F-pili, à cause de leur morphologie semblable à celle des pili du type I et de leur présence exclusive chez les bactéries pourvues du facteur F. En 1966, CARO et SCHNOS (16) montrent que les phages f1 à DNA se fixent à l'extrémité des F-pili.

2) Morphologie des F-pili

Ils se présentent sous la forme de filaments creux d'une longueur variant entre 1 et 20 μ d'un diamètre externe de 85 Å environ et d'un diamètre interne de 20 à 25 Å. On peut en observer jusqu'à quatre par cellule. Ils sont en général plus longs et plus flexibles que les pili du type I présents sur une même cellule. A l'observation au microscope électronique après coloration négative, ils présentent

la même structure fine que les pili I et semblent être formés de sous-unités. La sensibilité des F-pili à la trypsine et le profil du spectre d'absorption en lumière ultra-violette de préparations partiellement purifiées de F-pili, indiquent qu'ils sont peut être composés de protéines comme les pili du type I.

En 1965, VALENTINE et STRAND (88) étudiant des F-pili isolés au microscope électronique, ont montré qu'ils sont pourvus d'une sorte de bouton à leur extrémité. Ils pensent que cette structure représente la "racine" du F-pilus sur la bactérie.

Plus tard, LAWN (58) dément cette hypothèse en montrant que ces renflements sont présents aux extrémités distales des F-pili encore attachés à la bactérie mâle. Ils pensent que ces boutons sont formés d'une partie de l'enveloppe bactérienne, enlevée au cours de la croissance du F-pilus.

3) Propriétés générales des F-pili

Les F-pili sont des structures fragiles facilement détachables des bactéries par chocs hydrodynamiques. Une culture de bactéries mâles soumise à des lavages et à des centrifugations répétées, perd plus de 80 p. 100 de ses F-pili.

WENDT et coll. (90) ont montré que les F-pili sont très sensibles aux solvants organiques tels que le chloroforme, le benzène et le tétrachlorure de carbone. Les F-pili soumis à l'action de tels

solvants perdent rapidement leur capacité d'adsorber les bactériophages. Une température de 80°C pendant 8 min a le même effet.

4) Synthèse des F-pili par les cellules mâles

Le taux de synthèse des F-pili varie considérablement d'une souche à l'autre et pour une même souche, selon les conditions de culture. La culture de la souche Hfr en milieu riche ou dans des conditions d'anaérobiose légère, favorise la formation des F-pili (71).

L'étude de la production des F-pili chez les souches mâles indique qu'elle suit généralement la croissance de la culture : elle augmente rapidement durant la phase exponentielle de croissance, décroît et finalement s'annule lorsque la croissance de la culture ralentit et qu'elle entre dans la phase stationnaire (87).

NOVOTNY et coll. (72) ont étudié les effets de l'agitation mécanique sur les F-pili, les pili I et les flagelles, ainsi que la cinétique de la synthèse de nouveaux pili.

Ils ont montré que les F-pili et les flagelles sont séparés des cellules aux mêmes vitesses d'agitation, alors que les pili du type I le sont à des vitesses plus grandes. Aucune des vitesses employées n'inhibe la croissance cellulaire, la vitalité et la faculté de resynthèse des appendices.

Les cellules mâles dépiliées et remises dans des conditions de culture satisfaisantes synthétisent de nouveaux F-pili de taille normale en 4 ou 5 min. Cette synthèse est très rapide car au bout de 30 sec.

les F-pili présentent déjà une longueur moitié de leur longueur normale.

Le taux de régénération des F-pili varie avec le mode de culture et l'âge de celle-ci. Alors qu'une culture jeune est capable de synthétiser de nouveaux F-pili en quelques minutes, pour une culture de 24 heures, la nouvelle synthèse s'effectue avec une phase de latence de 1 heure (89).

5) Contrôle génétique des F-pili

Les travaux de BRINTON et coll. (12) ont prouvé que la synthèse des F-pili par une bactérie Hfr, F⁺ ou F' est absolument liée à la présence du facteur de fertilité F, donc l'élimination du facteur F par l'acridine orangée, transforme une bactérie mâle en bactérie femelle et parallèlement les F-pili disparaissent.

Il est possible de transférer par croisement le facteur F d'une bactérie mâle dans une bactérie femelle, ce qui déclenche la synthèse de F-pili chez cette dernière.

6) Propriétés antigéniques des F-pili

ØRSKOV et ØRSKOV (76) ont montré les premiers la présence d'un antigène f⁺ spécifique des souches mâles d'E. coli. Cet antigène n'a jamais été détecté chez les souches F⁻. En 1967, ISHIBASHI (48)

montre en microscopie électronique que cet anticorps spécifique s'agglutine aux F-pili des souches mâles d'E. coli K12. Les pili du type I ne montrent pas une telle agglutination. En outre, l'agglutination des cellules mâles avec un sérum anti f^+ est inhibée lorsque l'on élimine les F-pili des bactéries ou lorsque des phages à RNA spécifique des bactéries mâles recouvrent complètement les F-pili. Il est probable que l'adsorption des phages cause un empêchement stérique à la formation du complexe antigène-anticorps. Une suspension de F-pili s'agglutine avec le sérum anti f^+ . ISHIBASHI conclut de ces travaux que le F-pilus est la structure responsable de l'agglutination et qu'il est certainement identique à l'antigène f^+ .

C) Rôle des F-pili

Pour certains auteurs, les F-pili jouent un rôle important au cours de l'étape initiale de l'infection d'une bactérie mâle par un phage spécifique.

Pour d'autres, les F-pili auraient également une fonction au cours du déroulement de la conjugaison bactérienne. Ils serviraient en effet d'organes d'attachement de la bactérie mâle sur la bactérie femelle et contribueraient ainsi à la formation du pont intercellulaire par lequel le matériel génétique de la bactérie mâle pourrait être transféré dans la bactérie femelle.

1) Rôle des F-pili au cours de l'infection phagique

VALENTINE et coll. (88) ont démontré que chez les bactéries mâles, les F-pili sont nécessaires à l'adsorption des phages à RNA. En effet, des cellules dépiliées par agitation mécanique perdent leur capacité de fixer de tels phages. La présence dans le milieu d'ions métalliques divalents tels Ca^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} est indispensable pour obtenir une adsorption satisfaisante. Le rôle joué par ces ions n'est cependant pas encore connu mais cette constatation est en accord avec les résultats de LOEB et ZINDER (66) qui ont montré que l'ion calcium est nécessaire au développement des phages. Il semble que les F-pili jouent le rôle de récepteur et qu'ils sont impliqués dans le transport du RNA phagique vers la cellule mâle.

FAREED et coll. (30) ont étudié l'adsorption du phage f1 à DNA sur les F-pili et sont parvenus à mettre en évidence le passage effectif du DNA phagique vers la cellule mâle. Une suspension de phages f1 marqués au ^{32}P est sonniquée pendant 4 min, ce qui a pour effet de les briser en petits fragments. Ils sont mis en contact avec des cellules mâles à 37°C pendant des temps bien déterminés, afin de permettre aux fragments de phages de se fixer à l'extrémité des F-pili et au DNA phagique d'être injecté dans la cellule.

Les fragments de phages qui ne sont pas fixés et l'ensemble des F-pili sont éliminés par agitation mécanique et centrifugation. Les cellules mâles sont devenues radioactives, ce qui montre qu'elles contiennent des fragments de DNA phagique. Le témoin obtenu à partir d'une culture de bactéries femelles traitées dans les mêmes conditions,

ne contient pas de DNA marqué. Les F-pili de la bactérie mâle servent donc au passage du DNA phagique au cours de l'infection.

En 1966, BRINTON (11, 9) décrit les premières étapes de l'infection d'une bactérie mâle par des phages à RNA et à DNA.

Les phages à RNA s'adsorbent sur des sites récepteurs localisés tout le long du F-pilus. Les phages à DNA s'adsorbent sur les sites localisés à l'extrémité du F-pilus. Alors qu'un grand nombre de phages à RNA sont capables de se fixer sur le F-pilus, seulement quelques phages à DNA s'adsorbent à son extrémité.

L'acide nucléique phagique se sépare alors de la coque protéique du phage, puis est injecté dans la cellule mâle par l'intermédiaire du F-pilus.

2) Rôle des F-pili au cours de la conjugaison bactérienne

En 1965, BRINTON (8) montre que la présence des F-pili chez la bactérie mâle est indispensable au cours du croisement. En effet, des cellules mâles dépillées perdent leur aptitude à conjuguer. La régénération de leurs F-pili leur permet de retrouver la capacité de conjuguer normalement. Depuis, de nombreux travaux sont venus confirmer que les F-pili sont nécessaires à la formation des couples (16, 19, 22, 33, 53). Cependant, BRINTON (8), BRINTON et coll. (12) et KNOLLE (53) pensent que les F-pili ne sont pas seulement nécessaires à la formation des couples, mais qu'ils servent également au passage du DNA de la

cellule mâle vers la cellule femelle.

BRINTON (8) propose un modèle de transfert du chromosome. Celui-ci se ferait par l'intermédiaire du F-pilus synthétisé par la cellule mâle sous le contrôle du facteur F. Ce modèle se compose de cinq étapes principales.

a) Collision entre deux cellules de sexe opposé :

L'extrémité du F-pilus de la bactérie mâle se fixe sur un site récepteur de la cellule femelle.

b) Connection :

Il se forme une connection qui résiste à l'agitation, aux pipettages doux et aux dilutions.

c) Initiation du transfert :

Lorsque la connection est établie, un signal se produit qui déclenche le transfert du chromosome.

d) Transfert :

Le DNA bactérien (facteur F, fragments de chromosome ou chromosome) est transmis de la cellule donatrice vers la cellule réceptrice par l'intermédiaire du F-pilus.

e) Séparation :

Séparation des cellules et expression génotypique et phénotypique dans la cellule réceptrice.

D'autres auteurs tels CURTISS (19), NOVOTNY et coll. (74) pensent que le F-pilus sert dans un premier temps à la stabilisation des couples, mais qu'ensuite il intervient dans la formation du pont intercellulaire ou du contact intime entre les deux cellules. Ainsi le transfert du DNA pourrait se faire plus facilement que par l'intermédiaire du F-pilus lui-même.

IPPEN et VALENTINE (47) s'appuyant sur les résultats de CARO et SCHNÖS (16) ont étudié l'effet sur la formation des couples, de l'adsorption des phages f1 et f2 sur les F-pili.

Ils ont ainsi démontré que les phages f1 à DNA (qui se fixent à l'extrémité du F-pilus) inhibent la formation des couples lorsqu'ils sont placés dans le milieu de croisement en même temps que les bactéries mâles et femelles.

Par contre, ils sont sans action s'ils sont ajoutés au mélange de croisement lorsque les couples sont déjà formés.

Les phages f2 à RNA (qui se fixent tout le long du F-pilus) ont un effet inhibiteur, qu'ils soient ajoutés avant ou après la formation des couples.

Des travaux plus récents de NOVOTNY et coll. (73) ont confirmé ces résultats. Ces auteurs utilisent les phages R17 et M13.

Les phages à DNA inhibent la formation des couples mais n'affectent pas les couples préformés. Ils pensent que les phages à DNA, en se fixant à l'extrémité du F-pilus, empêchent la cellule mâle de reconnaître la cellule femelle. Réciproquement, l'attachement du mâle sur la femelle bloque les sites récepteurs du phage f1 sur l'extrémité du

F-pilus et celui-ci ne peut s'y fixer.

Les phages à RNA inhibent la formation des couples et, de plus, ils empêchent le transfert du DNA chez les couples déjà formés, soit :

- par altération structurale : l'adsorption des phages à RNA tout le long du F-pilus en modifie la structure,
- par altération fonctionnelle : le passage du RNA phagique bloque le F-pilus et empêche le passage du DNA de la cellule mâle vers la cellule femelle.

Cependant, il faut noter que le mélange de croisement utilisé au cours de ces expériences, ne représente pas un ensemble homogène. En effet, il contient, outre des cellules mâles et femelles libres, des couples en formation et des zygotes ; chacun de ces constituants réagissant différemment à l'action des phages. De plus, quelques cellules donatrices peuvent être temporairement infertiles. Ainsi, les résultats obtenus ne permettent pas de déterminer d'une façon précise quelle est l'étape de la conjugaison qui a été inhibée.

Ces auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle les phages spécifiques des bactéries mâles inhiberaient la formation des couples en empêchant la synthèse de nouveaux F-pili. Des observations au microscope électronique ont montré qu'une forte concentration en phages à RNA ou à DNA est sans action sur la synthèse des F-pili. Il semble donc que les phages spécifiques des bactéries mâles ont une influence sur le fonctionnement du F-pilus, mais nullement sur sa synthèse.

Ces mêmes auteurs (73) pensent que le F-pilus pourrait servir à la stabilisation des couples et que le transfert du matériel

génétiq ue se ferait par une autre connection. Le F-pilus serait en quelque sorte le vecteur du signal de reconnaissance entre les deux cellules, ce signal étant nécessaire à l'initiation du transfert du DNA du donneur.

OU et ANDERSON (77) ont montré récemment que dans un croisement, il pouvait exister des bactéries de sexe opposé en contact intime, ainsi que des bactéries en contact par l'intermédiaire du F-pilus de la bactérie mâle. Ils ont également démontré que les paires en contact intime sont en moyenne deux fois plus fertiles que celles en contact plus éloigné par l'intermédiaire du F-pilus. Ils pensent que cette différence de fertilité est due au fait que le DNA bactérien a plus de facilité à passer de la bactérie mâle à la bactérie femelle lorsque le contact est intime, que lorsqu'il se fait par l'intermédiaire du F-pilus.

TRAVAUX PERSONNELS

La plupart des auteurs ayant étudié la conjugaison bactérienne admettent qu'elle se déroule en cinq étapes dont certaines peuvent être individualisées. C'est le cas des deux premières étapes particulièrement importantes, au cours desquelles se produisent la reconnaissance et le contact entre la cellule mâle et la cellule femelle. Le déroulement de ces étapes ne fait cependant pas l'unanimité.

Certains auteurs pensent que les deux cellules de sexe opposé s'accolent et que, lorsque la connection intercellulaire est solidement établie, le matériel génétique est transféré de la cellule mâle dans la cellule femelle.

D'autres admettent que la reconnaissance des cellules se fait grâce au F-pilus de la cellule mâle par lequel le DNA bactérien pourrait ensuite être injecté dans la cellule femelle, ou bien il servirait en se rétractant à l'intérieur de la cellule mâle à accoler les deux cellules, le DNA étant transféré seulement au moment où le contact intime est établi.

Ces deux hypothèses semblent aussi valables l'une que l'autre ; cependant, malgré l'utilisation de cellules mâles et femelles morphologiquement différentes, ces auteurs n'ont pas pu affirmer qu'ils étaient réellement en présence de cellules en cours de conjugaison.

Nous avons pensé qu'en étudiant en microscopie électronique un croisement entre une souche marquée d'E. coli et une souche non marquée, il nous serait plus facile de différencier les cellules mâles des cellules femelles. Le premier chapitre de ce travail sera donc consacré à l'étude du contact direct par autoradiographie en microscopie

électronique.

Dans le second chapitre, nous envisagerons l'étude du contact par l'intermédiaire du F-pilus de la bactérie mâle. A cet effet, nous décrirons une technique d'obtention et de purification des F-pili. Nous traiterons ensuite du rôle des F-pili par examen direct de croisements et par l'étude du devenir des F-pili au cours de la conjugaison.

CHAPITRE I

ETUDE DU CONTACT DIRECT PAR AUTORADIOGRAPHIE
EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

INTRODUCTION

Nous avons étudié en microscopie électronique le contact direct entre cellules mâle et femelle dans le but d'examiner la nature et la structure du pont intercellulaire, de rechercher s'il est possible d'observer le transfert du DNA de la bactérie mâle à la bactérie femelle et enfin d'étudier l'aspect du nucléoplasme au cours de la conjugaison.

Pour cela, il est indispensable que deux conditions principales soient remplies ; d'une part, il faut être assuré que le plus grand nombre possible de bactéries sont en cours de transfert ; d'autre part, il faut éviter que les manipulations qui aboutissent au recueil des bactéries en conjugaison n'entraînent leur séparation. La technique employée présente l'inconvénient d'accoler les bactéries. Ceci oblige à être extrêmement sévère dans l'observation des critères que nous avons choisis pour ne retenir que les images de conjugaison. Ces critères sont, soit l'existence d'un pont intercellulaire impliquant une déformation de la paroi, soit une solution de continuité entre deux cellules. Ce deuxième critère est observé normalement lors de la division, mais celle-ci est orientée selon le plus grand axe de la cellule mère. On peut éliminer avec certitude les images de division cellulaire en différenciant les bactéries mâles des bactéries femelles. Les caractères morphologiques qui avaient semblé utiles pour cette reconnaissance dans quelques expériences, sont en fait inconstants et ne présentent aucune sécurité dans le diagnostic des sexes.

Nous avons dès lors utilisé le marquage par les radioisotopes afin d'effectuer une étude autoradiographique de ce phénomène.

I - MATERIEL ET METHODES

Nous décrirons dans cette partie les méthodes et techniques couramment utilisées au cours de ce travail. Certaines techniques utilisées pour des expérimentations particulières seront décrites au cours de l'exposé des travaux.

A) Bactériologie

1) Souches bactériennes employées

Toutes les souches sont entretenues par repiquages périodiques en tubes de gélose nutritive. Entre chaque repiquage, les souches peuvent être conservées au congélateur dans un milieu nutritif liquide contenant de la glycérine. Nous avons utilisé les souches d'Escherichia coli K12 suivantes :

- souches mâles : Hfr Cya 221 Pro C

Hfr H

Hfr H Thy

- souches femelles : F⁻ 2000 X 17 k Thr Leu Arg Lac St_r

F⁻ PA 3091 Thr Leu Arg His Thy St_r

2) Milieux de culture utilisésa) Le milieu MSB₁ (40)

- Solution tampon :

Phosphate bipotassique	360 g
Phosphate monopotassique	40 g
. Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH 7,8	

Stérilisation par autoclavage à 105°C pendant 30 min.

- Solution minérale :

Sulfate d'ammonium	40 g
Sulfate de magnésium (7 H ₂ O)	4 g
Sulfate ferreux à 0,5 p. 100	2 ml
Chlorure de manganèse à 0,5 p.100	4 ml
Chlorure de sodium	0,3 g
. Eau distillée q.s.p.	1000 ml

Autoclaver à 105°C pendant 30 min.

- Solution de glucose à 10 p. 100 stérilisée à 105°C pendant 30 min.

Milieu MSB₁ liquide :

- Solution tampon 5 ml
- Solution minérale 5 ml
- Solution glucosée 10 ml
- Eau distillée stérile 80 ml
- 0,4 ml d'une solution de vitamine B1 à 500 μ g/ml
stérilisée par autoclavage à 105°C pendant 30 min

Milieu MSB₁ gélosé :

Milieu MSB₁ additionné de 25 g d'Agar Difco par litre

b) Milieu de Luria (67)

Tryptone Difco	10 g
Extrait de levure Difco	5 g
ClNa	5 g
. Eau distillée	1000 ml

pH 7,3

. Autoclaver à 121°C pendant 20 min.

Milieu de Luria gélosé :

Milieu de Luria additionné de 15 g d'Agar Difco par litre

c) Gélose blanche

Agar Biomar	5 g
. Eau distillée	1000 ml

Répartir à raison de 3,5 ml par tube

Autoclaver à 121°C pendant 20 min

3) Technique de croisement employée pour la numération des recombinants

Les souches sont cultivées une nuit à 37°C dans du milieu MSB₁ additionné de leurs exigences. Le matin, les cultures sont diluées dans le même milieu préchauffé à 37°C afin d'obtenir une densité optique de 0,05. Les bactéries sont remises en culture jusqu'à ce que la densité optique soit comprise entre 0,8 et 1.

Le croisement est réalisé dans les proportions de 1 Hfr pour 20 F⁻ pour un volume de 2 ml et passé stérilement sur filtre Millipore 0,45 µ. Le filtre est déposé à la surface d'une gélose nutritive à 7,5 p. 1000 d'Agar à 37°C pendant 5 min, puis placé dans 20 ml de milieu de Luria préchauffé à 37°C pendant le temps de croisement désiré. Le croisement est interrompu au Vortex pendant 1 min et dilué. 0,1 ml du croisement interrompu est alors porté dans un tube de gélose blanche préalablement fondue au bain marie et ramenée à 43°C au moment de l'emploi, puis coulé sur les boîtes de sélection. Les colonies de recombinants apparues sont comptées et leur pourcentage est exprimé par rapport à la souche mâle de départ.

4) Incorporation des radioisotopes

Elle est faite dans le milieu MSB₁ additionné des exigences de la souche. La technique de marquage employée pour chaque expérience sera décrite au fur et à mesure de l'exposé de nos résultats.

B) Techniques de microscopie électronique

Lorsque les croisements sont destinés à être observés au microscope électronique, le filtre est laissé sur la gélose nutritive à 7,5 p. 1000 d'Agar à 37°C pendant le temps de croisement désiré.

1) Fixation

Le filtre est recouvert d'une mince pellicule de milieu gélosé préalablement fondu au bain marie à 100°C et ramené à 40°C au moment de l'emploi.

- Composition de ce milieu :

Tryptone	1 p. 100
Gélose	2 p. 100
MgSO ₄	10 ⁻² M
Saccharose	0, 5 M

Après solidification de la gélose, le filtre est fragmenté et fixé durant 16 heures par le tétr oxyde d'osmium à 0,5 p. 100 en tampon véronal pH 6 selon RYTER et KELLENBERGER (80). On effectue ensuite une post-fixation dans l'acétate d'urane 1 p. 100 en tampon véronal pH 6 pendant une heure.

2) Inclusion

Le matériel à étudier est deshydraté par passages successifs dans des bains d'acétone 50, 70, 90 et 100 p. 100. Les

fragments sont ensuite inclus dans l'araldite selon GLAUERT et GLAUERT (36). La polymérisation est poursuivie pendant 18 heures à 60°C.

Les coupes sont effectuées à l'aide d'un ultramicrotome PORTER BLUM MT I équipé d'un couteau de diamant LEITZ. Elles sont recueillies sur grilles nues et contrastées au citrate de plomb selon REYNOLDS (79). Toutes les observations ont été faites au microscope électronique HITACHI HU 11 A sous une tension d'accélération de 75 KV.

3) Autoradiographie

Nous avons employé la technique autoradiographique en microscopie électronique proposée par DROZ (25) en utilisant l'émulsion photographique ILFORD L4 (ILFORD LIMITED ILFORD ESSEX G.B.).

Les rubans de coupes sont recueillis dans un anneau en plastique et déposés sur une lame de microscopie optique préalablement recouverte d'une membrane de collodion. Après séchage, les lames sont recouvertes d'une mince pellicule de carbone par évaporation sous vide dans un évaporateur EDWARDS 12 E₆, puis plongées dans l'émulsion photographique. Elles sont mises à sécher pendant une nuit à l'obscurité. Ces lames sont conservées à la température ordinaire dans des boîtes hermétiques pendant le temps d'exposition désiré. Elles sont ensuite révélées pendant 3 min 30 sec. à 4 min à 18°C dans du révélateur Kodak Microdol X. Après rinçage à l'eau distillée elles sont fixées pendant 5 min dans une solution de thiosulfate de sodium à 30 p. 100 préparée extemporanément.

La membrane de collodion est décollée de la lame et une grille nue est déposée à l'emplacement des coupes. Après pèchage des grilles, la membrane de collodion est émincée par passage pendant deux minutes dans de l'acétate d'isoamyle pur. Les coupes sont alors contrastées au citrate de plomb selon REYNOLDS et observées au microscope électronique.

II - INCORPORATION DES RADIOISOTOPES CHEZ LES SOUCHES F⁻ 2000 X 17 K et Hfr Thy

L'incorporation a été réalisée par culture dans du milieu MSB₁ additionné des exigences de la souche, en présence soit de L-leucine ³H-4-5, soit de ³H méthyle thymine.

La souche femelle a été marquée à la ³H Leucine (activité spécifique 25 Ci/mM) à raison de 20 μCi/ml durant une génération. La souche Hfr Thy a été marquée à la ³H Thymine (activité spécifique 5,6 Ci/mM) à raison de 40 μCi/ml durant une génération.

La souche F⁻ marquée a été croisée avec une souche Hfr Cya, la souche Hfr Thy marquée avec une souche de F⁻ 2000 X 17 k. Les autoradiogrammes ont été exposés durant quatre semaines.

Cependant, l'activité spécifique utilisée s'est révélée insuffisante pour que toutes les bactéries cultivées en présence des radioisotopes présentent un point de marquage. Néanmoins, nous avons pu faire les observations suivantes.

III - DESCRIPTION DES IMAGES OBSERVEES

A) Orientation des cellules en conjugaison et point de contact

La plupart des cellules qui peuvent être considérées en voie de conjugaison, sont situées dans deux directions sensiblement perpendiculaires et il ne semble pas exister de point de contact privilégié. En effet, nous avons constaté que ce dernier pouvait être en position terminale, subterminale ou centrale. Il faut toutefois noter que ces critères nous font peut être éliminer des bactéries en conjugaison ayant l'aspect morphologique de bactéries en division.

B) Aspect du pont intercellulaire

Deux types de communications intercellulaires ont été observés. L'un correspond à un accollement intime de deux cellules avec une solution de continuité au niveau de la paroi et peut être de la membrane (photo n°1). L'autre se présente sous la forme d'un pédoncule plus ou moins long (photo n°2).

C) Décollement de la paroi

Il est fréquent d'observer dans les préparations impliquant un croisement, des décollements plus ou moins accentués de la paroi ou d'une partie de celle-ci (photos n°3 et 4). La fréquence de cette altération est variable selon les expériences.

D) Aspect des nucléoplasmes

Les corps nucléaires ont des formes différentes selon les expériences. Dans certaines d'entre-elles ils sont diffus, répartis en petites plages dans le cytoplasme (photos n°2, 3 et 4). Dans d'autres, leur aspect est compact et fibrillaire (photo n°1). Chez les bactéries semblant en conjugaison, on constate parfois que les corps nucléaires des deux partenaires sont proches l'un de l'autre. De plus, certains aspects sont en faveur d'un déplacement du nucléoplasme vers le point de contact (photo n°1).

IV - DISCUSSION

Notre étude semble indiquer que deux cellules en cours de conjugaison sont disposées en croix sans qu'il y ait de point de contact privilégié. Ce positionnement pourrait être obligatoire, mais il pourrait aussi s'agir de la plus grande probabilité d'accolement au hasard des cellules. Les premières études de la conjugaison après ombrage, effectuées par LEDERBERG (60) et surtout par ANDERSON et coll. (2) ont montré deux types de connection intercellulaire d'une part des tubes, d'autre part un contact intime correspondant à une véritable fusion.

Nous avons également observé ces deux types de connection. Selon les manipulations, on observe en grande majorité l'un ou l'autre

des deux types. Ceci pourrait indiquer qu'il y ait deux modes différents de conjugaison, liés aux conditions expérimentales. Il paraît plus raisonnable de penser que ces types coexistent et se succèdent dans le temps.

La rareté des figures de fusion étendues sur une certaine longueur par rapport à celles n'intéressant qu'un point et leur faible densité aux électrons, semblent indiquer qu'à ce niveau, la substance cellulaire est moins épaisse que la coupe. On pourrait donc concevoir que le pont intercellulaire puisse se présenter sous forme d'une lamelle de 200 à 300 μ de long sur environ 100 μ d'épaisseur.

La mise en évidence du décollement de la paroi pourrait indiquer que le tube correspond à un étirement anormal du pont intercellulaire. La position des corps nucléaires est un argument supplémentaire en faveur de la réalité d'une conjugaison bactérienne sur les images observées.

Cette étude ne nous a certes pas donné de résultats complets, mais elle nous a permis de faire des observations intéressantes et de nous familiariser avec la technique autoradiographique en microscopie électronique.

Nous avons donc repris ces expériences en réalisant des croisements entre la souche F⁻ PA 3091 marquée au tritium et la souche HfrH non marquée.

V - CONDITIONS DU CROISEMENT ENTRE LA SOUCHE F⁻ PA 3091
MARQUEE ET LA SOUCHE HfrH

Le but de la présente expérience a été d'identifier avec certitude les bactéries de sexe différent au moyen d'un marquage isotopique convenable et de déterminer si la technique de l'autoradiographie appliquée à la microscopie électronique pouvait permettre d'étudier avec succès la conjugaison bactérienne.

A) Essais en vue d'obtenir un marquage maximum
de la souche F⁻ PA 3091

En milieu MSB₁ additionné des exigences normales de la souche F⁻ PA 3091, soit 40 µg/ml de chacun des acides aminés, le taux de croissance horaire de cette souche est de 0,86. Pour obtenir un marquage convenable, il nous a semblé que la culture en présence de radioéléments devait se poursuivre durant cinq heures, temps correspondant à quatre générations successives. Afin de diluer le moins possible les acides aminés marqués, nous avons déterminé la concentration minimum en acides aminés permettant une croissance normale pendant cinq heures.

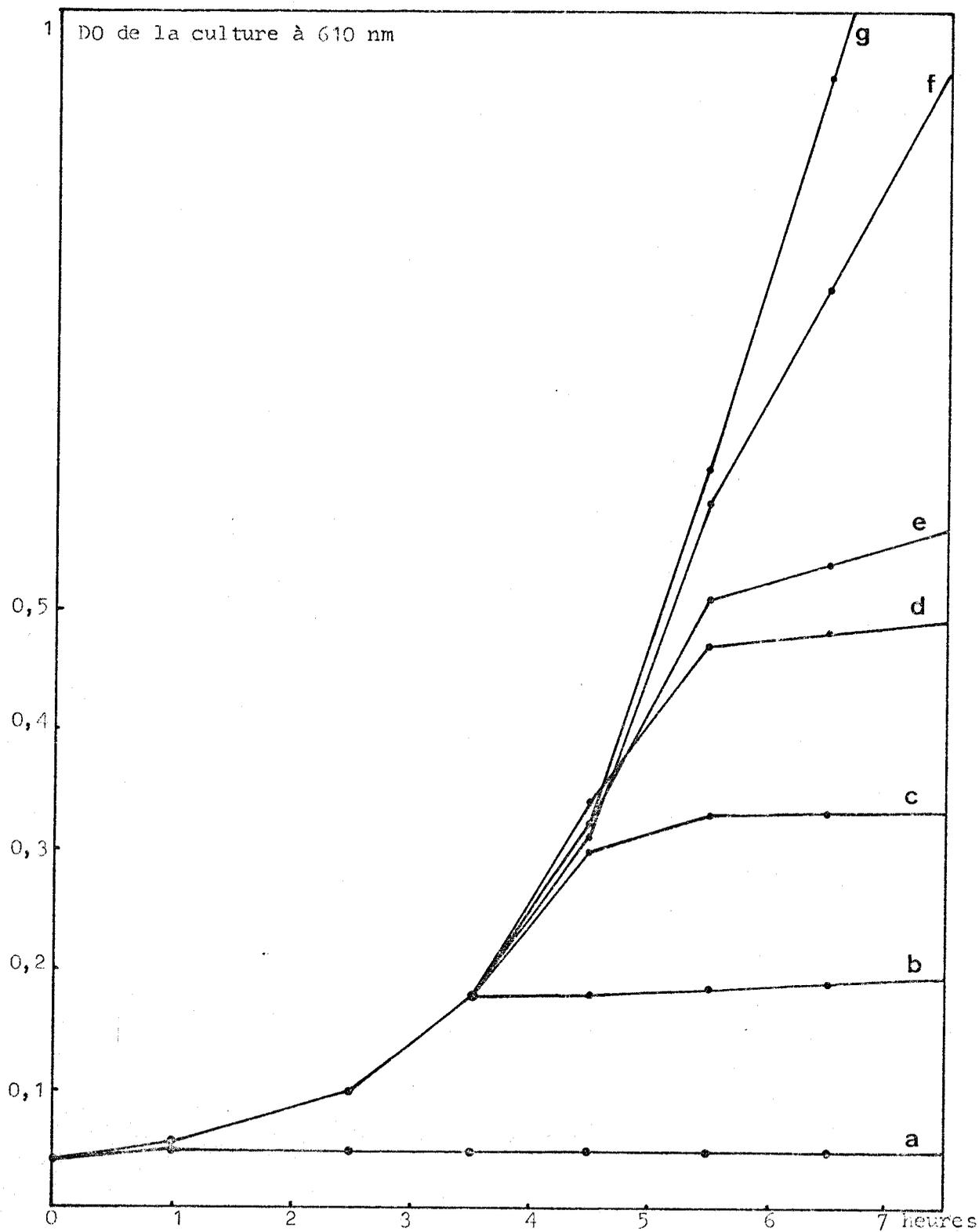
Le tableau II exprime les densités optiques des cultures de la souche F⁻ PA 3091 réalisées en présence de concentrations variables de chacun des acides aminés exigés.

concentration en A.A.en μg/ml Temps d'incubation	0	5	10	15	20	30	40
Temps 0	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040
1h	0,045	0,055	0,060	0,055	0,050	0,050	0,050
2h 30	0,050	0,115	0,115	0,110	0,105	0,100	0,105
3h 30	0,050	0,180	0,180	0,185	0,180	0,180	0,180
4h 30	0,050	0,180	0,300	0,340	0,325	0,315	0,325
5h 30	0,050	0,185	0,330	0,470	0,510	0,590	0,620
6h 30	0,050	0,190	0,330	0,480	0,540	0,770	0,945

TABLEAU II

Sur la figure 1, nous avons représenté la densité optique des cultures de la souche F⁻ PA 3091 en fonction du temps et en fonction de la concentration en acides aminés exigés.





- a) Milieu MSB1 contenant 0 µg par ml de chacun des acides aminés exigés
 b) 5 µg
 c) 10 µg
 d) 15 µg
 e) 20 µg
 f) 30 µg
 g) 40 µg



Nous avons retenu pour chacun des acides aminés indispensables la concentration de $30 \mu\text{g/ml}$, dose qui permet une croissance normale pendant cinq heures.

Les cellules F^- PA 3091 ont donc été marquées en les cultivant pendant cinq heures dans le milieu MSB1 contenant $30 \mu\text{g/ml}$ de chacun des acides aminés exigés en présence de 1 mCi de L-leucine $^3\text{H-4-5}$ (activité spécifique 40 Ci/mM) et de 2 mCi de L-Histidine $^3\text{H-2-5}$ (activité spécifique 30 Ci/mM) (C.E.A. France).

B) Détermination du pourcentage de cellules F^- marquées par examen d'autoradiogrammes

a) En observant les coupes de cellules F^- marquées, nous avons déterminé que plus de 95 p. 100 de celles-ci étaient marquées. Ce pourcentage important doit nous permettre de situer exactement la cellule femelle par rapport à la cellule mâle lors de l'observation des croisements.

b) Mis à part quelques points de marquage dus aux contaminations habituelles, nous avons constaté le plus souvent que les cellules sont marquées au niveau de leurs enveloppes. La masse nucléaire des bactéries est très rarement marquée et, si elle l'est, elle ne l'est qu'en périphérie.

c) Conditions de croisement

Pour que la plupart des cellules Hfr entrent en conjugaison, nous avons effectué les croisements dans les proportions de 1 Hfr pour 20 F⁻. Les résultats de deux croisements effectués dans ces conditions, sont portés sur le tableau **III**. Ils montrent indirectement qu'une forte proportion des cellules Hfr ont transféré la partie proximale de leur chromosome à des cellules F⁻.

Temps de contact	Nombre de recombinants pour 100 Hfr initiaux (sélection Thr + Leu + Str)	
	Premier croisement	Deuxième croisement
15 min	2,1	3
45 min	67	27

TABLEAU III

L'examen des bactéries est effectué après des temps de contact différents : l'un bref, qui correspond au début du passage du chromosome de la cellule Hfr dans la cellule F⁻, l'autre plus long, après le transfert de la moitié du chromosome de la cellule donatrice. Le temps de contact de 15 min a été choisi afin de réduire au maximum la probabilité de rupture spontanée des couples et d'augmenter ainsi les chances d'observer des bactéries en voie de conjugaison.

En effet, en considérant que le contact a lieu durant les dix premières minutes (52), nous avons choisi d'étudier les cellules après ce temps en vérifiant simultanément qu'il n'y avait qu'un très faible pourcentage de recombinants pour les caractères chromosomiques proximaux. Le temps de contact de 45 min a permis de rechercher s'il existait des différences dans l'aspect des cellules en conjugaison en fonction du temps.

VI - DESCRIPTION DES IMAGES OBSERVEES

L'étude des autoradiogrammes faits à partir de croisement dont l'un des parents est marqué, nous a permis d'observer que deux cellules en contact peuvent prendre des aspects différents.

Schématiquement deux cas se sont présentés :

A) Accolement entre cellules de sexe différent

Nous avons observé des cellules de sexe différent semblant être en cours de conjugaison.

L'intensité du marquage des cellules F^- permet de les différencier avec quasi certitude des cellules Hfr. Les cellules en conjugaison sont réunies par l'intermédiaire d'un pont semblable à celui que nous avons décrit précédemment. Les cellules observées sur la photo n° 5 proviennent d'un croisement de 45 min. Le pont intercellulaire

en position subterminale est constitué de la paroi de la cellule F⁻, la membrane cytoplasmique bien visible est restée en place. Cette figure a été observée de nombreuses fois et il semble qu'elle ne corresponde pas au premier stade de la conjugaison.

La photo n° 6 est semblable à la précédente, mais on ne peut observer la structure interne du pont intercellulaire ici en position terminale, le plan de coupe passant à l'extérieur de celui-ci.

Les photos n°7 et 8 qui correspondent à un croisement de 15 min, montrent un aspect différent du contact entre les deux cellules. On peut penser qu'il s'agit là d'un début de conjugaison ; les cellules sont en effet réunies par quelques "excroissances" de l'enveloppe bactérienne.

Bien que nous ayons observé de très nombreux autoradiogrammes il n'a pas été possible de révéler d'autres différences importantes entre l'aspect des cellules en contact lors d'un croisement de 15 min et 45 min. Il faut cependant noter que nous avons vu beaucoup de cellules en contact lors de l'étude du croisement ayant duré 45 min (photos n° 9 et 10

B) Accolement entre cellules de même sexe

Il existe également des cellules de même sexe accolées pouvant être prises pour des cellules en cours de conjugaison.

La photo n° 13 montre deux cellules F⁻ marquées, accolées par l'intermédiaire de structures arrondies. Ces structures sont en

contact avec la paroi des deux cellules F⁻.

Nous avons également observé plusieurs contacts entre cellules mâles (photo n° 14). L'aspect de telles images est semblable à celui observé lorsqu'il s'agit d'accolements entre cellules de sexe différent. En effet, nous avons retrouvé des contacts en position terminale, subterminale ou centrale et un positionnement en croix des deux cellules.

VII - DISCUSSION

L'observation des autoradiogrammes nous a apporté deux éléments différents, l'un positif, l'autre négatif.

Tout d'abord, nous avons obtenu des images montrant des cellules de sexe différent pouvant être considérées en conjugaison. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence des appariements entre des cellules de même sexe.

SCHREIL et coll. (83) observant en microscopie électronique des coupes ultrafines de cellules morphologiquement différentes en cours de croisement, ont abouti à la conclusion que le contact entre cellule mâle et femelle se faisait par l'intermédiaire de "bulles", structures arrondies constituées des deux feuillettes externes de la paroi.

Sur les autoradiogrammes, nous avons retrouvé des structures semblables, mais entre des cellules de même sexe, ici deux cellules F⁻ (photo n° 13).

Il semble donc que les "bulles" qui, pour SCHREIL et coll., ont un rôle dans la conjugaison, ne sont en réalité que des artefacts. Nous avons d'ailleurs observé ces mêmes structures arrondies dans des cultures pures de cellules mâles (photo n° 11) et de cellules femelles (photo n° 12).

Nos résultats rejoignent ceux de LANCASTER et SKVARLA (57). Pour ces auteurs, les images observées par SCHREIL et coll. ne sont en réalité que des artefacts engendrés par une agglutination non spécifique des cellules.

VIII - CONCLUSION

De l'étude de ces croisements, nous pouvons donc conclure que la technique autoradiographique permet d'observer l'aspect de quelques cellules en cours de conjugaison. Cependant, l'existence de figures d'appariements entre cellules de même sexe pouvant exister, on peut douter de la réalité de la conjugaison lorsque l'on rencontre un même aspect entre des cellules de sexe différent. De plus, l'observation des autoradiogrammes ne permet pas d'éliminer avec certitude les figures de division ayant l'aspect de cellules en cours de conjugaison.

Dès lors, les techniques employées ne nous ont pas semblé suffisantes pour affirmer que nous étions en présence de bactéries

en cours de conjugaison. Nos techniques expérimentales ne nous permettent pas de déterminer si deux cellules en contact par un pont intercellulaire constituent réellement deux bactéries en cours de transfert génétique.

Nous avons donc tenté d'aborder le problème en étudiant un autre processus possible de la conjugaison, celui au cours duquel interviendraient les F-pili.

CHAPITRE II

ETUDE DU CONTACT PAR L'INTERMEDIAIRE DU F-PILUS
DE LA BACTERIE MALE

INTRODUCTION

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressé au contact entre cellules mâles et femelles par l'intermédiaire des F-pili des bactéries mâles. Cette étude a été menée en utilisant deux techniques :

Nous avons mis au point une méthode d'extraction et de purification des F-pili qui nous a permis de les situer dans des gradients de densité de saccharose. En étudiant au microscope électronique après ombrage un mélange de cellules mâles et femelles, nous avons montré que l'on pouvait observer des cellules de sexe différent reliées entre elles par des F-pili.

Nous nous sommes alors proposé d'étudier le devenir de ces appendices sexuels en les extrayant de cellules en croisement et en les soumettant à une centrifugation en gradient de densité de saccharose.

I - MATERIEL ET METHODESA) Bactériologie1) Souches employées

Hfr Cya Pro C

HfrC Thy Pro C

F⁻ 2000 X 17 K Thr Leu Arg Δlac Str2) Milieux de culture utilisésa) Milieu de Lennox (1) (63)

Chlorure d'ammonium	5 g
Nitrate d'ammonium	1 g
Sulfate de sodium anhydre	2 g
Phosphate bipotassique	9 g
Phosphate monopotassique	3 g
Sulfate de magnésium	0,1 g
. Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH 7	

Autoclaver 20 min à 121°C

Milieu de Lennox gélosé :

Milieu de Lennox additionné de 15 g d'Agar Difco par litre

b) Milieu Z (73)

Tryptone Difco	10 g
Extrait de levure Difco	1 g
ClNa	8 g
. Eau distillée	1000 ml

pH 7,3

Autoclaver 20 min à 121°C

Milieu Z gélifié :

Milieu Z additionné de 15 g d'Agar Difco par litre

3) Technique de croisement

La bactérie Hfr est cultivée en milieu de Luria glucosé à 1 p. 100 en anaérobiose et la bactérie F⁻ dans le même milieu non glucosé et en aérobie selon GUILLAUME et coll.(41). Le croisement est réalisé par mélange de 5×10^7 Hfr avec environ 5×10^8 F⁻ pour un volume de 1 ml. Il est incubé à 37°C sans agitation pendant 10 min.

B) Technique d'obtention et de dosage du stock de phages f2

1) Sur le milieu Z solide

a) Obtention du stock

Cette technique est couramment utilisée au laboratoire. Elle permet d'obtenir rapidement un nouveau stock de phages.

La souche mâle choisie (ici Hfr Cya) est cultivée dans du bouillon de Luria agité pendant une nuit à 37°C. Le matin, elle est diluée dans le même milieu préchauffé et remise en culture jusqu'à obtenir une concentration de 8×10^8 bactéries par ml. Pour 10 ml de culture, on ajoute 0,1 ml de chlorure de calcium (CaCl_2) 0,5 M pendant 10 min à 37°C et en agitation.

Le stock de phages f2 est dilué dans du milieu de Luria pour obtenir environ 10^8 phages par ml.

Dans un tube, on porte 0,25 ml de culture et 0,1 ml de phages. On fait autant de tubes que l'on désire de boîtes. On porte les tubes à 37°C pendant 20 min sans agitation afin de permettre aux phages de s'adsorber sur les F-pili des bactéries.

On ajoute à chaque tube un tube de gélose blanche fondue au bain marie bouillant et dont la température est maintenue à 43°C. Le tube est coulé en double couche sur milieu Z gélosé.

Les boîtes sont portées à l'étuve à 40°C pendant 8 heures environ. La gélose est ensuite grattée avec un étaleur en verre et centrifugée à 10.000 tours/min pendant 30 min. Le surnageant obtenu contient les phages. Le stock est conservé à 4°C en présence de chloroforme (1 ml).

b) Dosage du stock

Le stock ainsi obtenu est dilué dans du milieu de Luria jusqu'à 10^{-9} et dosé en utilisant la culture de la veille gardée à + 4°C.

Dans 0,25 ml de culture, on porte 0,1 ml de la dilution de phages désirée. Après une adsorption de 20 min à 37°C sans agitation et addition d'un tube de gélose blanche, on coule sur des boîtes de milieu Z. L'incubation se prolonge 8 heures environ à 40°C. Les plages de lyse sont comptées et le titre du stock exprimé en UFP par ml (UFP : Unité formant plage). On obtient couramment des titres de 10×10^{10} UFP/ml.

2) Sur le milieu de Lennox gélosé

Dans le but de marquer le phage f2 au ^{32}P , nous avons mis au point une technique d'obtention du phage f2 sur milieu synthétique gélosé de Lennox (L). Le milieu L contient par litre 9 g de phosphate bipotassique et 3 g de phosphate monopotassique.

Avant d'entreprendre le marquage du phage f2, nous avons recherché l'influence de la concentration en phosphates mono et bipotassique sur la croissance de la souche Hfr Cya.

La souche Hfr Cya est cultivée une nuit à 37°C en agitation dans du milieu L glucosé à 0,5 p. 100 additionné de 1 ml de vitamine B1 à 500 γ /ml, de 1 ml de proline à 1 p. 100 et de 2,5 ml d'une solution à 20 p. 100 d'un hydrolysate de caséine encore appelé "casaminoacids".

Le matin, la culture est diluée dans ce même milieu pour obtenir une densité optique (DO) de 0,05, lue à 600 nm. Elle est remise en agitation à 37°C jusqu'à une densité optique égale à 0,2.

Les bactéries sont centrifugées et lavées dans du milieu L sans phosphate. Après centrifugation, les bactéries sont incubées dans du milieu L contenant des concentrations variables en phosphates.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant.

Temps d'incubation concentration en phosphates	Densités optiques lues à 610 nm					
	0	1h 30	2h 15	3 h	4 h	5 h
normale	0,070	0,390	0,720	1,27	1,91	2,20
1/5 de la normale	0,065	0,425	0,880	1,60	2,00	2,13
1/10 "	0,060	0,390	0,760	1,30	1,55	1,70
1/100 "	0,065	0,460	0,710	0,880	1,02	1,09

TABLEAU IV

Etude de la croissance de la souche Hfr Cya en fonction du temps d'incubation et de la concentration en phosphates dans le milieu de Lennox.

Par rapport à la culture témoin dans le milieu L normal, la souche Hfr Cya croit sensiblement de la même façon lorsque le milieu L ne contient que 1/5 ou 1/10 de la concentration normale en phosphates. Les cultures de 2h 15 sur milieu L normal et sur milieu L contenant 1/10 de phosphates, ont été retenues pour effectuer les stocks de phages.

Les cultures sont infectées à raison de 1 phage pour 25 bactéries pendant 30 min à 37°C puis coulées sur milieu L gélosé contenant les exigences de la souche et des concentrations en phosphates correspondant à celles des milieux liquides.

Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C.

Les stocks de phages sont ensuite dosés sur milieu Z selon la technique précédemment décrite. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Culture	Titre
sur milieu L	$3,3 \times 10^{11}$ UFP/ml
sur milieu L contenant 1/10 de phosphates	$2,4 \times 10^{10}$ UFP/ml

TABLEAU V

Nous avons constaté que le titre du stock de phages f2 en milieu L est 10 fois supérieur au titre obtenu sur le milieu L contenant le 1/10 de la concentration normale en phosphates. Cela semble à première vue un inconvénient, mais le titre obtenu est

néanmoins suffisant.

Il faut également noter que lors du marquage, l'addition d'acide phosphorique marqué au ^{32}P augmentera la concentration en phosphates dans le milieu, ce qui nous permettra d'obtenir un titre situé entre les deux valeurs données précédemment.

3) Obtention du stock de phages f2 marqués au ^{32}P

Pour chaque stock, nous avons utilisé 10 mCi d'acide phosphorique ^{32}P (C.E.A. France). Le marquage s'effectue en deux temps ; dans la culture elle-même à raison de 5 mCi et dans le milieu L gélosé pour les 5 mCi restantes. En moyenne, nous avons obtenu des stocks de phages f2 d'un volume de 20 ml titrant 10×10^{10} UFP/ml.

Ces stocks contiennent, outre les phages marqués, des molécules d'acide phosphorique radioactives en solution que nous devons éliminer pour obtenir une solution de phages f2 marqués la plus concentrée possible et débarrassée du marquage parasite.

4) Concentration du phage f2 marqué

Nous pouvons utiliser, soit une filtration de la solution phagique suivie d'une élution, soit une centrifugation afin d'obtenir un culot de phages.

a) Concentration par filtration

LODISH et coll. (64) ont montré que les phages f2 se fixent sur les filtres de nitrate de cellulose (Millipore HA 0,45 μ) lorsqu'ils sont placés dans une solution de chlorure de sodium de molarité finale égale ou supérieure à 0,15. Cette fixation est réversible. Les phages peuvent être décrochés en éluant le filtre à l'aide d'un milieu riche en peptone.

Nous avons tenté d'appliquer cette technique. Malheureusement, nous nous sommes rendu compte que nous ne pouvions pas aboutir à des résultats valables. En effet, la solution phagique obtenue selon la technique décrite plus haut, contient des fibres de gélose en suspension qui très vite, colmatent le filtre. De ce fait, la filtration demande plusieurs dizaines d'heures et l'élution devient impossible. L'emploi d'un dispositif de filtration sous pression ne nous a pas donné de meilleurs résultats. Nous avons donc mis au point une technique de concentration des phages par centrifugation.

b) Concentration par centrifugation

Afin d'éliminer au maximum les fibres de gélose en suspension dans le stock de phages, nous l'avons tout d'abord filtré sur deux préfiltres en microfibre de verre Millipore (Réf. AP 2004700). Le filtrat obtenu est centrifugé sur ultracentrifugeuse Spinco L2 65, pendant 2 heures à 45.000 tours/min en utilisant le rotor SW 65.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

- Titre du stock de phages f2 de départ : 9×10^{10} UFP/ml
15 ml de ce stock sont filtrés sur deux préfiltres
- Titre du filtrat obtenu (volume 15 ml) : 5×10^{10} UFP/ml
- Titre du surnageant de centrifugation (15 ml) : $0,07 \times 10^{10}$ UFP/ml
- Titre du culot de centrifugation repris par 3 ml de milieu L phosphates 1/
 $2,5 \times 10^{11}$ UFP/ml

c) Radioactivité du phage f2

L'échantillon à compter est déposé sur un filtre Millipore.
Après séchage, on place le filtre dans un flacon contenant 10 ml de
liquide scintillant de composition suivante :

Toluène Merck	1000 ml
PPO 2,5-diphényloxazole	5 g

La radioactivité est lue au Spectrophotomètre à scintillation liquide
Beckman type LS 100 fonctionnant à température ambiante.

Les stocks de phages que nous avons obtenus, possèdent
une radioactivité de 6×10^6 cpm par ml pour un titre de
 $2,5 \times 10^{11}$ UFP/ml.

C) Techniques de microscopie électronique

1) Ombrage

Une goutte de l'échantillon à observer est déposée sur une grille porte-objet pourvue d'une membrane de parlodion carbonée. Après 3 min de contact, la grille est essorée sur papier filtre et rincée dans du tampon Tris 10^{-2} M, Cl_2 Mg 10^{-2} M pH 7,2. Elle est de nouveau essorée puis séchée pendant une nuit à 37°C. La grille est ensuite ombrée par du palladium colloïdal dans un évaporateur sous vide Edwards 12 E₆.

2) Coloration négative

La technique de coloration est celle décrite par BRENNER (6). Une goutte de la suspension à étudier est laissée en contact pendant 3 min avec une grille porte-objet pourvue d'une membrane de collodion carbonée. L'excès de liquide est éliminé à l'aide d'un papier filtre. On dépose sur cette grille une goutte d'une solution de phosphotungstate de potassium à 2 p. 100 tamponnée à pH 7 pendant 30 sec. La grille est essorée et après dessiccation complète, la préparation est examinée directement au microscope électronique.

II - ETUDE DES F-PILI EN GRADIENT DE DENSITE

- Introduction

Comme nous l'avons vu aux pages 14 et 15, une bactérie mâle peut posséder, outre des F-pili, des pili non sexuels, principalement du type I, ainsi que des flagelles. Si nous voulons étudier les F-pili dans les meilleures conditions possibles, il est indispensable de les séparer des autres fimbriae. Nous avons mis au point une méthode d'extraction des pili qui sera décrite dans la première partie de ce paragraphe. Cette méthode a été utilisée dans le but de comparer des suspensions de pili isolés de cellules Hfr possédant des F-pili avec celles obtenues à partir de cellules F⁻ dépourvues de F-pili.

Dans la deuxième partie, nous envisageons la purification des pili par centrifugation en gradient de densité.

A) Obtention des pili

1) Technique employée

Les bactéries sont cultivées une nuit à 37°C dans du milieu de Luria glucosé à 1 p. 100 en aérobiose. Le lendemain, la culture est diluée dans deux litres du même milieu préchauffé à 37°C pour obtenir une densité optique de 0,2 lue à 610 nm. La culture est laissée en anaérobiose à 37°C sans agitation pendant 2 heures environ jusqu'à ce que la densité optique soit comprise entre 0,8 et 1. La culture est alors centrifugée à 2500 g pendant 15 min sur une centri-

fugeuse réfrigérée SORVALL RC2 en utilisant le rotor GSA et lavée dans le tampon Tris 10^{-2} M Cl_2Mg 10^{-2} M pH 7,2.

Le culot est remis en suspension dans le même tampon pour obtenir un volume de 40 ml et soumis aux chocs hydrodynamiques dans un appareil "Virtis" tournant à 12.000 tours/min pendant 3 min. La suspension obtenue est centrifugée pendant 30 min à 7.000 g en utilisant le rotor SS34. Le surnageant est prélevé et centrifugé 1 heure à 40.000 g sur le même rotor. Toutes les manipulations sont réalisées à + 4°C.

Le culot contenant les pili est remis doucement en suspension dans 1 ml de tampon. Il est déposé à la surface d'un gradient de saccharose de 29 ml confectionné à partir de solutions de saccharose à 10 p.100 et à 40 p.100 dans le tampon décrit précédemment. Après centrifugation durant 1h 30 à 70.000 g en employant le rotor SW 25-1, les différentes fractions de 2,5 ml sont recueillies et lues à 260 nm et 280 nm en utilisant un spectrophotomètre Zeiss M4 QIII.

2) Examen des pili en microscopie électronique

a) En l'absence de phages f2

Avant de soumettre la suspension de pili à la centrifugation sur gradient de saccharose, il nous a semblé intéressant d'étudier en microscopie électronique l'aspect des pili isolés d'une souche mâle et d'une souche femelle, afin de voir si nous pouvions déceler les F-pili dans un mélange complexe de pili.

La photo n° 15 montre la suspension de pili obtenue à partir d'une culture de la souche Hfr Thy. Cette préparation est très hétérogène : nous y voyons deux sortes d'éléments filamenteux, les uns d'une longueur moyenne de $0,8\mu$ et d'une largeur de $0,03\mu$, les autres nettement plus fins, d'une longueur de 2μ en moyenne. Ces derniers éléments s'accolent les uns aux autres pour former des sortes de bottes.

La comparaison des préparations de pili provenant de souches Hfr avec celle de pili isolés de la souche F^- cultivée en anaérobiose et sans agitation, devrait permettre de déterminer quels sont les F-pili, puisque la souche F^- en est dépourvue. La photo n° 16 représente l'image d'une suspension de pili obtenue à partir de la souche F^- 2000 X 17 k. Nous remarquons qu'elle est très différente de celle provenant de la souche Hfr. On y rencontre également deux sortes d'éléments. Les plus gros ont des dimensions et un aspect semblables à ceux observés dans la suspension obtenue à partir de la souche Hfr. Quant aux éléments plus fins, ils sont très peu nombreux et ne s'agglutinent pas entre eux.

Les pili de diamètre plus faible, assemblés en amas, que l'on trouve dans les préparations provenant d'Hfr, correspondent donc vraisemblablement aux F-pili.

b) En présence de phages f2

Pour identifier avec certitude les pili, nous les avons mis en contact avec une suspension de phages f2.

Dans un tube à hémolyse, on porte 0,25 ml de la suspension de pili et une goutte de chlorure de calcium 0,5 M. Après 10 min à 37°C, on ajoute 0,1 ml d'une suspension de phages f2 titrant environ 10^{10} UFP/ml. Le tube est laissé à 37°C pendant 20 min. La suspension est alors colorée négativement selon la technique de BRENNER (6).

L'adsorption du phage f2 sur une cellule Hfr permet de voir qu'elle peut être pourvue de plusieurs F-pili (cinq sur la photo n° 18). Après élimination des cellules et concentration, on constate sur les photos n° 19 et 20, que les F-pili correspondent bien aux éléments de plus faible diamètre décrits précédemment. Dans nos conditions expérimentales, nos préparations sont très riches en F-pili par rapport aux pili non sexuels. Nous avons également mis en contact des phages f2 avec la suspension de pili isolés de la souche F⁻. Dans ce cas, nous n'avons jamais observé d'adsorption de ce phage.

3) Etude comparative en gradient de densité d'une suspension de pili isolés de souches Hfr et F⁻

Etant donné que la principale différence observée en microscopie électronique entre les cellules Hfr et F⁻ consiste en l'absence de F-pili chez ces dernières, nous avons pensé qu'il serait peut être possible d'observer des différences dans les profils des gradients de densité faits à partir de suspensions de pili isolés de souches mâles et femelles. De tous les types de fractionnement, nous avons retenu le gradient de densité de saccharose, car celui-ci permet

d'obtenir les différentes fractions en un temps court, les F-pili se détériorant rapidement à la température ambiante. Pour cela, nous avons déposé 1 ml de la suspension de pili correspondant à 5×10^{10} bactéries à la surface de gradients de saccharose 10 p.100 - 40 p.100 de 29 ml.

Le tableau VI donne les résultats obtenus après lecture de quatre gradients faits à partir des pili isolés de la souche Hfr Thy et de la souche F⁻ 2000 x 17 k.

Fractions	Hfr Thy		Hfr Thy		F ⁻ 2000 X 17 k		F ⁻ 2000 X 17 k	
	260 nm	280 nm	260 nm	280 nm	260 nm	280 nm	260 nm	280 nm
1	0,105	0,062	0,100	0,058	0,142	0,120	0,120	0,096
2	0,145	0,085	0,130	0,074	0,127	0,105	0,125	0,096
3	0,200	0,120	0,172	0,107	0,147	0,125	0,150	0,122
4	0,260	0,150	0,295	0,164	0,127	0,107	0,130	0,110
5	0,360	0,220	0,405	0,242	0,090	0,072	0,098	0,075
6	0,580	0,315	0,730	0,360	0,098	0,074	0,115	0,081
7	0,880	0,470	0,940	0,500	0,122	0,093	0,130	0,098
8	1,240	0,665	1,250	0,670	0,080	0,058	0,080	0,058
9	1,440	0,760	1,380	0,740	0,057	0,046	0,074	0,056
10	2,350	1,210	2,500	1,280	0,055	0,055	0,050	0,060
11	1,580	0,735	1,300	0,680	0,027	0,030	0,045	0,044
12	1,000	0,580	1,540	0,900				
C.	0,170	0,135	0,127	0,107	0,265	0,252	0,290	0,270

TABLEAU VI

Densités optiques lues à 260 et 280 nm des fractions des gradients de saccharose obtenus à partir de suspensions de pili isolés de souches Hfr et F⁻

La ligne marquée C. représente les densités optiques des culots repris dans 2 ml de tampon Tris 10^{-2} M Mg Cl₂ 10^{-2} M pH 7,2

La fraction 1 correspond au fond du gradient, la fraction 12 à sa partie supérieure.

La figure 2 montre les profils de tels gradients pour leur lecture à 260 nm.

L'aspect des profils de ces gradients confirme que les particules en suspension sont très différentes. En effet, on observe un pic dans le gradient, fait à partir de la suspension des pili de la souche Hfr. Ce pic englobe les fractions 7, 8, 9, 10, 11 et 12 avec un maximum dans la fraction 10. Par contre, la suspension de pili isolés de la bactérie F⁻ ne contient aucun matériel absorbant les rayons ultraviolets. Il faut noter que les deux souches ont été cultivées dans les mêmes conditions d'anaérobiose de température et sans agitation et que l'extraction des pili a été faite parallèlement. La différence d'aspect des profils de gradients ne peut donc pas être imputée aux conditions de culture ou d'extraction des pili, mais doit vraisemblablement correspondre à la présence de pili particuliers provenant de la bactérie Hfr (fractions 7, 8, 9, 10, 11 et 12).

Nos résultats sont apparemment différents de ceux de WENDT et coll. (90) qui ont montré des profils de gradient de saccharose de F-pili présentant de nombreux pics. Ceci peut s'expliquer par la différence de technique utilisée ; en effet, WENDT et coll., cultivent *E. coli* β/r en agitation durant 8 heures et utilisent directement les pili présents dans le surnageant de la culture. Par ailleurs, les F-pili sont déposés à la surface d'un gradient de saccharose et soumis à une centrifugation de 9 heures.

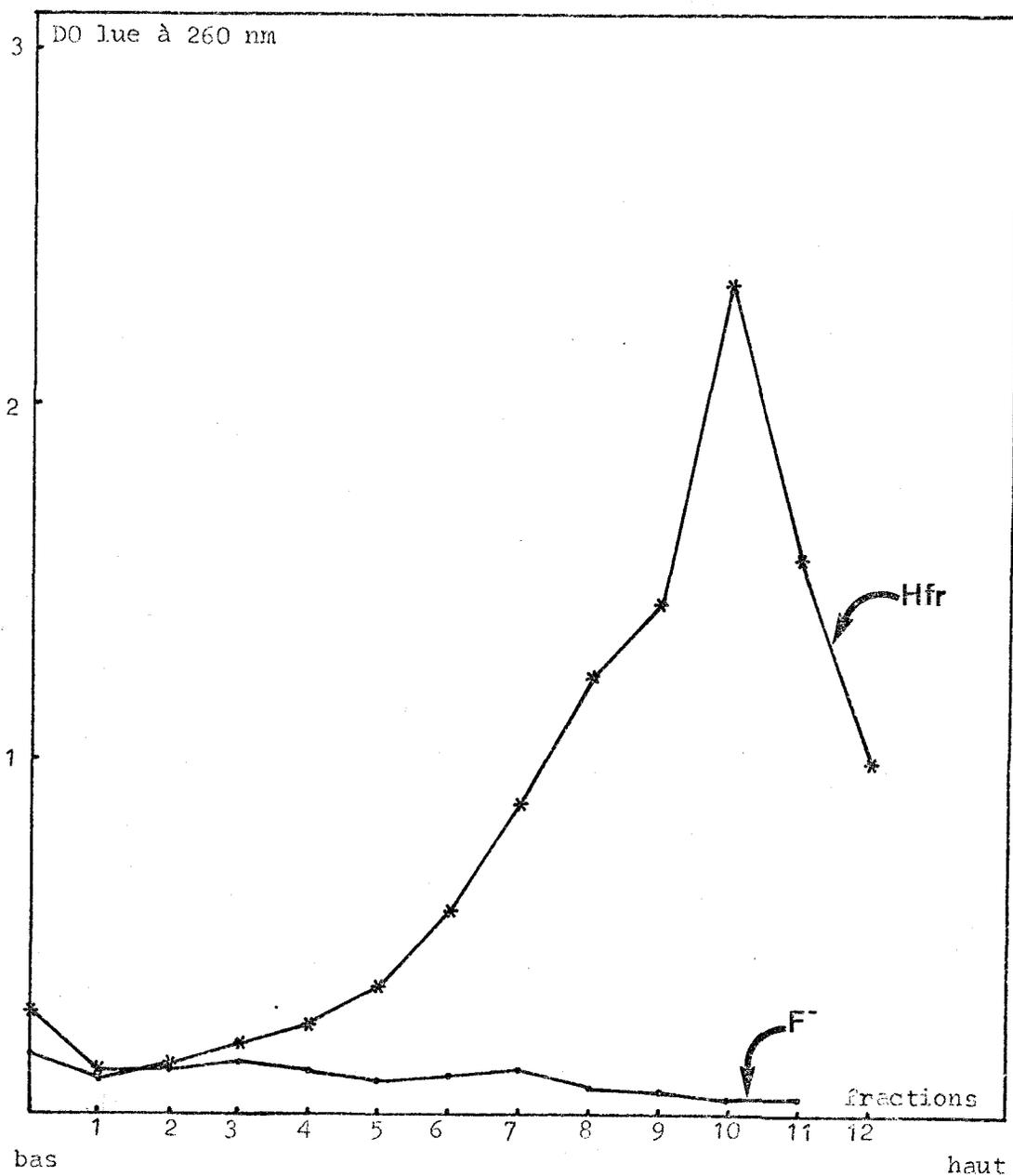


Figure 2

Aspects des profils des gradients de saccharose obtenus à partir des suspensions de pili isolés des souches Hfr Thy et F⁻ 2000 X 17 k.



Dans notre technique, les cellules sont cultivées en anaérobiose sans agitation, ce qui donne des F-pili de grande longueur, comme on peut le constater au microscope électronique. Après avoir été soumis aux chocs hydrodynamiques, les F-pili ont conservé une taille importante, leur aspect est homogène et cela explique l'obtention d'un seul pic.

Cependant, cette technique est encore imparfaite car, lorsque l'on observe les différentes fractions des gradients au microscope électronique, on trouve toujours des pili non sexuels et des flagelles au voisinage des F-pili.

Nous avons donc entrepris de purifier la suspension de pili isolés de bactéries mâles, dans le but de situer le plus exactement possible la zone du gradient qui contient une proportion importante de F-pili par rapport aux autres fimbriae.

B) Purification des pili

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit la technique d'obtention des pili et nos premiers essais de fractionnement. Il était nécessaire de mettre au point une technique plus élaborée, de façon à obtenir des F-pili débarrassés de la plupart des autres fimbriae.

Cela nous a amené à situer les F-pili dans les gradients d'une façon spécifique, c'est à dire par la propriété qu'a le phage f2 de s'adsorber sur les F-pili. Puis, en tenant compte du résultat, de

modifier les procédés d'ultracentrifugation.

Dans ce chapitre, nous verrons donc successivement :

- L'étude au microscope électronique de différentes fractions des gradients après addition de phages f2.
- La radioactivité des différentes fractions après adsorption sur les F-pili de phages f2 marqués au phosphore 32.
- Le comportement en gradient de saccharose d'une suspension de pili soumise à l'action du phage f2 avant de la placer sur le gradient par rapport à une suspension identique sans phage f2. Nous espérons de cette façon modifier spécifiquement le coefficient de sédimentation des F-pili.
- Enfin, nous étudierons la suspension de pili en gradient de chlorure de césium.

1) Modification de la technique d'extraction des pili

Le culot obtenu après la centrifugation de 1 h à 40.000 g doit être remis en suspension pour être déposé à la surface du gradient de saccharose. Son homogénéisation demande des pipettages violents qui sont susceptibles de détériorer les F-pili. Dans le but d'obtenir la suspension de pili d'une manière plus douce, nous avons remplacé la centrifugation de 1 h à 40.000 g par une centrifugation de 45 min à 74.000 g (rotor SW 25-1). Pour cela, nous avons déposé le surnageant

de la centrifugation à 7.000 g à la surface d'une solution de saccharose 70 p. 100 dans le tampon Tris 10^{-2} M Cl_2 Mg 10^{-2} M pH 7,2. Après centrifugation, la bande opaque située à la surface du coussin de saccharose est prélevée et dialysée pendant une nuit à +4°C. La solution est ensuite concentrée contre du polyéthylène glycol 6000.

2) Détermination de la position des F-pili dans les gradients de saccharose

a) Etude en microscopie électronique après addition de phages f2

α) En gradient 20 p.100 - 70 p.100

Le matériel à étudier est déposé à la surface de trois gradients formés à partir de solutions de saccharose 20 p.100 et 70 p.100. Les gradients sont soumis à une centrifugation de 1h 30 à 74.000 g, fractionnés, puis les densités optiques sont lues à 260 et 280 nm. Ces résultats sont réunis dans le tableau VII et sur la figure 3.

Fractions Longueur d'onde	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Culot
260	0,150	0,157	0,185	0,210	0,295	0,410	0,650	1,100	1,590	1,840	0,465	0,305	0,090
280	0,172	0,172	0,190	0,200	0,250	0,302	0,405	0,630	0,860	0,970	0,290	0,212	0,073
260	0,155	0,152	0,175	0,215	0,290	0,405	0,650	1,085	1,535	1,910	0,480	0,320	0,170
280	0,172	0,171	0,187	0,202	0,240	0,297	0,405	0,615	0,830	1,010	0,292	0,217	0,135
260	0,133	0,155	0,191	0,224	0,303	0,425	0,680	1,150	1,705	1,770	0,410	0,340	0,127
280	0,160	0,165	0,187	0,205	0,245	0,307	0,423	0,650	0,920	0,940	0,260	0,230	0,107

TABLEAU VII

Densités optiques des différentes fractions lues à 260 nm et 280 nm. Les valeurs portées dans la dernière colonne correspondent aux densités optiques du culot repris par 2 ml de tampon Tris 10^{-2} M Cl_2Mg 10^{-2} M pH 7,2

Sur la figure 3, nous avons représenté le profil de ces gradients



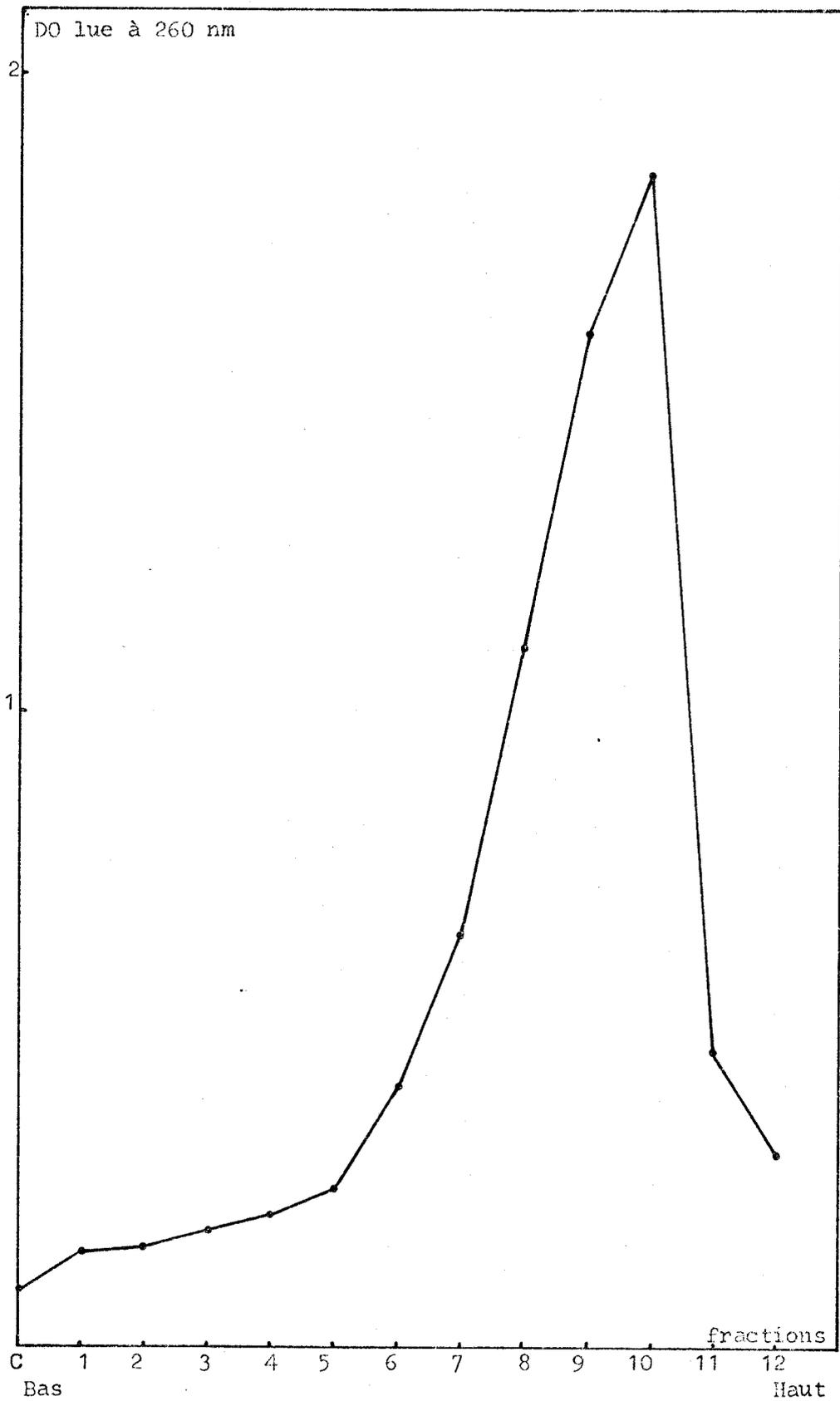


Figure 3

Etude d'une suspension de pili isolés d'une culture de cellules Hfr Thy en gradient de saccharose 20 p.100 - 70 p.100



Les profils de ces gradients montrent quatre zones bien distinctes formées des tubes 1 à 6, 7 à 10, 11 et 12 et du culot. Les tubes correspondant à chaque zone sont mélangés. La suspension est dialysée, concentrée, puis mise en contact avec des phages f2. Les préparations colorées, selon BRENNER, sont examinées au microscope électronique.

Sur la photo n° 21 qui correspond à la partie inférieure du gradient, nous avons observé quelques F-pili sur lesquels des phages f2 sont venus s'adsorber. A côté de ceux-ci, on retrouve des fragments de flagelles. La partie médiane (tubes 7 à 10) qui correspond au pic, contient des F-pili en quantité nettement plus importante (photo n° 23). La partie supérieure du gradient présente un aspect semblable à la zone inférieure (photo n° 22). Quant au culot, il contient également quelques F-pili, mais il est surtout constitué de débris bactériens et de longs flagelles.

Les F-pili se trouvent donc en quantité plus importante dans la zone médiane du gradient, zone correspondant au pic.

Dans le but d'étudier d'une manière plus précise la position des F-pili dans un gradient de saccharose, nous avons utilisé des gradients 10 p.100 - 50 p.100, afin d'élargir le pic. Ces concentrations en saccharose permettent d'obtenir dans le gradient 10 p.100 - 50 p.100, l'ensemble du pic observé dans le gradient 20 p.100 - 70 p.100.

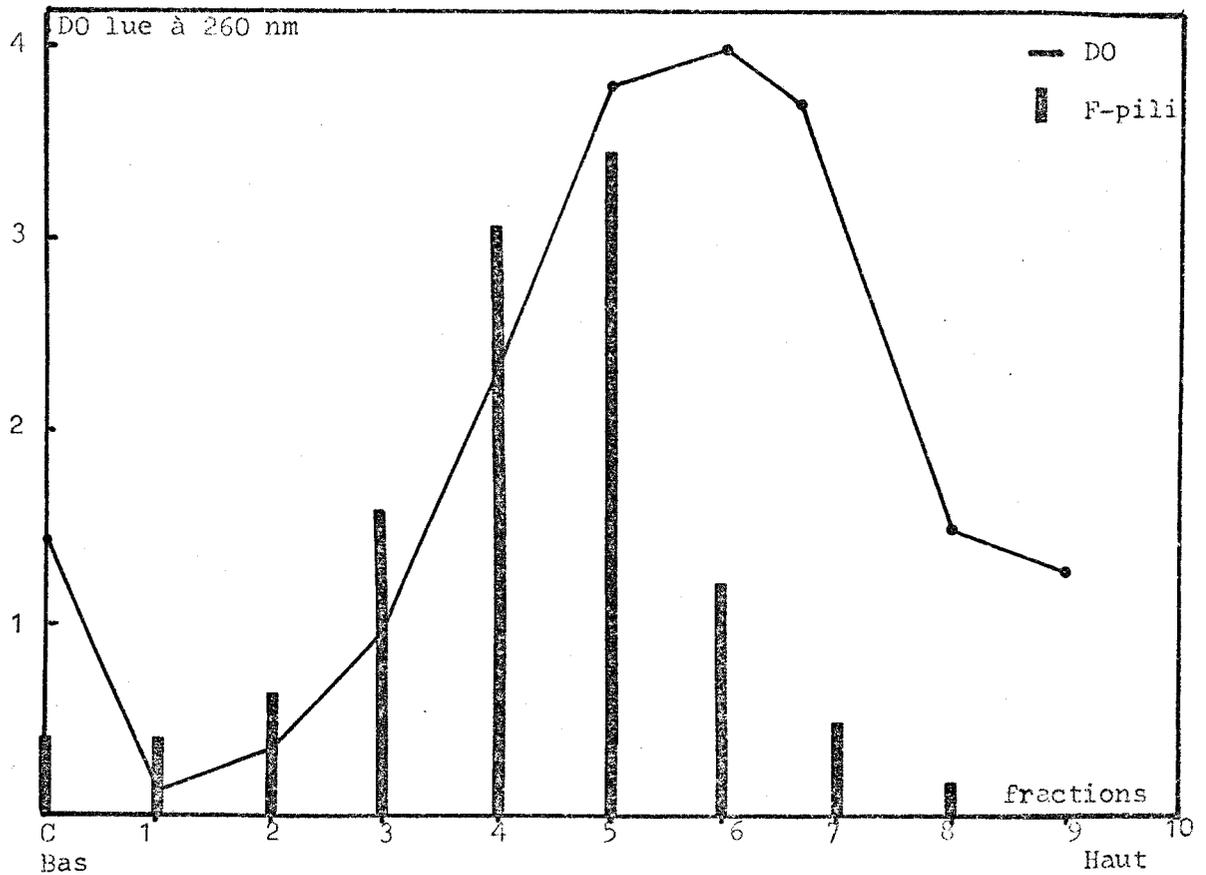


Figure 4

- Tube 1 : F-pili peu nombreux sous forme de petits fragments.
- Tube 2 : F-pili plus nombreux et plus longs.
- Tube 3 : F-pili nombreux. La majorité de ceux-ci sont très longs.
- Tube 4 : F-pili très nombreux également et très longs.
- Tube 5 : F-pili très nombreux et très longs.
- Tube 6 : F-pili de moins en moins nombreux.
- Tube 7 : Peu de F-pili (quelques uns sur une grille)
- Tube 8 : F-pili très peu nombreux très difficiles à trouver.
- Tube 9 : Plus aucun F-pilus.
- Tube 10 : plus aucun F-pilus.
- Culot : Présence de F-pili qui sont accrochés à des débris de bactéries.

β) En gradient 10 p.100 - 50 p.100

La suspension de pili isolés d'une souche Hfr Thy est placée sur un gradient 10 p.100 - 50 p.100. Après 3 heures de centrifugation à 74.000 g, les fractions sont recueillies et lues comme décrit précédemment.

Chaque fraction est examinée au microscope électronique après addition de phages f2 et coloration. Nous avons estimé le nombre des F-pili présents par numération des pili sur lesquels les phages étaient fixés. Nous avons obtenu les résultats portés sur la figure 4 page 79.

- Conclusion

L'observation directe des différentes fractions en présence de phages f2 nous a permis de situer la plus grande partie des F-pili dans les tubes 3, 4 et 5 du gradient de saccharose 10 p.100 - 50 p.100.

Malgré tout le soin que nous avons apporté à la numération des F-pili, le résultat que nous donnons ici ne peut pas être considéré comme un résultat quantitatif. En effet, les F-pili et les phages sont des particules très petites et nous devons travailler constamment à des grossissements importants, ce qui implique des causes d'erreurs.

Il est cependant certain qu'il y a un décalage entre le sommet de la courbe de la densité optique et celle de la courbe de numération des F-pili. En effet, les F-pili sédimentent dans les fractions se situant un ou deux tubes plus bas que celles présentant le maximum de densité optique.

Afin de posséder des données quantitatives sur la position des F-pili dans le gradient, nous avons utilisé une technique faisant intervenir du phage f2 marqué au phosphore 32.

b) Estimation de la position des F-pili dans un gradient de saccharose 10 p.100 - 50 p.100. Utilisation d'une suspension de phages f2 marqués au phosphore 32

La suspension de pili isolés de la souche Hfr Thy est placée à la surface d'un gradient de saccharose 10 p.100 - 50 p.100, puis centrifugée. Les différentes fractions sont prélevées et leur densité optique lue à 260 et 280 nm (Tableau VIII).

fractions longueur d'onde	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C
260	0,125	0,345	0,970	2,380	3,800	4,000	3,700	1,510	1,285	1,450
280	0,055	0,165	0,475	1,230	1,150	3,170	2,050	0,830	0,730	1,300

TABLEAU VIII

Densités optiques des différentes fractions. Gradient
10 p.100 - 50 p.100

Chaque fraction est alors mise en présence de phages f2 marqués au ^{32}P selon la technique suivante :

A 0,5 ml de chaque fraction, on ajoute une goutte de chlorure de calcium 0,5 M pendant 10 min en agitation à 37°C puis 0,1 ml de phages f2 marqués pendant 20 min à 37°C sans agitation. Le volume de chaque tube est porté à 4 ml avec du tampon Tris, puis centrifugé 1 heure à 18.000 tours/min. Le culot obtenu est lavé par 4 ml du même tampon, puis centrifugé dans les mêmes conditions. Le culot est repris par 0,2 ml de tampon. 0,1 ml de la suspension obtenue est déposé sur un filtre qui est séché aux rayons infra-rouges. Le filtre est porté dans un flacon contenant 10 ml de liquide scintillant, puis sa radio-activité est évaluée au compteur à scintillation liquide. Nous avons obtenu les résultats suivants (Tableau IX) :

Fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Culot
Radio-activité	65	85	250	370	430	190	65	75	35	80

TABLEAU IX

Radioactivité des différentes fractions, exprimée en coups par min pour 0,25 ml de fractions et pour 0,05 ml de phages f2 marqués.

Sur la figure 5 nous avons représenté les densités optiques des différentes fractions, ainsi que leur radioactivité due à l'adsorption des phages f2 marqués.

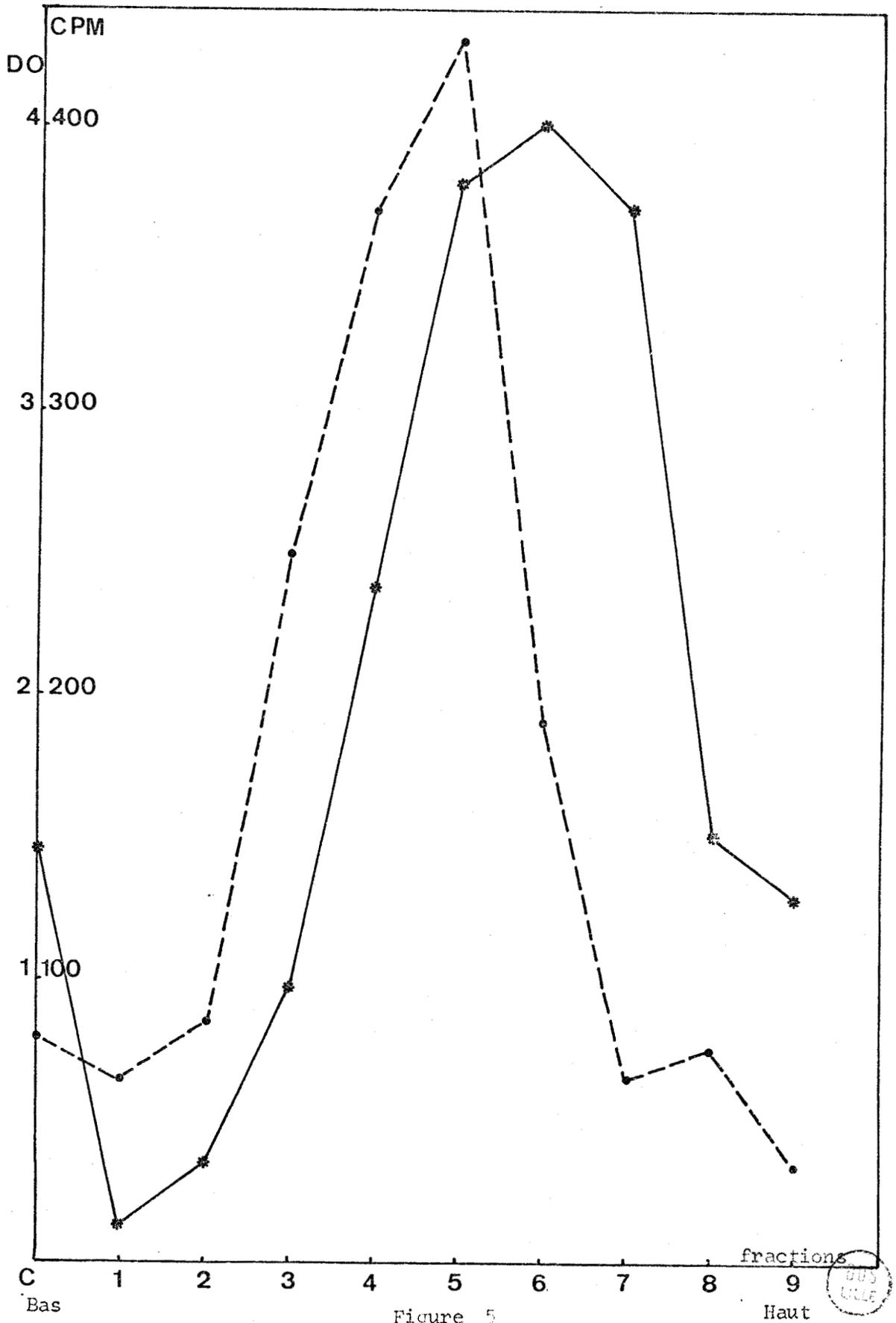


Figure 5

Courbes de la densité optique (DO) (*—*) des différentes fractions lue à 260 nm et de leur radioactivité (---) due à l'adsorption de phages f2 marqués.

La radioactivité est exprimée en coups par minute (CPM) pour 0,25 ml de chaque fraction additionné de 0,05 ml de phage f2 (voir technique d'adsorption du phage f2 marqué)

La technique utilisant une suspension de phages f2 marqués au ^{32}P nous a confirmé les résultats obtenus à l'observation directe au microscope électronique.

Ces résultats se sont révélés reproductibles. Dans nos conditions expérimentales, la suspension de pili est très riche en F-pili. Les F-pili sont situés dans les fractions 3,4 et 5 d'un gradient de densité de saccharose 10 p.100 - 50 p.100. Le pic absorbant fortement à 260 nm, n'est pas composé uniquement de F-pili, mais il contient également d'autres particules. Nous avons dès lors tenté de fractionner ce pic dans le but d'obtenir une suspension pure de F-pili.

3) Essais de différentes méthodes de fractionnement

Nous avons tout d'abord tenté de modifier spécifiquement la densité des F-pili par rapport aux autres pili. Pour cela, la suspension de pili est additionnée de phages f2 avant la centrifugation en gradient de saccharose.

Cette méthode ne donnant pas une séparation suffisante, nous avons ensuite essayé d'obtenir les F-pili en soumettant la suspension de pili à une centrifugation en chlorure de césium.

a) Etude de la suspension de pili additionnée de phages f2

La suspension de pili isolés d'une souche Hfr Thy est divisée en deux parties A et B de 3 ml chacune.

A la partie A, on ajoute une goutte de chlorure de calcium 0,5 M pendant 10 min à 37°C en agitation, puis 1 ml d'une suspension de phages f2 dans du milieu de Luria titrant $3,5 \times 10^9$ UFP/ml pendant 20 min à 37°C sans agitation.

La partie B est traitée de la même façon, mais le phage est remplacé par du tampon Tris 10^{-2} M Cl_2Mg 10^{-2} M pH 7,2.

Le troisième échantillon C est constitué de 3 ml du même tampon et de 1 ml de la suspension du même phage.

Ces solutions sont déposées à la surface de trois gradients formés à partir de solutions de saccharose 10 p.100 - 50 p.100 et soumises à une centrifugation de 3 heures à 74.000 g (rotor SW 25-1).

Les densités optiques des différentes fractions lues à 260 nm et 280 nm, sont portées dans le tableau X.

Nous observons sur la figure 6 que les trois profils sont différents. Dans l'ensemble, le pic correspondant à la préparation A (pili + phages f2) est plus aplati que celui correspondant à la préparation B (pili seuls).

Les F-pili présents dans la préparation A sont plus dispersés, en particulier le culot a une densité optique plus importante (de l'ordre de 1).

Fractions longueur d'onde	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Culot
Préparation A	260	0,350	0,710	1,000	1,210	0,970	0,625	2,320	3,450	0,900
	280	0,115	0,385	0,530	0,625	0,495	0,385	1,760	2,680	0,750
Préparation B	260	0,205	0,530	0,960	1,830	1,310	0,470	0,320	0,320	0,110
	280	0,080	0,132	0,315	0,525	0,680	0,265	0,205	0,310	0,100
Préparation C	260	0,072	0,070	0,080	0,070	0,165	0,520	2,700	3,550	0,280
	280	0,075	0,061	0,060	0,060	0,050	0,375	2,150	2,750	0,245

TABLEAU X

Densités optiques des différentes fractions de gradients de saccharose 10 p.100 - 50 p.100 sur lesquels ont été déposées les préparations A (pili + phages f2), B (pili seuls) et C (phages f2 seuls)

Sur la figure 6, nous avons représenté les profils de ces gradients



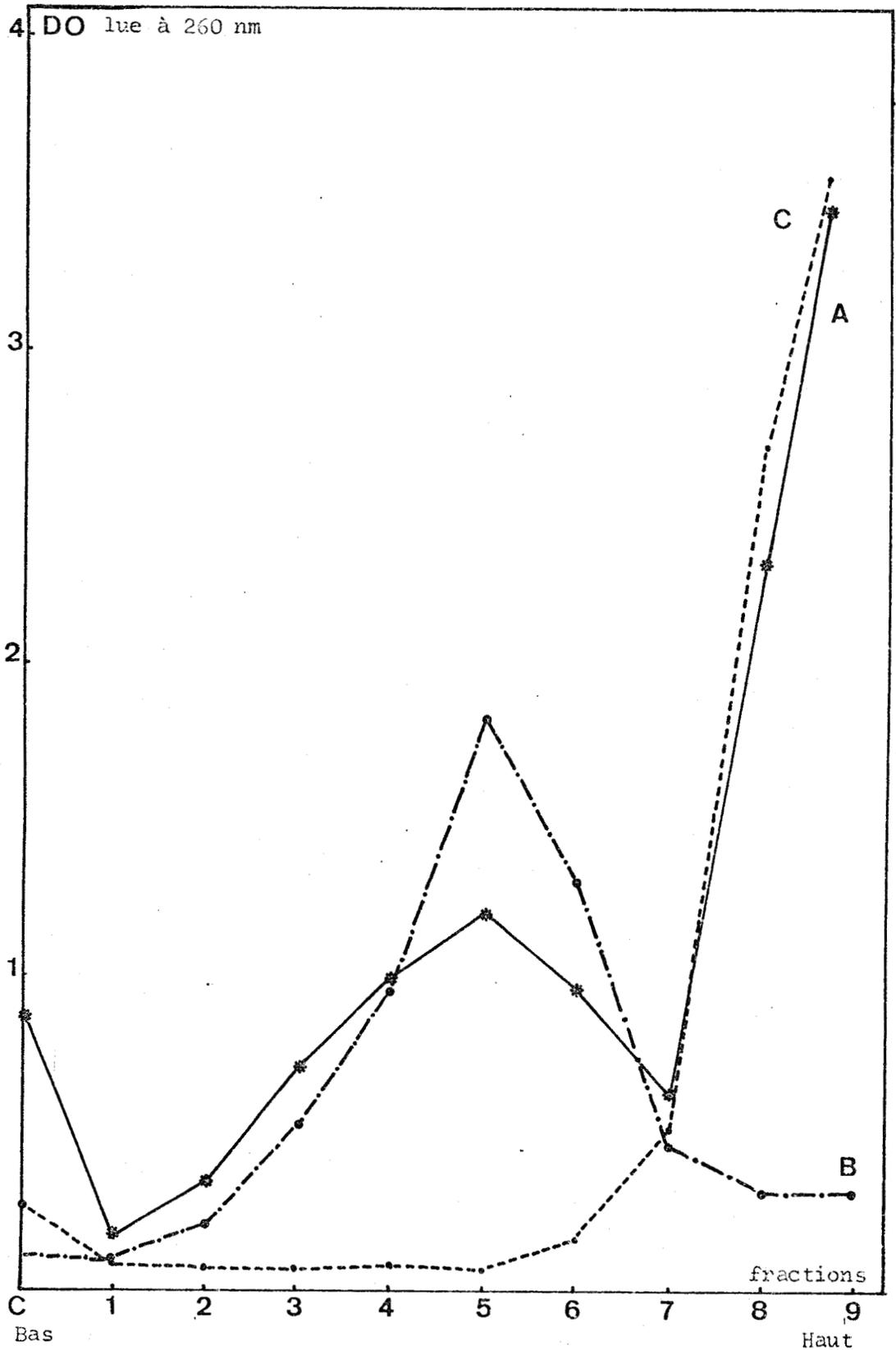


Figure 6

Densités optiques lues à 260 nm des différentes fractions des gradients faits à partir des préparations suivantes :

- A : suspension de pili additionnée de phages f2
- B : suspension de pili
- C : suspension de phages f2



L'augmentation de densité optique constatée dans les quatre premiers tubes du gradient de la préparation A et dans le culot, correspond vraisemblablement à une augmentation de la densité des F-pili due à la fixation du phage f2.

Si l'ensemble du pic de la préparation B était constitué entièrement de F-pili, le pic A devrait avoir exactement la même forme et devrait être décalé vers le fond du gradient. Or il n'en est rien, le pic reste situé dans le tube 5 pour les deux préparations. Cela suggère que la partie droite du pic contient autre chose que des F-pili, puisqu'il n'y a aucune réaction vis-à-vis du phage f2.

L'absorption importante des fractions correspondant au haut des gradients des préparations B et C, correspond à l'absorption due au milieu de Luria dans lequel se trouvent les phages f2.

L'addition de phages f2 avant la sédimentation en gradient de saccharose, permet de confirmer que le pic absorbant à 260 nm n'est pas formé exclusivement de F-pili. Nous retrouvons les résultats obtenus précédemment par examen direct en microscopie électronique et après addition de phages f2 marqués.

b) Essais de fractionnement sur gradient
de chlorure de césium

Dans un tube à centrifuger de 3 ml, on dissout 0,6 g de chlorure de césium dans 2 ml d'une suspension de pili isolés d'une culture de cellules Hfr Thy. Le volume est complété à 3 ml avec de l'huile de paraffine. Le tube est centrifugé à 100.000 g pendant 16 heures en utilisant le rotor SW 65.

Le gradient est ensuite fractionné par le fond du tube à raison de quatre gouttes par fraction en réalisant une pression contrôlée à la partie supérieure du gradient par injection d'huile de paraffine. Chaque fraction est diluée dans 2 ml de tampon.

Après adsorption du phage f2 marqué au phosphore ^{32}P , selon la technique décrite précédemment, la radioactivité ^{32}P de chaque fraction est mesurée au compteur à scintillation (Tableau XI).

Sur la figure 7 nous avons tracé la courbe de densité optique et celle de la radioactivité due à l'adsorption des phages f2 marqués.

Sur la courbe de densité optique, on constate que le matériel absorbant à 260 nm se trouve dans les fractions sédimentant le plus rapidement (fractions 1, 2 et 3), ainsi que dans la fraction 9. Ce profil montre que la technique de centrifugation est convenable. Par contre, si on examine la radioactivité des différentes fractions après adsorption du phage f2 ^{32}P on s'aperçoit que celle-ci se répartit de façon très inhomogène selon quatre pics.

Fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	C
Densité optique 260 nm	4,00	1,88	1,75	0,70	0,58	0,53	0,41	0,37	0,59	0,26	0,23	0,20	0,19	0,17	0,20	1,00
Radioactivité ³ H	50	50	30	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	30	0	400
Radioactivité ³² P	163	124	139	181	80	124	161	31	61	71	81	125	421	19	53	124

TABLEAU XI

Etude en gradient de chlorure de césium d'une suspension de pili isolés de la souche Hfr.

La radioactivité ³H est exprimée en CPM pour le total de la fraction.

La radioactivité ³²P est exprimée pour 0,25 ml de chaque fraction diluée à 2 ml et 0,5 ml de phages f2 marqués (voir technique d'adsorption du phage f2 marqué).

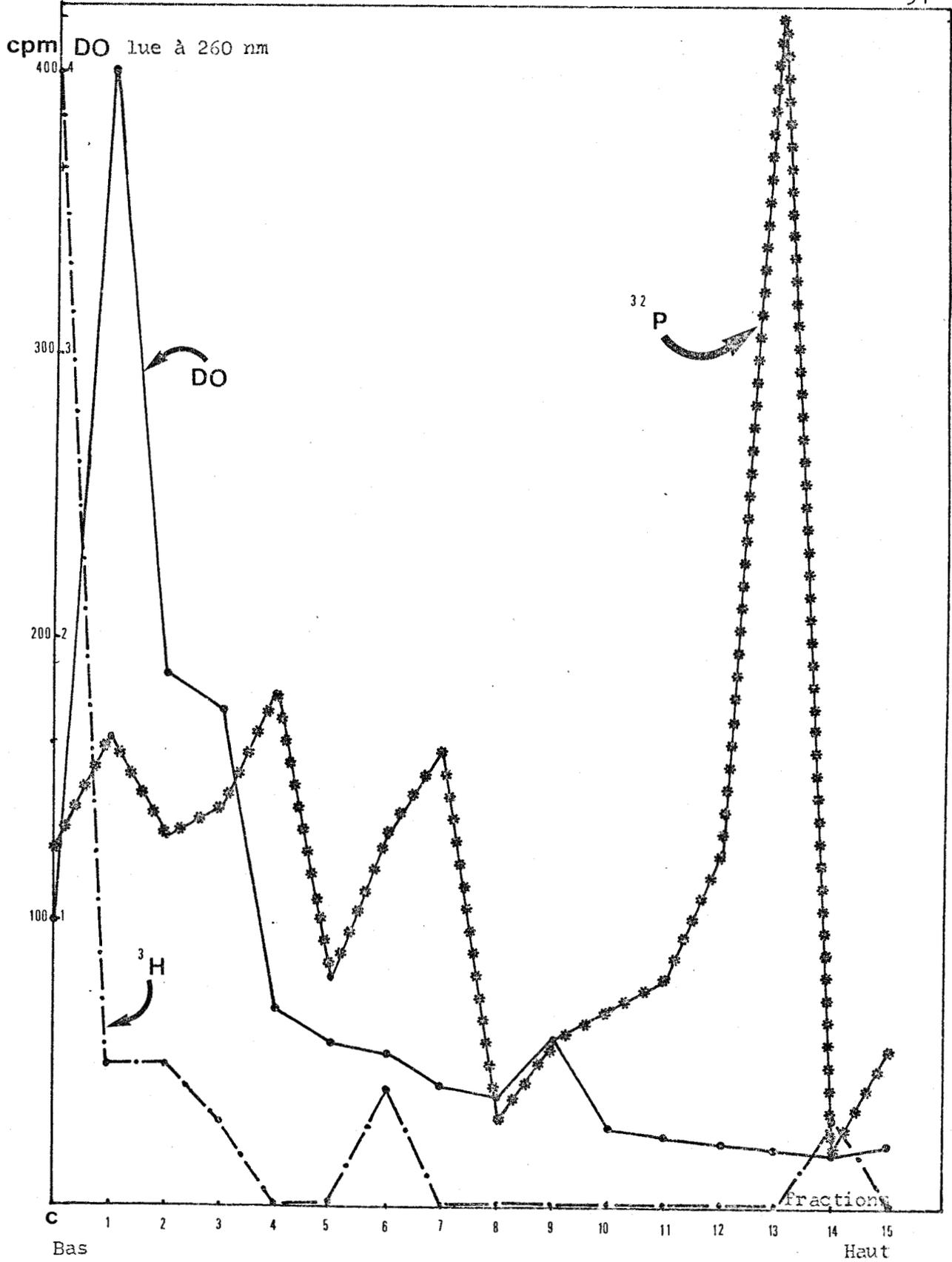


Figure 7

Etude des F-pili isolés d'une souche Hfr marquée à la thymine tritiée en gradient de chlorure de césium.

- (-.-.-.-) Radioactivité ³H de la fraction entière.
- (●-●-●-●) Densité optique des fractions, lue à 260 nm.
- (*-*-*-*) Radioactivité ³²P due à l'adsorption du phage f2 marqué correspondant à 0,25 ml de chaque fraction additionnée de 0,05 ml de phages f2.



Dans nos conditions expérimentales, ce profil de radioactivité est variable d'une expérience à l'autre. Nous pouvons interpréter ce phénomène de deux manières :

- Ou bien les F-pili sont fractionnés au cours de la sédimentation en chlorure de césium ; cela n'explique cependant pas pourquoi ils se répartissent en plusieurs pics,

- Ou bien le séjour dans le chlorure de césium a modifié leurs propriétés d'adsorption par le phage.

Cette technique telle que nous l'avons décrite s'est donc révélée inutilisable pour la séparation des F-pili.

- Discussion

Les procédés de séparation des F-pili que nous avons employés ne nous ont pas permis de séparer parfaitement les F-pili des autres fimbriae, en particulier les F-pili présents dans le tube 6. La question que l'on peut se poser est de savoir à quoi correspond le matériel contenu dans cette fraction qui n'adsorbe pas les phages f2.

Dans nos premiers essais, lorsque nous avons comparé les profils des gradients de saccharose 20 p.100 - 70 p.100 effectués avec les pili isolés à partir de bactéries Hfr avec ceux de bactéries F⁻ (figure 2), nous avons trouvé un pic important chez le mâle, au niveau des fractions 9, 10 et 11 et aucun pic chez la femelle. Nous en avons conclu que le pic correspondait vraisemblablement aux F-pili.

Par la suite, nous avons étudié les suspensions de F-pili en gradient de saccharose 10 p.100 - 50 p.100 et montré que la partie de ce pic sédimentant le moins rapidement, n'adsorbe pas les phages f2 (figure 5), le maximum d'adsorption se situant nettement en dessous du maximum de la densité optique lue à 260 nm.

Au cours d'expériences ultérieures (fig. 13 p. 111) nous avons observé un pic faible au niveau du tube 6 dans les gradients obtenus à partir de suspensions de pili isolés de culture de bactéries femelles.

Nous avons tenté d'expliquer quelle était la nature des particules sédimentant à ce niveau.

Nous avons observé au microscope électronique que les tubes 6 et 7 des gradients de saccharose, faits à partir de suspension de pili isolés de la souche Hfr, contiennent en plus de quelques F-pili, des amas de débris résultant vraisemblablement d'un décapage superficiel de la surface des bactéries dû au "Virtiss".

Alors que ce phénomène semble s'être produit au cours de chaque extraction de pili chez la souche mâle, pour des raisons que nous ignorons, il semble ne pas se produire à chaque fois chez la F⁻.

III - ETUDE DU ROLE DES F-PILI AU COURS DE LA CONJUGAISON

Les différentes techniques exposées au chapitre I ont montré qu'au cours d'un croisement, il existait de nombreux accolements de cellules. Cependant, il n'est pas possible de démontrer qu'il s'agit réellement de cellules de sexe opposé en cours de transfert génétique. Nous nous sommes donc attaché à rechercher si ces contacts n'étaient pas des artefacts et si la conjugaison se faisait à distance par l'intermédiaire des F-pili.

Notre étude a été menée de la façon suivante :

- Nous avons d'abord examiné des mélanges de cellules mâles et femelles en cours de croisement, de façon à observer les pili inter-cellulaires.

- Puis, nous avons tenté d'évaluer le nombre de couples réunis par ces pili et constaté que ce nombre n'avait aucune commune mesure avec le nombre de cellules entrant en conjugaison, tel qu'on peut le mesurer par numération des recombinants. Ceci nous a conduit à penser que les pili disparaissaient en cours de conjugaison. Nous avons donc tenté de déterminer les caractéristiques de ces pili en fonction du temps de contact entre des cellules mâles et femelles.

A) Etude du rôle des F-pili durant le croisement

Deux hypothèses ont été émises au sujet du rôle des F-pili au cours de la conjugaison.

La première est en faveur d'un transfert de DNA vers la bactérie femelle par l'intermédiaire du F-pilus de la bactérie mâle.

Les partisans de la seconde hypothèse pensent que le croisement débiterait par la reconnaissance de la cellule femelle par la cellule mâle grâce au F-pilus. Les deux cellules se rapprocheraient ensuite par rétraction du F-pilus dans la bactérie mâle. Un contact intime s'établirait alors et le DNA du mâle pourrait être transféré.

1) Examen direct d'un croisement

Lorsque l'on observe après ombrage un croisement entre des cellules Hfr cultivées en milieu anaérobie sans agitation et des cellules F⁻ cultivées en aérobiose avec agitation (photo n°26), on constate que parfois deux cellules paraissent reliées par un F-pilus, dont on peut démontrer la nature par sa propriété d'adsorber des phages f2. On distingue parfaitement les cellules mâles des cellules femelles. En effet, les cellules Hfr obtenues en anaérobiose sans agitation possèdent, outre de long F-pili, de nombreux pili non sexuels (photo n° 24). Par contre, les cellules F⁻ cultivées en milieu agité, sont dépourvues de fimbriae (photo n° 25).

Sur les photos n° 26, 27 et 28, il n'est cependant pas certain que les cellules Hfr et F⁻ soient réellement en contact par l'intermédiaire du F-pilus, car la cellule F⁻ a pu se placer par hasard sur l'extrémité d'un F-pilus.

En observant ces croisements, nous avons tenté d'évaluer le nombre de couples reliés par des F-pili par rapport au nombre de recombinants. Malgré des taux de recombinants de l'ordre de 60 p. 100, nous nous sommes aperçu que le nombre de couples reliés par les F-pili était très faible. Cette constatation serait alors en faveur de la deuxième hypothèse. En effet, on peut penser que les images observées correspondent au tout début de la conjugaison et qu'ensuite, le F-pilus disparaît au fur et à mesure que les deux cellules se rapprochent l'une de l'autre. Dans ce cas, les F-pili ne joueraient qu'un rôle épisodique au cours de la conjugaison.

Cependant, nous avons étudié l'aspect des F-pili sur coupes, afin de voir si leur structure était compatible avec le transport du DNA.

2) Examen des F-pili en microscopie électronique sur coupes

Un culot de F-pili est fixé, inclus et coupé. Les coupes sont déposées sur grille, colorées et observées en microscopie électronique. Les photos n° 29 et 30 montrent leur aspect.

Les F-pili se présentent sous la forme de cylindres creux de dimensions semblables à celles déterminées par BRINTON (8). Leur diamètre est compris entre 80 Å et 100 Å. Il semble donc possible qu'ils servent au passage du DNA de la cellule mâle vers la cellule femelle. Cette constatation est alors en faveur de la première hypothèse.

Si l'on admet que le F-pilus peut servir au passage du DNA de la cellule mâle vers la cellule femelle, au cours d'un croisement, il doit être possible de le caractériser en le marquant par exemple à la thymine tritiée.

3) Recherche du DNA dans les F-pili

Marquage à la thymine tritiée

Nous avons envisagé trois cas :

- Si, lors de la conjugaison, le DNA bactérien passe par le F-pilus, chez une souche mâle prête à conjuguer, il se peut que l'acide nucléique se trouve engagé dans le F-pilus. Il doit donc être possible, en marquant le DNA et en isolant les F-pili, de déceler une radioactivité à leur niveau.

- Ou bien, et c'est le second cas, le DNA ne s'engage dans le F-pilus qu'au moment du contact avec la cellule femelle. En extrayant alors les F-pili à partir d'un croisement entre des cellules mâles marquées et des cellules femelles non marquées, nous devrions également

décélérer un marquage.

- Enfin, on peut supposer que le F-pilus de la bactérie mâle après être entré en contact avec la cellule femelle se rétracte et permet un accollement intime des deux cellules, contact facilitant le passage du DNA. Dans ce cas, les F-pili disparaîtraient au cours du croisement et on ne pourrait pas décélérer de marquage.

a) Etude de la radioactivité des F-pili isolés de cellules Hfr cultivées en présence de thymine tritiée

Les bactéries sont cultivées selon la technique habituelle en présence de 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ de thymine tritiée (Act. Spéc. 20 Ci/mM CEA FRANCE). La suspension obtenue est étudiée en gradient de saccharose et en gradient de chlorure de césium.

Les différentes fractions sont soumises à l'action du phage f2 marqué. Le marquage au ^{32}P et ^3H est apprécié au compteur à scintillation (tableaux XI et XII).

Fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C
Radioactivité ^3H	0	10	10	0	0	0	0	0	0	20
Radioactivité ^{32}P	2	77	116	149	167	93	78	46	46	85

TABLEAU XII

Etude en gradient de saccharose 10 p.100 - 50 p.100 d'une suspension de pili isolés d'une souche Hfr marquée à la thymine tritiée. La radioactivité ^3H est exprimée en CPM pour la fraction entière. La radioactivité ^{32}P est exprimée pour 0,25 ml de chaque fraction et 0,05 ml de phages f2 marqués.

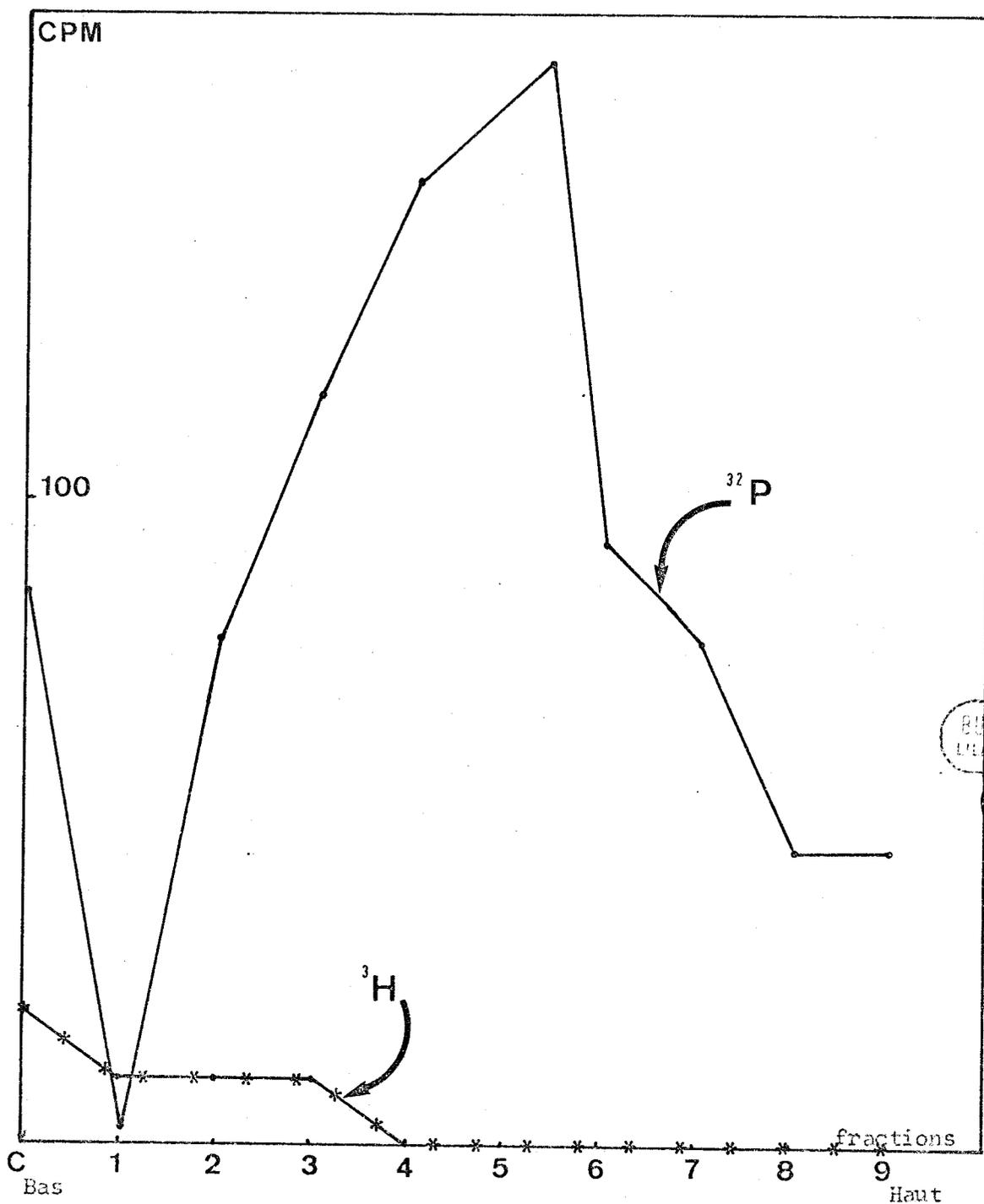


Figure 8

Etude en gradient de saccharose 10 p.100 - 50 p.100 d'une suspension de pili isolés d'une souche Hfr marquée à la thymine tritiée.

- (————) Radioactivité due aux phages f2 marqués fixés sur les F-pili.
- (*-*-*) Radioactivité due à l'incorporation de la thymine tritiée dans les F-pili.

Les figures 7 (p.91) et 8 (p.99) montrent les résultats obtenus en gradient de chlorure de césium et de saccharose 10 p.100 - 50 p.100.

Nous n'avons trouvé aucun marquage dans les deux cas, excepté dans le culot du gradient de chlorure de césium. Nous pouvons donc dire que dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas décelé de DNA dans les pili extraits d'une culture de bactéries Hfr cultivées en présence de thymine tritiée.

Cependant, à la vue de ces résultats, on pouvait se demander si nous n'étions pas en dehors des limites de sensibilité de la méthode, c'est à dire si la radioactivité de la chaîne de DNA intégrée dans les F-pili était suffisante pour être détectée.

Pour le savoir, nous avons cherché par le calcul la radioactivité qui, théoriquement, serait fixée aux F-pili, si dans ceux-ci se trouvait le DNA. Considérant que le DNA bactérien a une longueur d'environ 1000 μ et qu'un F-pilus fait 10 μ au minimum, si toute la longueur du pilus est occupée par du DNA, on doit y trouver 1/100 du marquage du DNA total.

Dans les expériences représentées sur les figures 7, 8, 9 et 10, la radioactivité ^3H de la totalité des bactéries de la préparation après incorporation de thymine tritiée et de 8.330.000 CPM. Si l'on considère que 1/100 du DNA peut être engagé dans les F-pili, ceux-ci possèdent une radioactivité de 83.000 CPM. Après extraction des pili, la préparation est divisée en 6 pour être placée sur les différents gradients ; chaque gradient contiendrait donc 13.800 CPM que l'on doit retrouver au niveau du pic.

Or, en aucun cas dans les expériences précitées ou dans celles qui vont être décrites, il n'a été possible de déceler au niveau d'une fraction, une radioactivité de plus de 400 CPM. Même en tenant compte des pertes de pili au cours de leur préparation, puis du fractionnement, celles-ci ne pourraient expliquer une telle différence. C'est pourquoi nous avons répété l'expérience en extrayant les pili de bactéries en cours de conjugaison.

b) Etude de la radioactivité des F-pili isolés d'un croisement entre des cellules Hfr marquées et des cellules F - non marquées

Nous avons choisi des temps de contact de 5 et 15 min

α) Techniques de marquage et de croisement employées

Les cellules Hfr Thy ont été marquées avant et pendant le croisement lui-même. Les cellules Hfr Thy sont cultivées selon la technique habituelle jusqu'à obtenir une densité optique égale à 1, en présence de 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ de thymine tritiée (Act. Spéc. 20 Ci/mM CEA FRANCE). Les croisements sont effectués dans les conditions suivantes :

A 250 ml de ces cellules marquées, on ajoute 750 ml d'une culture de cellules F⁻ de même densité optique en présence de 0,05 $\mu\text{Ci/ml}$ de thymine tritiée. Après 5 min et 15 min de contact, les pili sont extraits des cultures et placés sur un gradient de saccharose 10 p.100 - 50 p.100.

β) Les résultats obtenus sont portés dans le tableau XIII
(radioactivité ^3H)

	Fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Culot
Croisement 5 min	Radioactivité ^3H	45	15	30	40	35	25	25	25	30	20
	Radioactivité ^{32}P	120	38	102	392	170	108	0	64	64	36
Croisement 15 min	Radioactivité ^3H	55	15	25	35	30	40	65	15	45	10
	Radioactivité ^{32}P	102	78	51	22	240	202	189	81	300	17

TABLEAU XIII

Radioactivité due à l'incorporation de thymine tritiée (radioactivité ^3H) et à l'adsorption des phages f2
marqués sur les F-pili (radioactivité ^{32}P) isolés à partir de
croisements de 5 min et 15 min.

(même légende que le tableau XII)



Sur les figures 9 et 10 (p.104), nous avons tracé les courbes de la radioactivité due à l'adsorption du phage f2 marqué et à l'incorporation de la thymine tritiée dans les F-pili au cours de croisements ayant duré 5 min et 15 min.

Comme dans l'expérience précédente, la radioactivité due à l'incorporation de thymine tritiée est très faible. Ce résultat mérite d'être discuté, car il nous semble que trois explications sont possibles.

- On peut penser que lors d'un croisement, le DNA passe par le F-pilus de la bactérie mâle, mais qu'au cours de l'extraction des pili, il se dissout dans le milieu,

- ou bien, lors d'un croisement, le DNA ne passe pas par le F-pilus de la bactérie mâle et celui-ci ne sert que d'organe de reconnaissance,

- ou encore le F-pilus sert d'organe de reconnaissance entre la bactérie mâle et femelle, puis au transfert du DNA seulement lorsqu'il est rétracté et que les cellules sont accolées.

Nos techniques expérimentales ne permettent pas d'éliminer la première hypothèse. Par contre, il est possible de vérifier les deux dernières.

En effet, en isolant les F-pili à partir de cellules Hfr et F⁻ en cours de croisement, s'ils ne jouent aucun rôle, nous devons les retrouver intacts après le croisement. Mais, par contre, si en se rétractant dans la cellule ils participent à la formation d'un pont entre la cellule mâle et la cellule femelle, ils doivent alors disparaître au cours du croisement.

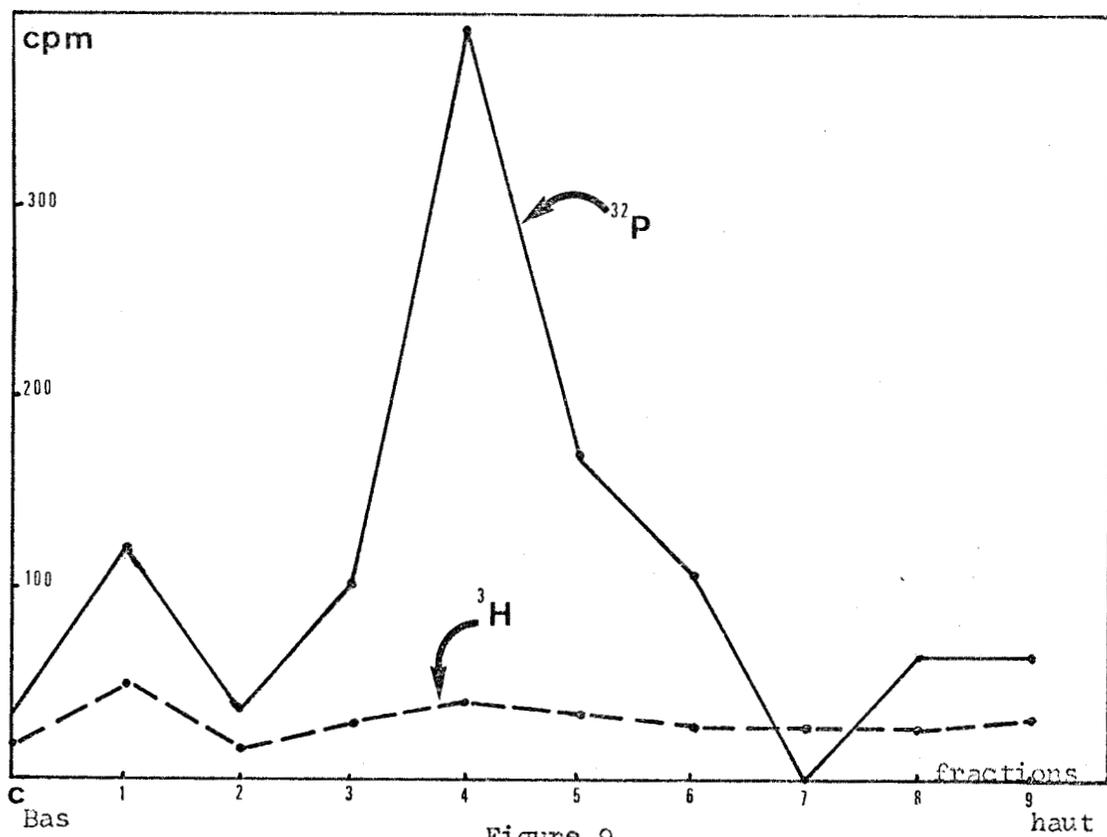


Figure 9

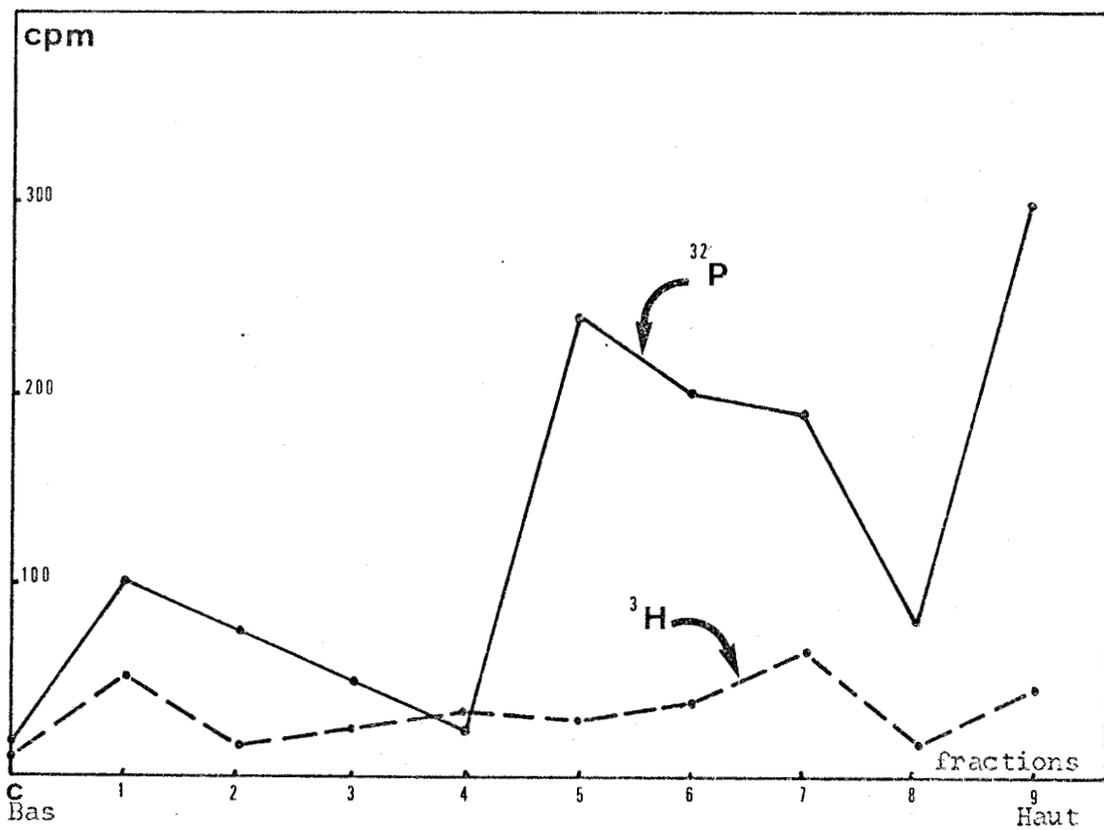


Figure 10

Etude en gradient de saccharose 10 p.100 - 50 p.100 de suspensions de pili isolés à partir d'un croisement de 5 min (figure 9) et de 15 min (figure 10)

- (—————) Radioactivité due à l'adsorption du phage f2 marqué sur les F-pili.
- (- - - - -) Radioactivité due à l'incorporation de thymine tritiée au niveau des F-pili.

4) Devenir des F-pili au cours d'un croisement

Nous avons étudié la densité optique des différentes fractions de gradients de saccharose 10 p.100 - 50 p.100, ainsi que l'adsorption du phage f2 marqué sur les F-pili isolés à partir de bactéries en cours de croisement depuis 5, 10 et 15 min. Les témoins sont constitués par les pili isolés de cultures de bactéries Hfr et F⁻.

a) Etude de la radioactivité due à l'adsorption des phages f2 marqués sur les pili isolés à partir de bactéries en cours de conjugaison

Les résultats obtenus sont réunis dans les tableaux XIII

(page 102) et XIV :

Fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C
Radioactivité ³² P	20	2	12	20	8	30	36	28	12	10

TABLEAU XIV

Gradient de saccharose 10 p.100 - 50 p.100. Etude de la radioactivité due à l'adsorption de phages f2 marqués sur les pili isolés d'une culture de cellules femelles (même légende que le Tableau XII)

Sur les figures 11 et 12, nous avons porté la radioactivité due aux phages adsorbés sur les différentes fractions de gradients de saccharose 10 p.100 - 50 p.100 sur lesquels ont été déposées des préparations de pili.

La figure 11 concerne les pili isolés de cellules F⁻ et de croisements de 5 min et 15 min ; la figure 12 concerne les pili isolés de cellules Hfr et d'un croisement de 10 min. Il s'agit de deux expériences successives ; en effet, il n'est pas possible, pour des raisons de matériel, de durée de centrifugation et de quantité de bactéries à manipuler, d'étudier à la fois plus de trois préparations.

L'adsorption des phages sur les fractions provenant des gradients effectués à partir de préparations de pili de cellules F⁻ est faible, et correspond au bruit de fond de l'expérience (tableau XIV et figure 11).

Les résultats portés dans le tableau XV qui correspondent à la figure 12, montrent que les pili de la souche Hfr se situent au niveau des tubes 3 et 4. Il faut noter que dans cette expérience, le pic est plus étalé qu'habituellement.

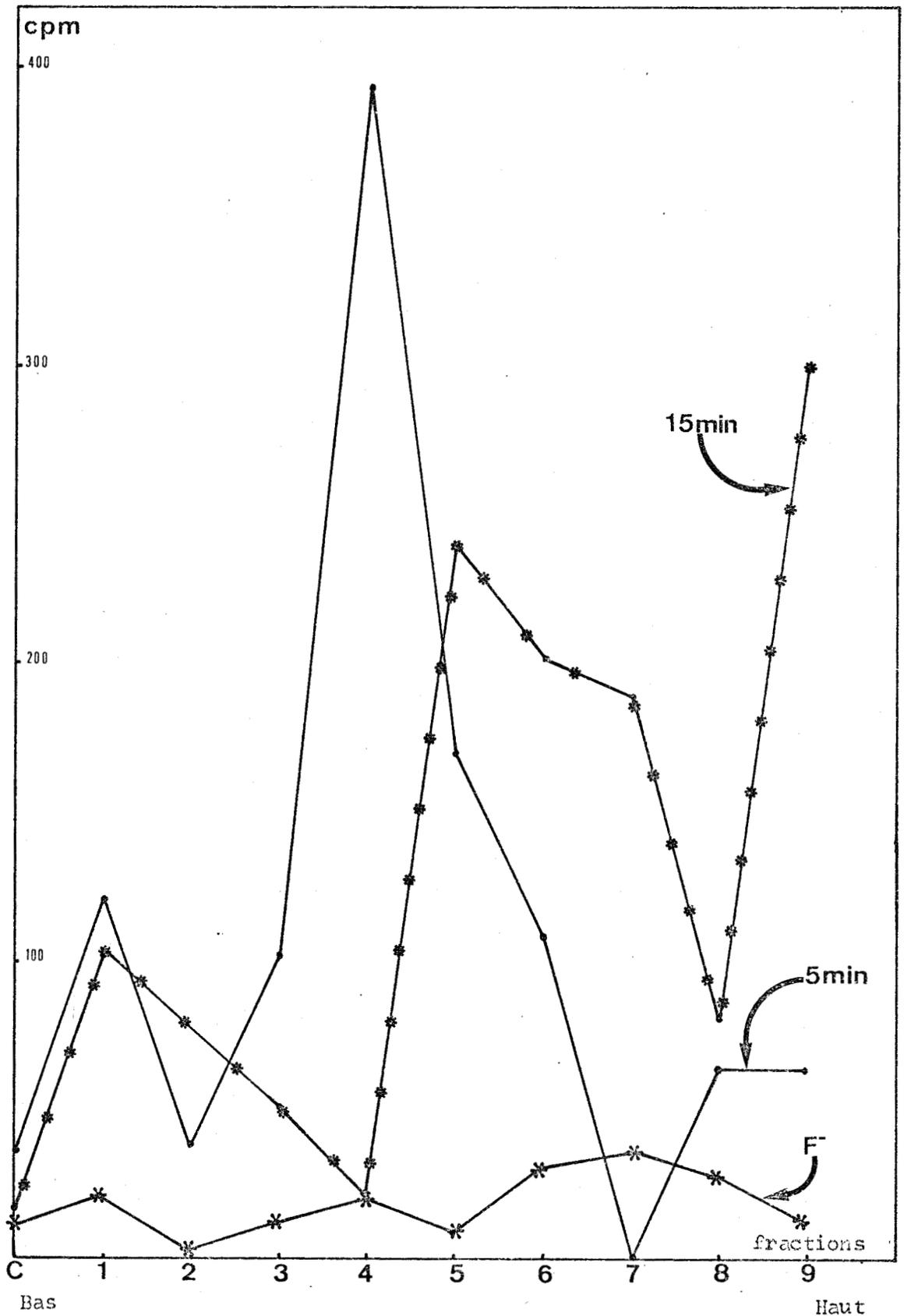


Figure 11

Courbes montrant la fixation du phage f2 marqué au phosphore 32 sur des suspensions de pili isolés d'une culture de cellules F⁻ (*—*), à partir d'un croisement de 5 min (—) et d'un croisement de 15 min (*—*) sur gradient de saccharose 10 p. 100 - 50 p. 100.

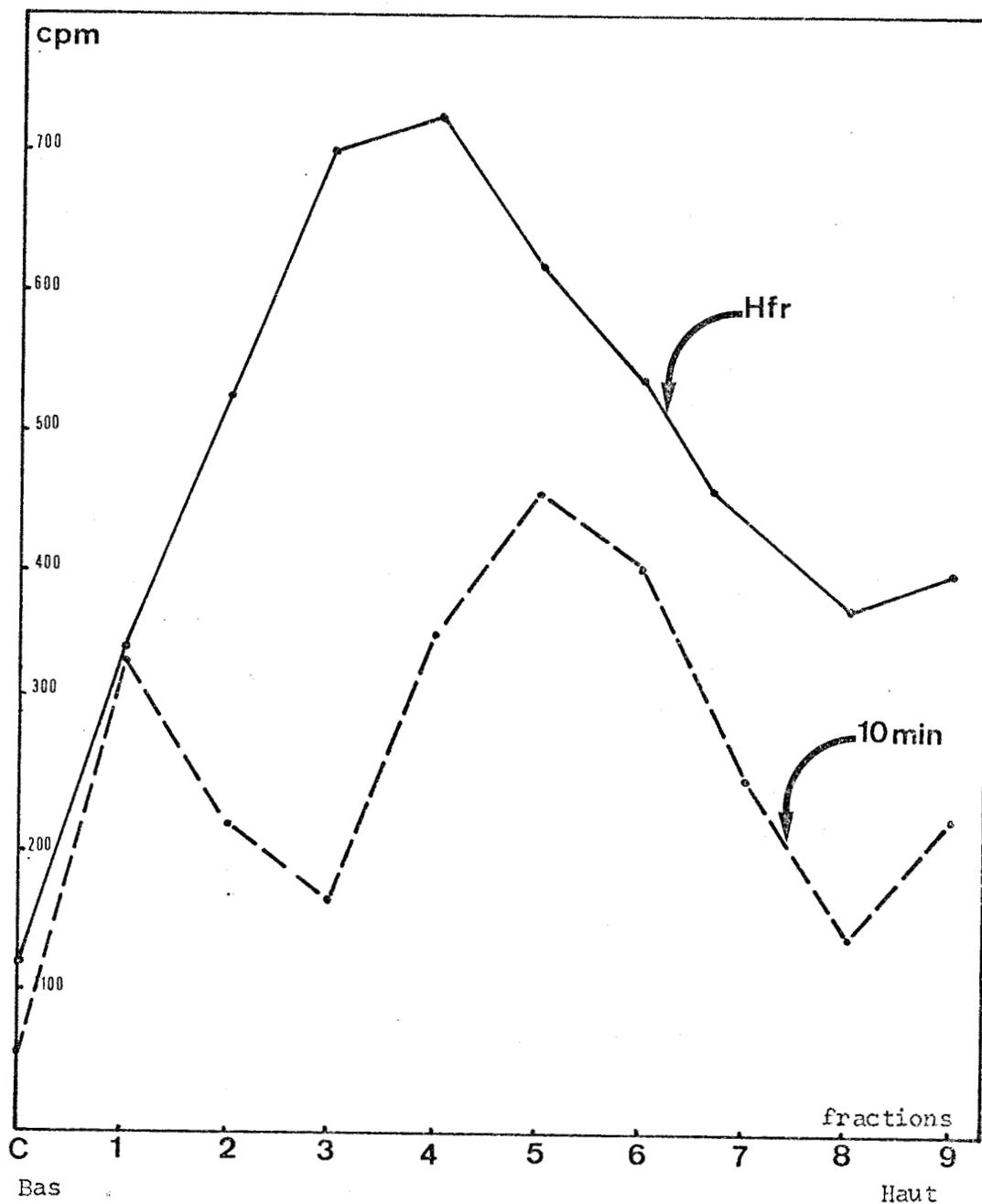


Figure 12

Etude en gradient de saccharose 10 p.100 - 50 p.100 de l'adsorption du phage f2 marqué au phosphore 32 sur les F-pili isolés d'une culture de cellules Hfr (———) et d'un croisement de 10 min (- - - -)

	Fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	CuLot
Radioactivité ³² P	Hfr	345	525	700	725	618	540	460	375	400	120
	Croisement de 10 min	335	218	167	356	453	405	252	141	225	55

TABLEAU XV

Gradient de saccharose 10 p.100 - 50 p.100. Radioactivité due à l'adsorption du phage f2
marqué sur les pili isolés d'une culture de cellules Hfr et d'un croisement
de 10 min.

(Même légende que le tableau XII)



Si on examine les pics des F-pili isolés après les différents temps de croisement, on constate que :

1) Le pic principal (tubes 3 et 4 chez l'Hfr) se déplace vers le haut du gradient en fonction du temps de croisement. Le maximum d'adsorption du phage f2 se situe dans le tube 4 après 5 min de croisement (figure 11), dans les tubes 4, 5 et 6 après 10 min (figure 12) et dans les tubes 5,6 et 7 après 15 min (figure 11).

2) L'amplitude de ce pic diminue durant le croisement, mais il s'étale indiquant par là une inhomogénéité de la taille des F-pili.

3) Un deuxième pic apparait constamment dans la partie inférieure du gradient (tube 1), alors qu'il n'y a pratiquement aucune adsorption du phage sur les particules sédimentant dans le culot.

Ceci se trouve confirmer par l'examen de la courbe de la figure 13, donnant les densités optiques à 260 nm des fractions de gradient de pili isolés de croisements de 5 min et 15 min (Tableau XVI).

Ici encore, on observe que l'épaule au niveau du pic du tube 4, qui correspond habituellement au pic de F-pili dans ce système de sédimentation, décroît considérablement lorsque l'on passe d'un croisement de 5 min à un croisement de 15 min.

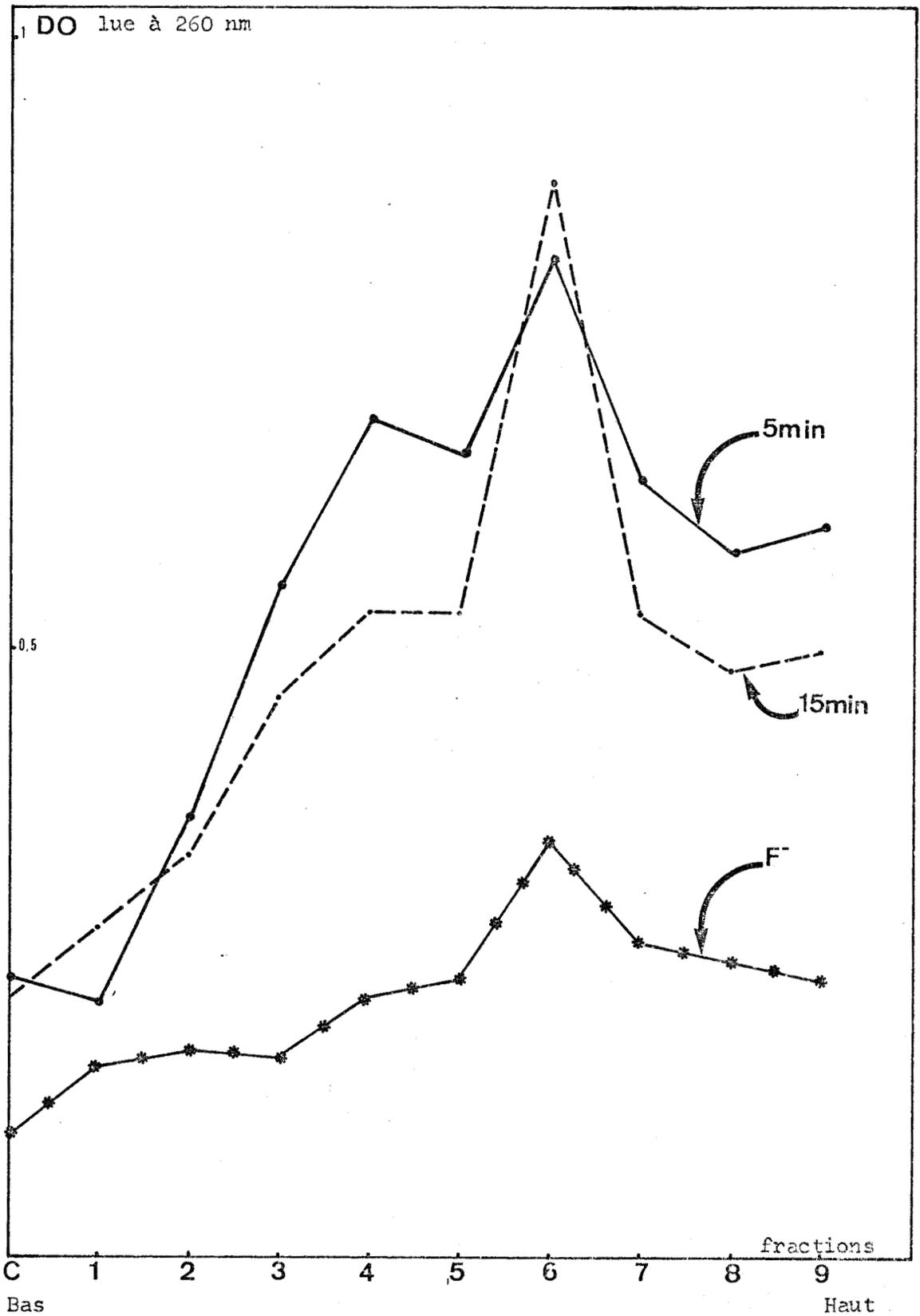


Figure 13

Densité optique lue à 260 nm des fractions de gradients de saccharose 10 p.100 - 50 p.100 sur lesquels ont été déposées des suspensions de pili isolés d'une culture de cellules F⁻ (*—*), d'un croisement de 5 min (—) et d'un croisement de 15 min (- - -)

	Fractions		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Culot
	longueurs d'onde											
Pili F ⁻	260		0,155	0,170	0,165	0,215	0,230	0,345	0,260	0,245	0,230	0,096
	280		0,098	0,110	0,100	0,130	0,145	0,190	0,155	0,185	0,180	0,088
Pili 5 min	260		0,210	0,360	0,550	0,690	0,660	0,820	0,640	0,580	0,600	0,230
	280		0,130	0,205	0,305	0,380	0,360	0,435	0,350	0,390	0,400	0,185
Pili 15 min	260		0,270	0,330	0,465	0,530	0,530	0,880	0,530	0,485	0,500	0,210
	280		0,165	0,195	0,260	0,290	0,290	0,470	0,295	0,330	0,330	0,175

TABLEAU XVI

Densités optiques lues à 260 nm et 280 nm des fractions de gradients de saccharose 10 p.100 -
 50 p.100 faits à partir de suspension de pili isolés d'une culture de cellules femelles
 (pili F⁻) et de croisements de 5 min et 15 min (pili 5 min et pili 15 min)



b) Discussion

Nous avons voulu expliquer le déplacement vers le haut du gradient et l'étalement du pic contenant les F-pili isolés à partir de bactéries en cours de croisement.

Il faut d'abord préciser que l'extraction des pili à partir des bactéries en croisement est réalisée de la même façon qu'à partir d'une souche bactérienne unique. Nous isolons donc uniquement les F-pili fixés sur les cellules et non ceux pouvant se trouver dans le surnageant de la culture. Il est donc exclu que nous mesurions les pili éliminés spontanément par les cellules au cours du croisement.

Selon les résultats de WENDT et coll. (90) en gradient de saccharose, les fragments de F-pili sédimentent plus lentement que les F-pili eux-mêmes. En effet, ces auteurs ont montré que dans un gradient de saccharose 20 p.100 - 40 p.100, les F-pili sonnisés 5 min à 10 Kc se trouvaient dans la partie supérieure du gradient au niveau d'une zone correspondant à une concentration en saccharose d'environ 25 p.100, alors que les F-pili non sonnisés sédimentent dans une zone correspondant à une concentration en saccharose de 30 p.100.

Cette expérience ne nous satisfait cependant pas entièrement, l'importance des dégradations par sonnication étant impossible à déterminer.

Nous avons donc essayé nous mêmes de fragmenter les F-pili moins violemment qu'avec les ultrasons. Il s'agissait de les soumettre à des chocs hydrodynamiques. Pour cela, une suspension de pili a été

soumise à l'action du "Virtiss" à 13.000 tours/min pendant 20 min. Les courbes de densité optique, ainsi que celles de la radioactivité avec ou sans l'action du "Virtiss", sont superposables. Il semble donc que les chocs hydrodynamiques du Virtiss ne soient pas suffisants pour couper les F-pili en fragments suffisamment petits pour que leur coefficient de sédimentation soit modifié. Etant donné la fragilité des F-pili, il apparaît que leur position dans un gradient de saccharose ne soit modifiée que lorsqu'ils sont très profondément dégradés.

Nous n'avons pu en apporter la preuve par notre propre expérimentation, mais il ressort des expériences de WENDT que les très petits fragments de F-pili sédimentent moins vite que les F-pili intacts.

Le déplacement du pic vers le haut du gradient pourrait donc correspondre à une diminution importante de la longueur des F-pili durant le croisement. Cette diminution de taille n'est pas homogène si l'on considère que les F-pili commencent à se rétracter après le premier contact avec la cellule F^- et que les moments de contact entre Hfr et F^- se situent au hasard entre l'instant du mélange et 6 min à 10 min plus tard.

Après 10 min ou 15 min de croisement, on trouvera donc toutes les situations intermédiaires entre un contact récent et un contact depuis 15 min. On assiste donc à la formation d'une série de F-pili de taille inférieure aux F-pili initiaux.

Par contre, il n'a pas été possible d'apporter une explication à l'apparition d'un pic dans le tube 1 au cours du croisement.

Les examens en microscopie électronique ne nous ont pas permis d'y déceler de structures précises sur lesquelles se trouvent adsorbés les F-pili. Nos connaissances sur le matériel sédimentant à ce niveau se résument en deux points.

- Il s'agit de particules relativement denses, soit très homogènes si l'on considère qu'elles sédimentent sous forme d'une bande étroite recueillie en une seule fraction, soit très fragiles, si l'on suppose que l'ensemble des particules sédimente au fond du tube, mais que toute particule entrant au contact du culot est détruite.

- Ces particules contiennent les protéines spécifiques de l'adsorption du phage f2, elles sont donc formées de F-pili très modifiés ou de particules d'une autre origine, sur lesquelles sont fixées les protéines particulières aux F-pili.

Nous ne pouvons faire ici que des hypothèses pour interpréter ces phénomènes, ceux-ci devant être étudiés par d'autres méthodes pour être précisés.

Nous pensons qu'après le contact entre la cellule femelle et le F-pilus de la cellule mâle, ce dernier se rétracte très fortement et sédimente après extraction au niveau des tubes 6 et 7. Puis arrive un évènement que nous n'avons pas pu déterminer, mais qui est vraisemblablement lié au contact entre les cellules mâles et femelles. Cet évènement modifie profondément le coefficient de sédimentation des protéines des F-pili.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail, nous avons étudié dans un premier temps, l'aspect des cellules en contact au cours de la conjugaison bactérienne, en microscopie électronique sur coupes et après autoradiographie, dans le but de reconnaître les cellules de sexe opposé. Nous avons montré des images de conjugaison sur lesquelles un pont intercellulaire est nettement visible. Cependant, nous avons observé des contacts entre des cellules de même sexe ayant le même aspect que des contacts entre cellules de sexe différent. De ce fait, nous n'avons pas pu certifier que les images observées par nous-même et par les autres auteurs, correspondaient réellement à des images de conjugaison.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié la conjugaison bactérienne en nous efforçant de montrer le rôle des F-pili au cours de ce phénomène.

La mise au point d'une méthode d'isolement et de purification des F-pili, nous a permis de montrer que dans nos conditions expérimentales, les F-pili isolés de bactéries Hfr, occupaient une position constante dans un gradient de densité de saccharose.

Les techniques appliquées aux F-pili isolés à partir de croisements entre des cellules Hfr et F⁻ nous amènent à conclure que les F-pili diminuent de longueur au cours du croisement. Nos résultats suggèrent que les F-pili ne jouent qu'un rôle épisodique au cours de la conjugaison en servant vraisemblablement d'organe de reconnaissance.

Les résultats que nous avons obtenus, sont en accord avec les hypothèses de CURTISS (19) et de NOVOTNY et coll. (73). Nous pensons qu'au cours de la conjugaison le F-pilus sert tout d'abord d'organe de reconnaissance entre la cellule mâle et la cellule femelle. Par la suite, grâce à sa rétraction dans la cellule mâle, il contribue à rapprocher les deux cellules jusqu'à ce qu'un contact intime s'établisse, contact déclenchant le transfert du matériel génétique de la cellule mâle à la cellule femelle.

* * *

PHOTOGRAPHIES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Photo n° 1

Accolement intime avec solution de continuité entre deux cellules en conjugaison. Noter le déplacement du nucléoplasme compact et fibrillaire vers le point de contact (G x 82.000).





9115
1962

Photo n° 2

Conjugaison entre une cellule F⁻ marquée à la ³H-Leucine et une cellule Hfr Cya non marquée. Le contact s'effectue par l'intermédiaire d'un pont intercellulaire en position terminale par rapport à la cellule F⁻. Les cellules sont situées dans deux plans sensiblement perpendiculaires (G x 30.000).

Photos n° 3 et 4

Les contacts entre deux cellules peuvent avoir des aspects différents. Sur la photo n°3 (G x 30.000) il semble y avoir un décollement de la paroi cellulaire au niveau du point de contact. Sur la photo n° 4, on observe une cassure nette de celle-ci (G x 30.000).

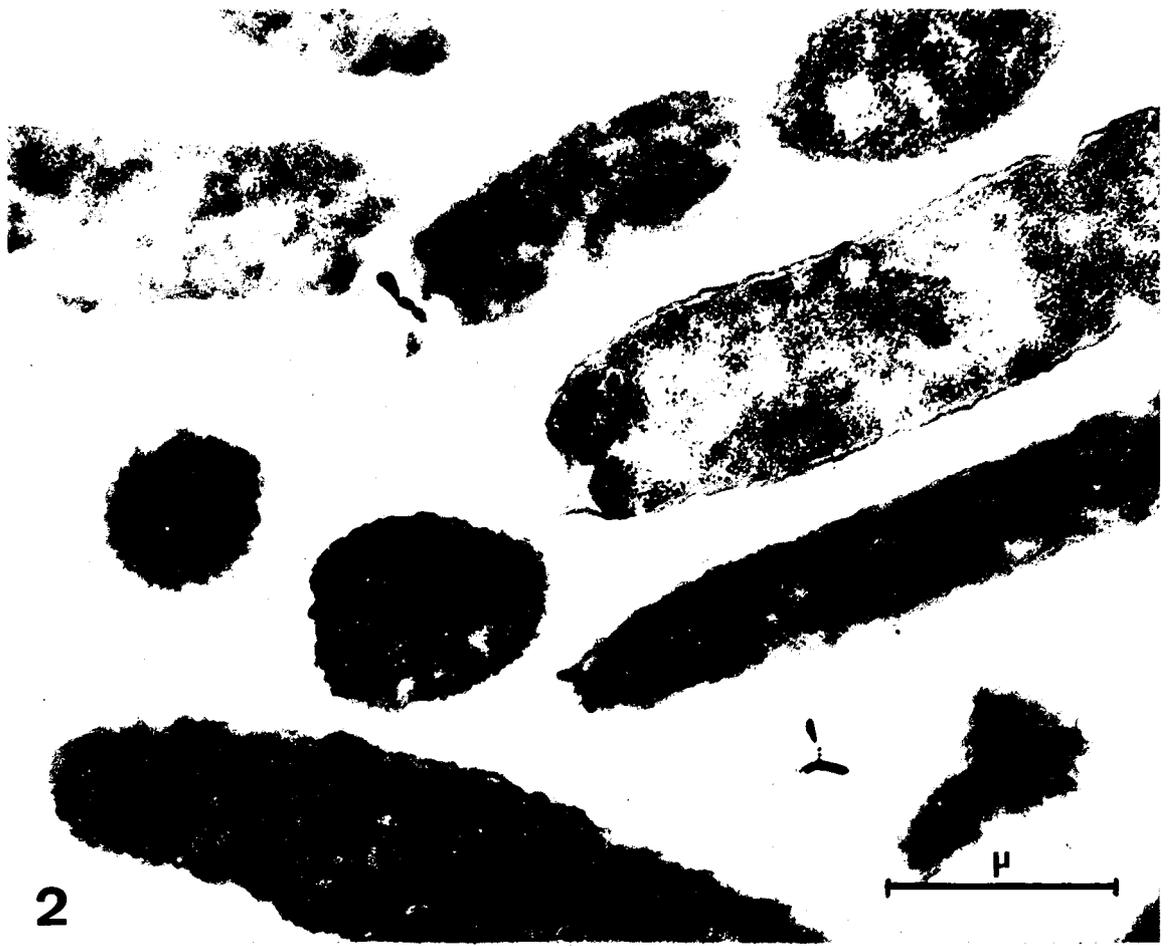


Photo n° 5

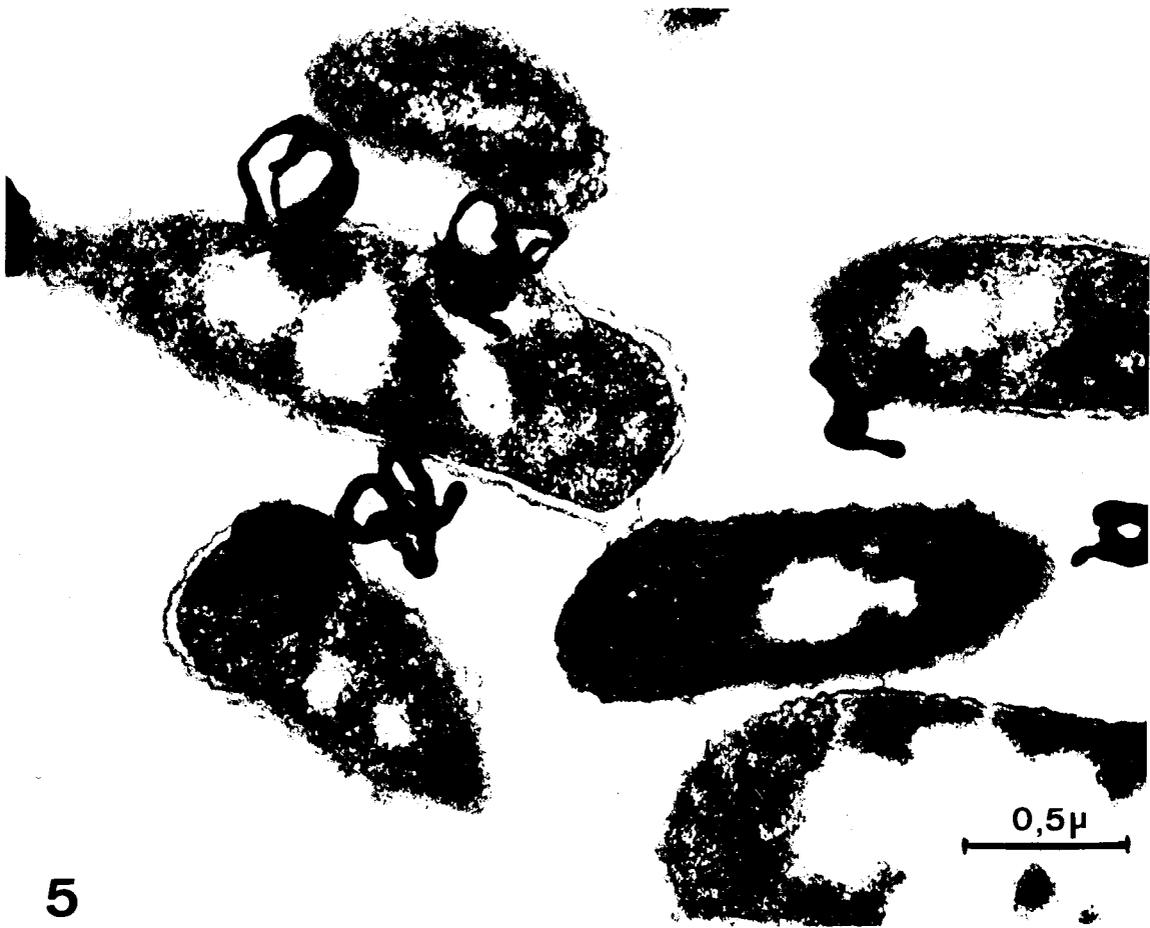
Croisement de 45 min entre une bactérie F^- marquée au tritium et une bactérie Hfr non marquée.

Le pont intercellulaire est en position subterminale. Noter la cassure de la paroi de la cellule femelle, la membrane cellulaire étant restée en place (G x 43.500).

Photo n° 6

Photographie du même croisement. Les cellules sont disposées en croix; la connection intercellulaire est ici en position terminale par rapport à la cellule F^- marquée (G x 52.500).





5



6

BUS
LILLE

Photos n° 7 et 8

Autoradiogrammes du croisement de 15 min montrant un aspect différent de celui observé sur les photos n° 5 et 6. Ici, les cellules sont réunies par des excroissances de l'enveloppe bactérienne. Elles sont situées dans deux plans perpendiculaires :

photo n° 7 (G x 40.000)

photo n° 8 (G x 46.000)

Photos n° 9 et 10

Autoradiogrammes du croisement de 45 min. Les cellules accolées sont ici dans le même plan :

..photo n° 9 (G x 60.000)

photo n° 10 (G x 60.000)



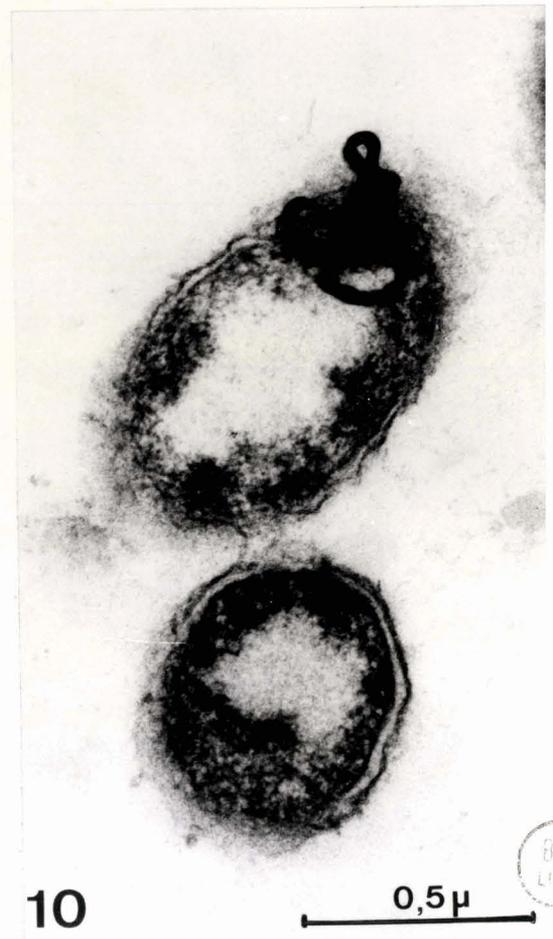
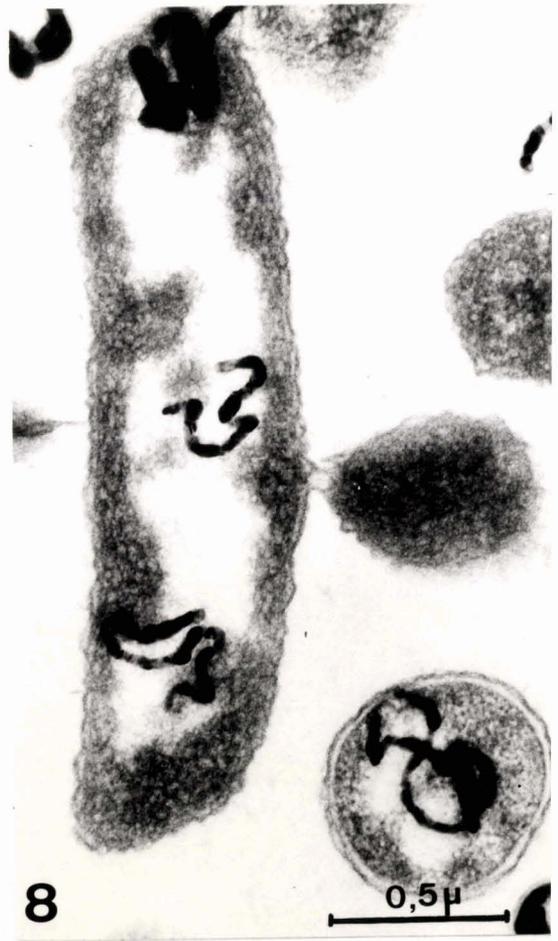
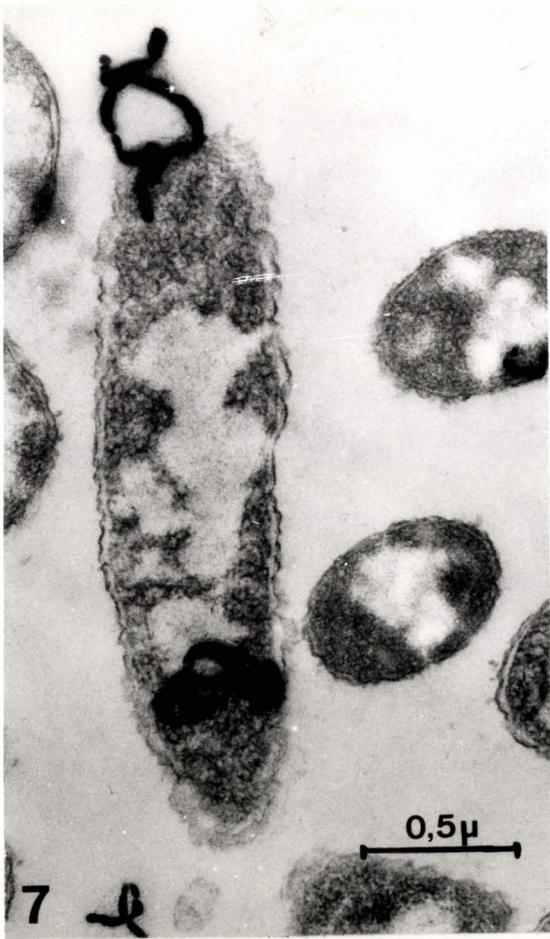


Photo n° 11

Aspect en coupe de deux cellules Hfr entre lesquelles on peut observer des structures semblables à celles décrites par SCHREIL et coll. (G x 30.000).

Photo n° 12

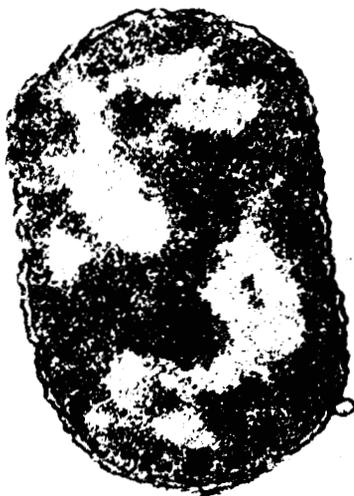
On peut également trouver ces mêmes structures entre deux cellules F⁻ 2000 x 17 k (G x 36.000).

Photo n° 13

Autoradiographie de deux cellules F⁻ marquées au tritium, accolées par l'intermédiaire de "bulles" (G x 40.000).

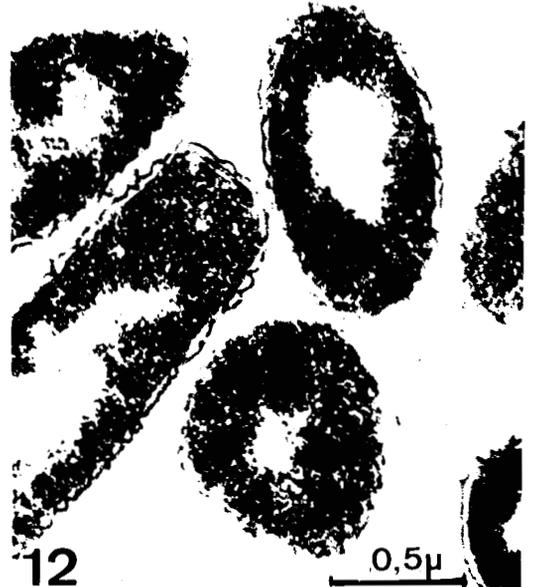
Photo n° 14

Accolement entre deux cellules mâles. L'aspect de l'accolement est semblable à celui décrit chez deux cellules de sexe différent (G x 30.000).



11

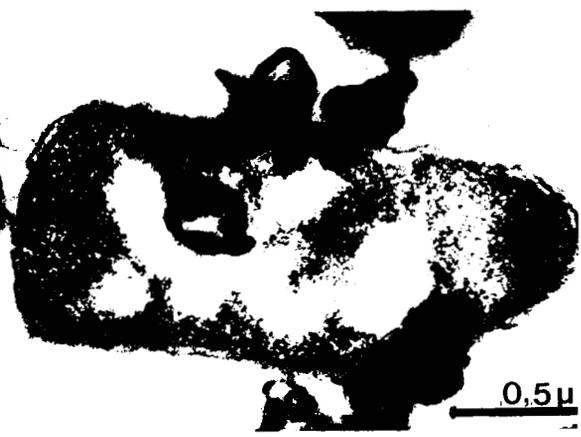
0,5μ



12

0,5μ

13



0,5μ



14

0,5μ



Photo n° 15

Aspect après coloration négative de la suspension de pili isolés de la souche Hfr Thy . Les F-pili se rassemblent et forment des sortes de bottes. A côté de ces F-pili, on observe des pili non sexuels et des flagelles (G x 33.000).

Photo n° 16

Coloration négative d'une suspension de pili isolés de la souche F⁻ 2000 x 17 k. Nous y observons deux sortes d'éléments : les plus gros, correspondant aux flagelles, les plus fins aux pili non sexuels (G x 33.000).

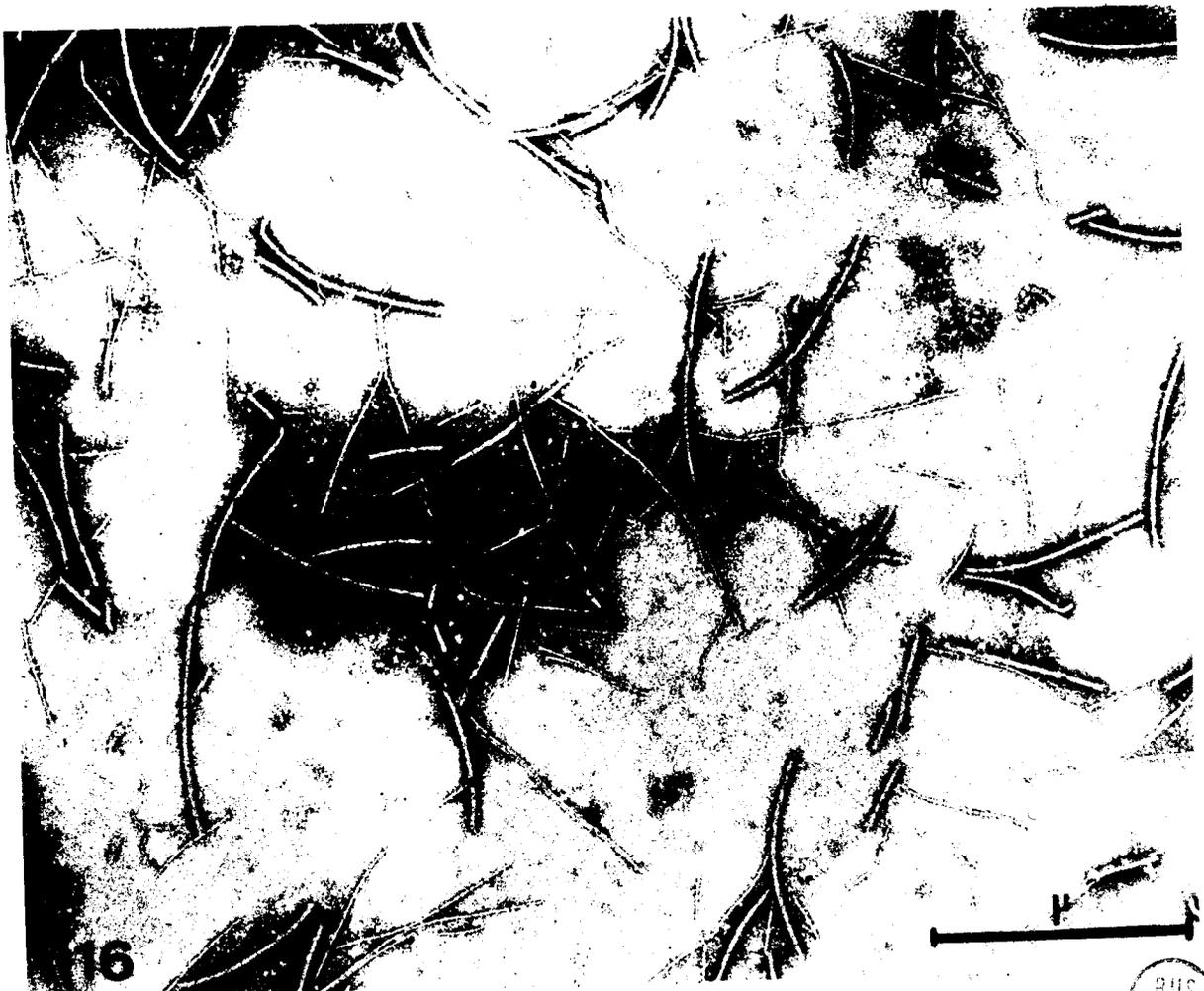
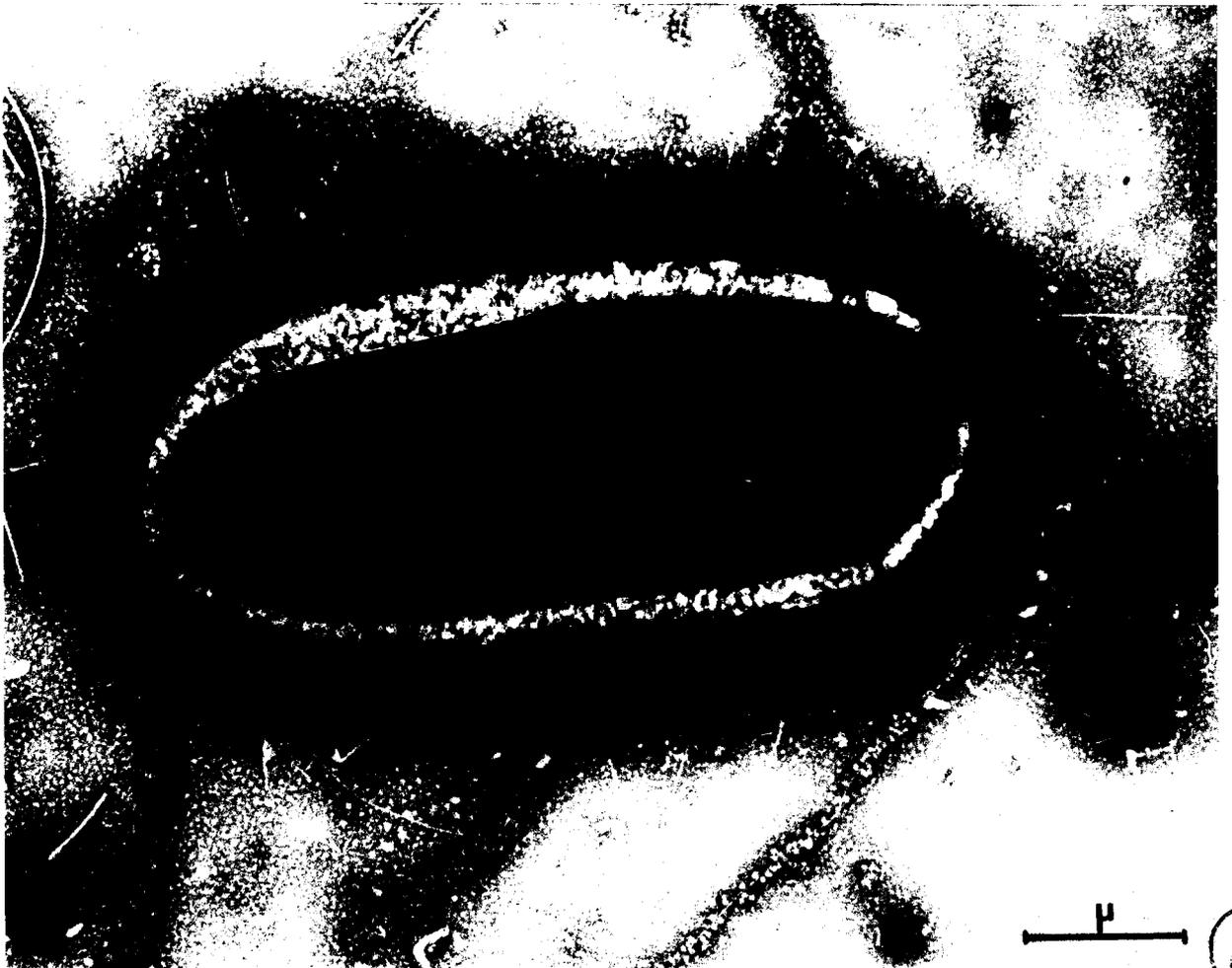
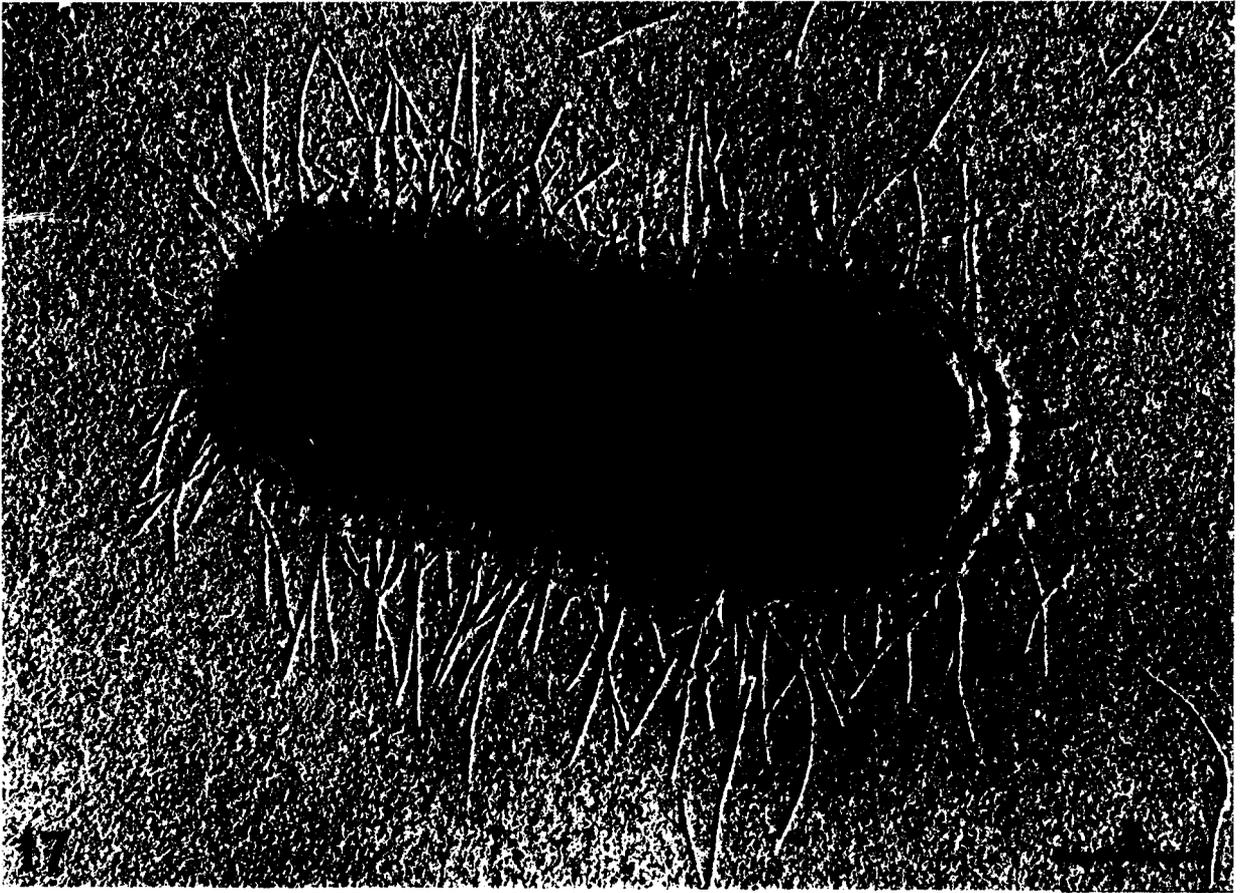


Photo n° 17

Aspect d'une cellule Hfr Thy cultivée en milieu de Luria glucosé à 1 p. 100, observée après ombrage au platine. Nous y voyons très nettement l'ensemble des fimbriae composés de pili non sexuels de F-pili et de flagelles (G x 18.000).

Photo n° 18

Photographie de la même cellule cultivée dans des conditions identiques. La suspension bactérienne a été mise en contact avec une suspension de phages f2 puis colorée. Les particules phagiques sont venues s'adsorber sur les F-pili (G x 20.000).



Photos n° 19 et 20

Coloration négative de la suspension de pili isolés de la souche
Hfr Thy (représentée sur la photo n° 15) après addition de phages f2.

Photo n°19

Au centre, on y retrouve des F-pili rassemblés en bottes. Les pili
non sexuels et les flagelles ne sont pas entourés de phages (G x 15.000).

Photo n°20

Cette photographie, prise à un plus fort grossissement, montre plus
nettement l'attachement des phages f2 sur les F-pili. Les fimbriae
d'un diamètre plus important sont des flagelles (G x 20.000).

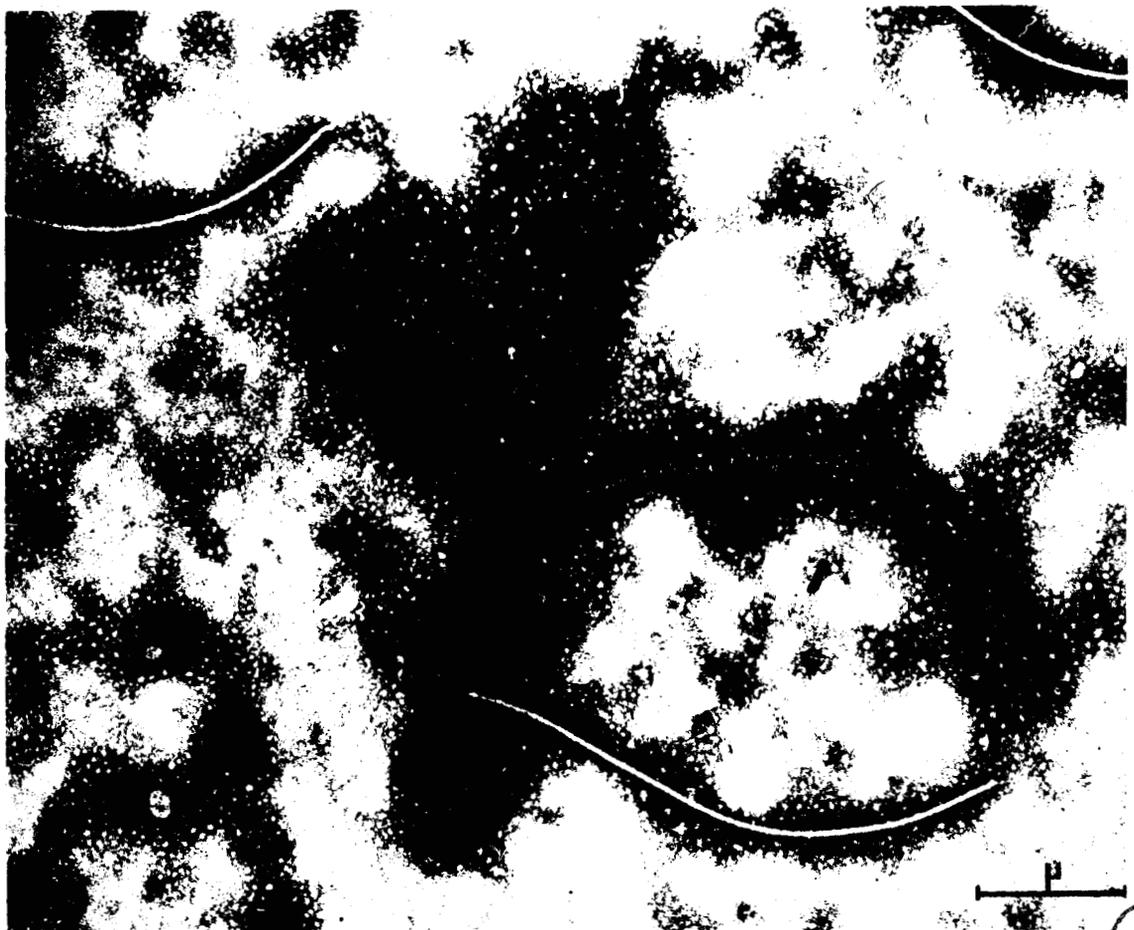


Photo n° 21

Observation après addition de phages f2 et coloration négative de la partie inférieure du gradient de saccharose 20 p.100 - 70 p.100 fait à partir d'une suspension de pili isolés de la souche Hfr Thy (voir p. 75 à 78). Les F-pili y sont peu nombreux. Cette zone de gradient contient également des flagelles d'une longueur importante (G x 30.000).

Photo n° 22

Image de la partie supérieure du même gradient. Les F-pili sont également peu nombreux (G x 40.000). Les flagelles sont d'une longueur moins importante que ceux observés sur la photo n° 21.

Photo n° 23

Aspect de la zone médiane du gradient, correspondant au pic. Les F-pili y sont très nombreux. Noter que les flagelles sont très fragmentés (G x 23.000).

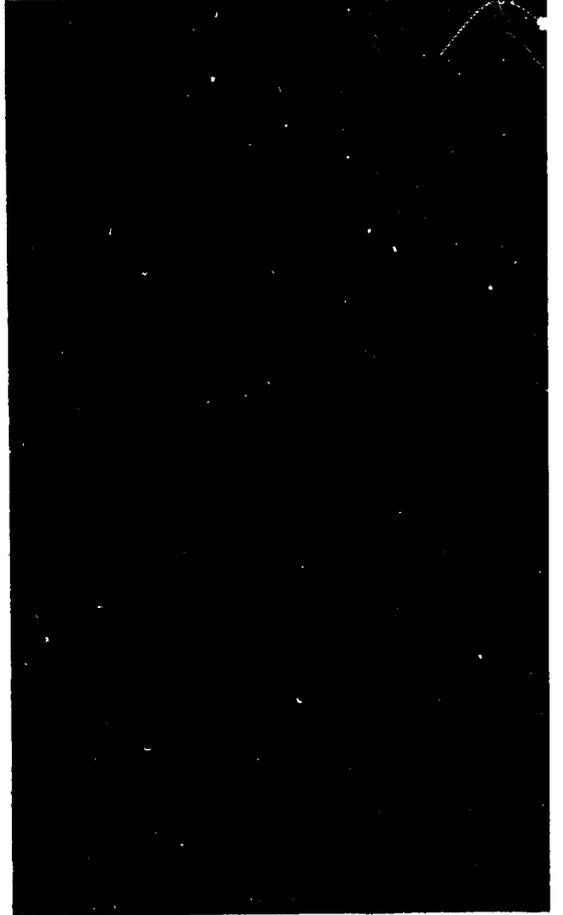
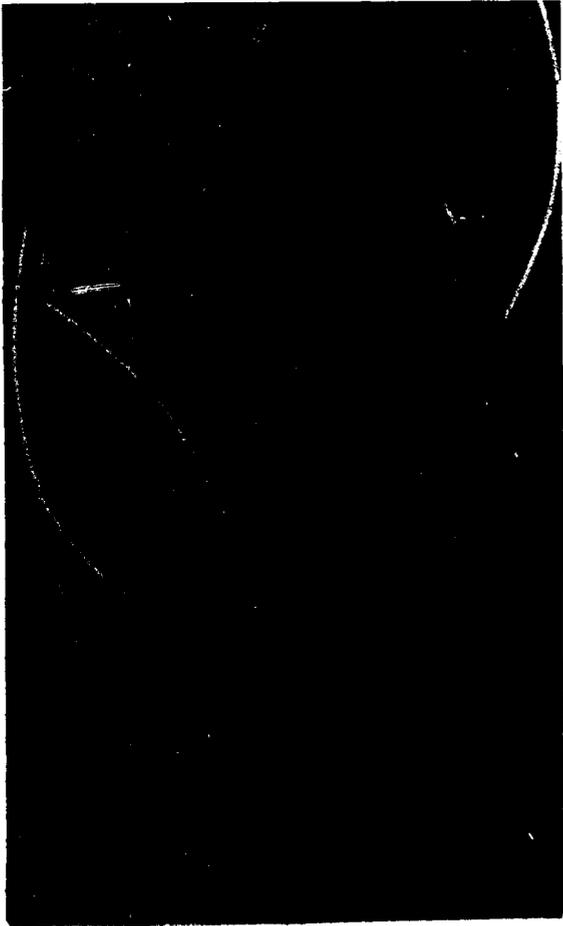


Photo n° 24

Cellule Hfr cultivée en milieu de Luria glucosé à 1 p.100 sans agitation et en anaérobiose. Noter la présence de nombreux fimbriae. Technique d'ombrage au platine (G x 20.000).

Photo n° 25

Cellule F⁻ 2000 x 17 k cultivée en milieu de Luria glucosé à 1 p.100 agité en aérobiose. Noter que dans ces conditions la cellule est dépourvue de fimbriae. Technique d'ombrage (G x 8.000).

Photo n° 26

Photographie d'un croisement entre une cellule Hfr et une cellule F⁻ cultivées dans les conditions décrites précédemment. En haut à droite, on observe deux cellules Hfr (pourvues de pili). L'une d'entre-elles est reliée à une cellule F⁻ (dépourvue de pili) par l'intermédiaire d'un long F-pilus. Technique d'ombrage (G x 12.000).





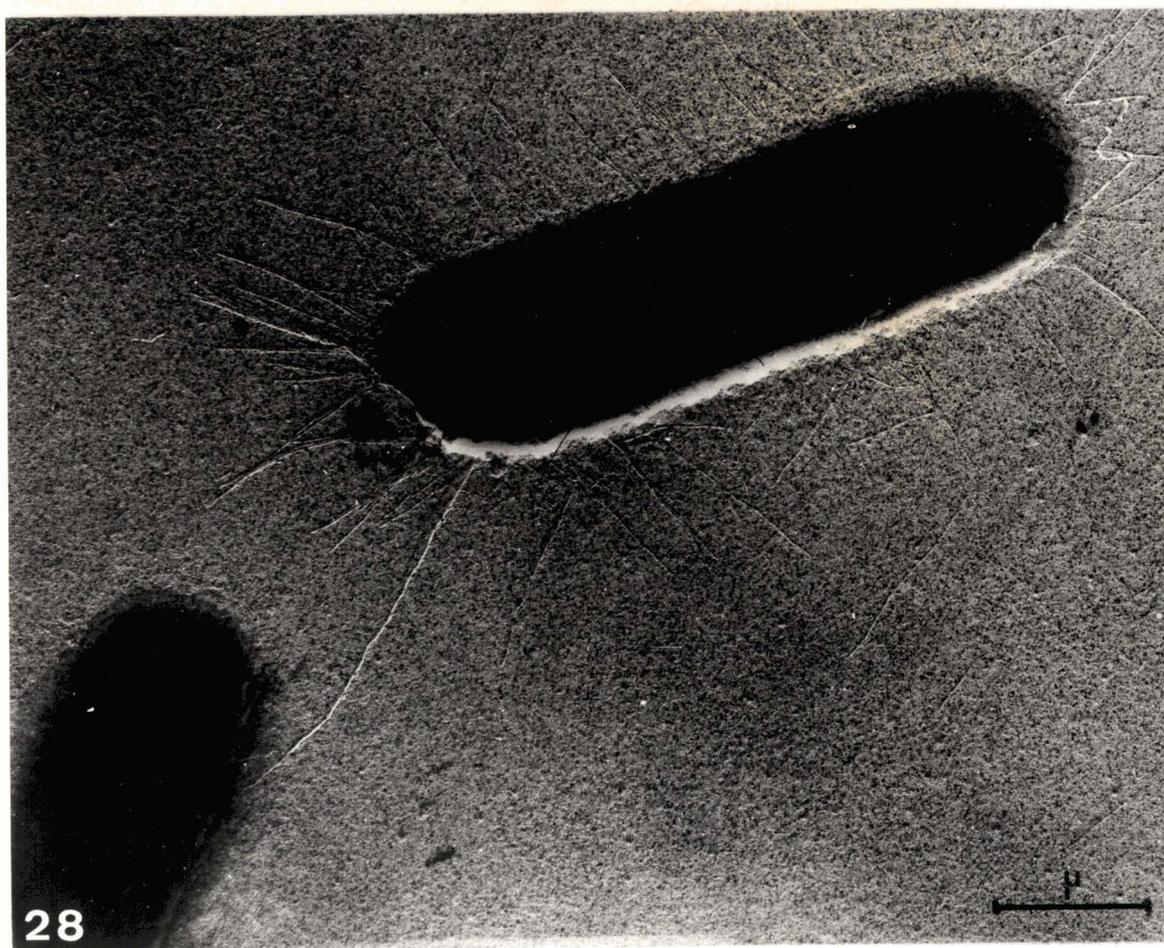
Photos n° 27 et 28

Aspects du même croisement que celui décrit sur la photo n° 26.

Technique d'ombrage :

Photo n° 27 (G x 12.500)

Photo n° 28 (G x 20.000)

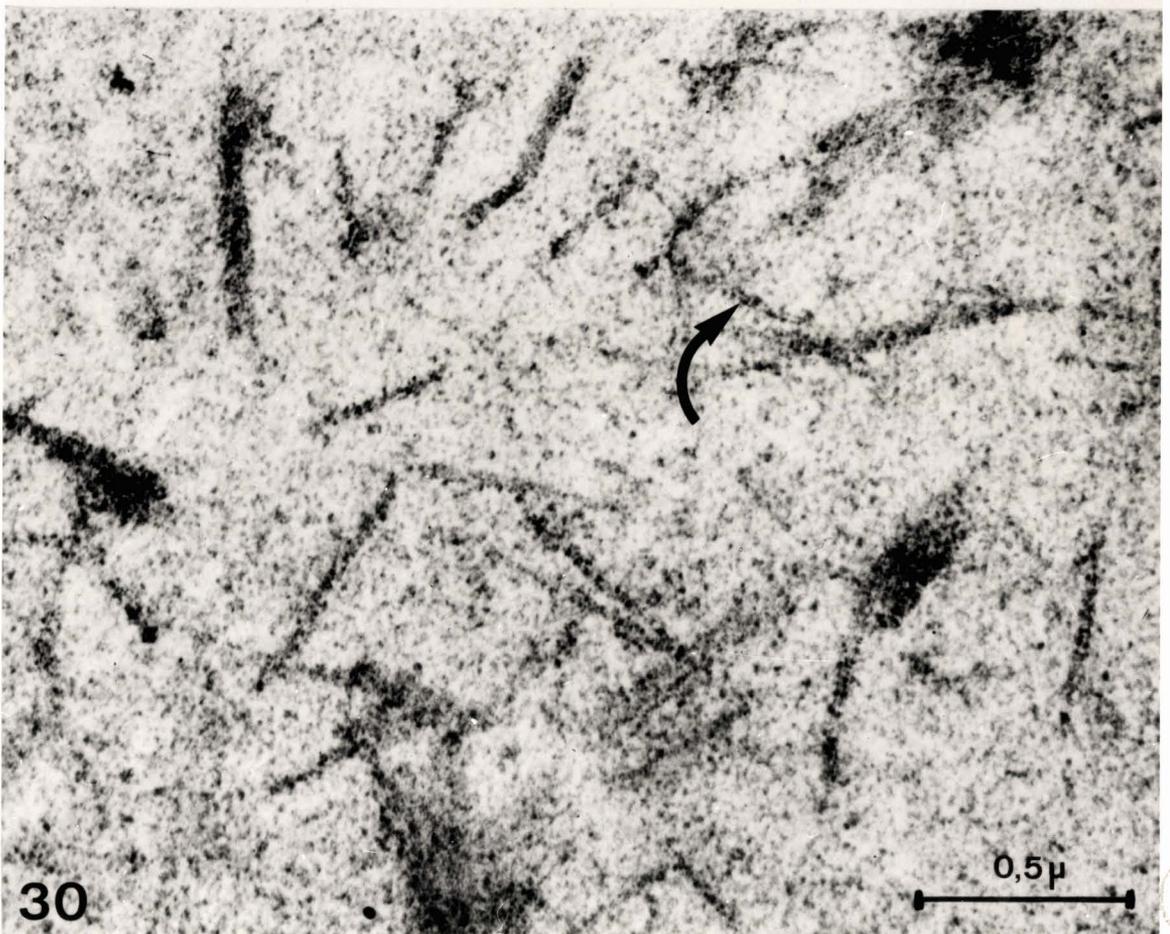


Photos n° 29 et 30

Photo n° 29 : Aspect d'un culot de F-pili en coupe.

Les F-pili se présentent sous la forme de cylindres creux d'environ 100 Å de diamètre (flèches) (G x 30.000).

Photo N° 30 : Image de la même préparation à un plus fort grossissement (G x 57.000):



BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ANDERSON T.F.
On the mechanism of adsorption of bacteriophages on host cells.
Symp. Soc. Gen. Microbiol., 1949, 1, 76.

- 2 - ANDERSON T.F., WOLLMAN E.L. et JACOB F.
Sur le processus de conjugaison et de recombinaison chez
E. coli. III, Aspects morphologiques en microscopie électronique.
Ann. Inst. Pasteur, 1957, 93, 450-455.

- 3 - BARON L.S., CAREY W.F. et SPILMAN W.M.
Genetic recombination between Escherichia coli and
Salmonella typhi-murium.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1959, 45, 976-984.

- 4 - BARON L.S., GEMSKI P., Jr., JOHNSON E.M. et WOHLHIETER J.A.
Intergeneric bacterial matings.
Bacteriol. Rev., 1968, 32, 362-369.

- 5 - BHASKARAN K.
Genetic recombination in Vibrio cholerae.
J. Gen. Microbiol., 1958, 19, 71-75.

- 6 - BRENNER S. et HORNE R.W.
A negative staining method for high resolution
microscopy of viruses.
Biochem. Biophys. Acta, 1959, 34, 103-110.

- 7 - BRINTON C.C. Jr.
Non flagellar appendages of bacteria.
Nature, 1959, 183, 782-786.

- 8 - BRINTON C.C. Jr.
The structure, function, synthesis and genetic control of
bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport
in Gram negative bacteria.
Trans N.Y. Acad. Sci., 1965, 27, 1003-1054.

9 - BRINTON C.C. Jr

Contributions of pili to the specificity of the bacterial surface and an unitary hypothesis of conjugal infections heredity.

In B.D. Davis et L. Warren (ed.) Specificity of cell surfaces. Prentice-hall, Englewood Cliffs, N.J., 1966, 37-70.

10 - BRINTON C.C. Jr and BARON L.S.

Transfer of piliation from Escherichia coli to Salmonella typhosa by genetic recombinaison.

Biochim. Biophys. Acta, 1960, 42, 298-311.

11 - BRINTON C.C. Jr, et BEER H.

The interaction of male specific bacteriophages with F-pili. In J.S. Colter et W. Paranchych (ed.), Molecular Biology of Viruses, Academic Press, Inc., New York, 1967, 251-289.

12 - BRINTON C.C. Jr, GEMSKI P. et CARNAHAN J.

A new type of bacterial pilus genetically controlled by the fertility factor of E. coli K12 and its role in chromosome transfer.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1964, 52, 776-783.

13 - BRINTON C.C. Jr, GEMSKI P., FALKOW S. et BARON L.S.

Location of the piliation factor on the chromosome of Escherichia coli.

Biophys. Biochem. Res. Commun., 1961, 5, 293-299.

14 - BRINTON C.C. Jr et HUANG S.L.

Substructure of bacteriol pili protein.

Bact. Proc., 1962, G.103.

15 - BRINTON C.C. Jr et STONE M.J.

Chemical composition of pili a fibrous protein.

Bact. Proc., 1961, G 96.

- 16 - CARO L.G. et SCHNOS M.
The attachment of the male specific bacteriophage f1 to sensitive strains of Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1966, 56, 126-132.
- 17 - CAVALLI-SFORZA L. L., LEDERBERG J. et LEDERBERG E.M.
An infective factor controlling sex compatibility in Bacterium coli.
J. Gen. Microbiol., 1953, 8, 89-103.
- 18 - CRAWFORD E.M. et GESTELAND R.F.
The adsorption of bacteriophage R17.
Virology, 1964, 22, 165-167.
- 19 - CURTISS R.
Bacterial conjugation.
Ann. Rev. Microbiol., 1969, 23, 69-127.
- 20 - CURTISS R., CARO L., ALLISON D. et STALLIONS D.
Early stages of conjugation in Escherichia coli.
J. Bact., 1969, 100, 1091-1104.
- 21 - CURTISS R., CHARAMELLA L.J., STALLIONS D.R. et MAYS J.A.
Parental functions during conjugation in Escherichia coli K12.
Bacteriol. Rev., 1968, 32, 320-348.
- 22 - CURTISS R. et STALLIONS D.R.
Energy requirements for specific pair formation during conjugation in Escherichia coli.
J. Bacteriol., 1967, 94, 490-492.
- 23 - DAVIS B.D.
Non filtrability of the agents of genetic recombination in Escherichia coli.
J. Bacteriol., 1950, 60, 507-508.

- 24 - DE GRAFF F.K., TIEZE G.A., BONGA S.W. et STOUTHAMER A.H.
Purification and genetic determination of bacteriocin production in Enterobacter cloacae.
J. Bacteriol., 1968, 95, 631-640.
- 25 - DROZ B.
Synthèse et transfert des protéines cellulaires dans les neurones ganglionnaires. Etude radioautographique quantitative en microscopie électronique.
J. Microscopie, 1967, 6, 201-228.
- 26 - DUGUID J.P. et GILLIES R.R.
Fimbriae and adhesive properties in dysentery bacilli.
J. Path. Bact., 1957, 74, 397-411.
- 27 - DUGUID J.P., SMITH I.W., DEMPSTER G. et EDMUNDS P.N.
Non flagellar filamentous appendages (fimbriae) and hemagglutinating activity in "Bacterium coli".
J. Path. Bact., 1955, 70, 335-348.
- 28 - FALKOW S., MARMUR J., CAREY W.F., SPILMAN W.M. et BARON L.S.
Genetics, 1961, 46, 703-706.
- 29 - FALKOW S., WOHLHIETER J.A., CITARELLA R.V. et BARON L.S.
Transfer of episomic elements to Proteus.
I - Transfer of F-linked chromosomal determinants
J. Bacteriol., 1964, 87, 209-219.
- 30 - FAREED G., IPPEN K.A. et VALENTINE R.C.
Active fragments of a filamentous bacteriophage.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1966, 25, 275-284.
- 31 - FISHER K.W.
The role of the Krebs cycle in conjugation in Escherichia coli K1
J. Gen. Microbiol., 1957, 16, 120-135.

- 32 - FISHER K.W.
The nature of the endergonic processes in conjugation in Escherichia coli K12.
J. Gen. Microbiol., 1957, 16, 136-145.
- 33 - FISHER K.W.
Mechanically caused damage to Hfr cells of Escherichia coli K12.
Genetic Res. (Cambridge), 1966, 7, 267-271.
- 34 - GEMSKI P. Jr
Studies on the genetics of piliation in Escherichia coli.
Ph.D. Thesis University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pa. 1964.
- 35 - GINOZA H.S. et MATNEY T.S.
Transmission of resistance transfer factor from E. coli to
two species of Pasteurella.
J. Bacteriol., 1963, 85, 1177-1178.
- 36 - GLAUERT A.M. et GLAUERT R.H.
Araldite as an embedding medium for electron microscopy.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1958, 4, 191-194.
- 37 - GOSS W.A., DEITZ W.H. et COOK T.M.
Mechanism of action of nalidixic acid on Escherichia coli.
J. Bacteriol., 1964, 88, 1112-1118.
- 38 - GOSS W.A., DEITZ W.H. et COOK T.M.
Mechanism of action of nalidixic acid on Escherichia coli.
II - Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis.
J. Bacteriol., 1965, 89, 1068-1074.
- 39 - GROSS J.D. et CARO L.G.
DNA transfer in bacterial conjugation.
J. Mol. Biol., 1966, 16, 269-284.

- 40 - GUILLAUME J.
Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences, Lille 1965.
- 41 - GUILLAUME J.B., TERRIEN M.F., KUSNIERZ J.P. et MARTIN G.
Recherche des conditions optimales de la conjugaison bactérienne chez Escherichia coli K12.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1970, XXI, 15-24.
- 42 - HAYES W.
The mechanism of genetic recombination in E. coli.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1953, 18, 75.
- 43 - HEUMANN W.
Conjugation in starforming Rhizobium lupini.
Molec. Gen. Genet., 1968, 102, 132-144.
- 44 - HOLLOWAY B.W.
Genetic recombination in Pseudomonas aeruginosa.
J. Gen. Microbiol., 1955, 13, 572-581.
- 45 - HOUWINK A.L.
In the nature of the bacterial surface.
Edited by A.A. Miles et N.W. Pirie, Oxford, p.92.
- 46 - HOUWINK A.L. et VAN ITERSOM W.
Electron microscopical observations on bacterial cytology.
II - A study on flagellation.
Biochim. Biophys. Acta, 1950, 5, 10-44.
- 47 - IPPEN K.A. et VALENTINE R.C.
The sex hair of Escherichia coli as sensory fiber, conjugation tube, or mating arm.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 27, 674-680.

- 48 - ISHIBASHI M.
F-pilus as f^+ antigen .
J. Bacteriol., 1967, 93, 379-389.
- 49 - JACOB F., BRENNER S., CUZIN F.
On the regulation of DNA replication in bacteria.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 329-348.
- 50 - JACOB F. et WOLLMAN E.L.
Etapes de la recombinaison génétique chez Escherichia coli K12.
C.R. Acad. Sci., 1955, 240, 2566-2568.
- 51 - JACOB F. et WOLLMAN E.L.
Sur le processus de conjugaison et de recombinaison génétique
chez Escherichia coli. I - L'induction par conjugaison ou
induction zygotique.
Ann. Inst. Pasteur, 1956, 91, 486-510.
- 52 - JACOB F. et WOLLMAN E.L.
Sexuality and the genetics of bacteria.
Academic Press; Ed. New York and London, 1961, 374 p.
- 53 - KNOLLE P.
Evidence for the identity of the mating specific site of
male cells of Escherichia coli with the receptor site of
an RNA phage.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 27, 81-87.
- 54 - KRISCH R.E. et KVETKAS M.J.
Inhibition of bacterial mating by amino-acid deprivation.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1966, 22, 707-711.
- 55 - KURYLO-BOROWSKA Z.
On the mode of action of edeine. Effect of edeine on the
bacterial DNA.
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 87, 305

- 56 - KUSNIERZ J.P. et LOMBAERT M.A.
Etude de l'initiation du transfert chromosomique chez
Escherichia coli K12.
C.R. Acad. Sci., 1971, 272, 2844-2847.
- 57 - LANCASTER J.H. et SKVARLA J.J.
Ultrastructure studies of conjugating Escherichia coli.
Nature, 1970, 226, 556-557.
- 58 - LAWN A.M.
Morphological features of the pili associated with
 $R^+ F^-$ and $R^- F^+$ bacteria.
J. Gen. Microbiol., 1966, 45, 377-383.
- 59 - LAWTON W.D., MORRIS B.C. et BURROWS T.W.
Gene transfer in strains of Pasteurella pseudotuberculosis.
J. Gen. Microbiol., 1968, 52, 25-34.
- 60 - LEDERBERG J.
Conjugal pairing in Escherichia coli.
J. Bacteriol., 1956, 71, 497-498.
- 61 - LEDERBERG J. et TATUM E.L.
Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants
of bacteria.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1946, 11, 113-114.
- 62 - LEDERBERG J. et TATUM E.L.
Nature, 1946, 153, 558.
- 63 - LENNOX E.S.
Transduction of linked genetic characters of the host
by bacteriophage P1.
Virology, 1955, 1, 190-206.

64 - LODISH H.F. et ZINDER N.D.

Attachment of f2 bacteriophage to cellulose nitrate filters.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 19, 269-278.

65 - LOEB T.

Isolation of a bacteriophage specific for the F⁺ and Hfr mating types of Escherichia coli K12.
Science, 1960, 131, 932-933.

66 - LOEB T. et ZINDER N.D.

A bacteriophage containing RNA .
Proc. Natl. Acad. Sci., 1961, 47, 282-289.

67 - LURIA S.E. et BURROUS J.W.

Hybridization between Escherichia coli and Shigella.
J. Bacteriol., 1957, 74, 461-476.

68 - MAKELA P.H.

Hfr males in Salmonella abony.
Genetics, 1963, 48, 423-429.

69 - MARTIN G. et JACOB F.

Transfert de l'épisome sexuel d'Escherichia coli à Pasteurella pestis.
C.R. Acad. Sci., 1962, 254, 3589-3590.

70 - MESELSON M.

The molecular basis of genetic recombination.
In R.A. Brink (Ed.) Heritage from Mendel Univ. of Wisconsin Press Madison 1967, 81-104.

71 - MEYNELL E., MEYNELL G.G. et DATTA N.

Phylogenetic relationships of drug resistance factors and other transmissible bacterial plasmids.
Bacteriol. Rev., 1968, 32, 55-83.

- 72 - NOVOTNY C., CARNAHAN J. et BRINTON C.C. Jr
Mechanical removal of F-pili, type I pili and flagella from Hfr and RTF donor cells and the kinetics of their reappearance .
J. Bacteriol., 1969, 98, 1294-1306.
- 73 - NOVOTNY C., KNIGHT W.S. et BRINTON C.C. Jr
Inhibition of Bacterial conjugation by ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid male specific bacteriophages.
J. Bacteriol., 1968, 95, 314-326.
- 74 - NOVOTNY C., RAIZEN E., KNIGHT W.S. et BRINTON C.C. Jr
Functions of F-pili in mating pair formation and male bacteriophage infection studied by blending spectra and reappearance kinetics.
J. Bacteriol., 1969, 98, 1307-1319.
- 75 - OHKI H. et TOMIZAWA J.I.
Assymetric transfer of DNA strands in bacterial conjugation.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1968, 33, 651-658.
- 76 - ØRSKOV I. et ØRSKOV F.
An antigen termed f^+ occuring in F^+ E. coli strains.
Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1960, 48, 37-41.
- 77 - OU J.T. et ANDERSON T.F.
Role of pili in bacterial conjugation.
J. Bacteriol., 1970, 102, 648-654.
- 78 - PARDEE A.B., JACOB F. et MONOD J.
The genetic control and cytoplasmic expression of "Inducibility in the synthesis of β -galactosidase by Escherichia coli" .
J. Mol. Biol., 1959, 1, 165-178.

- 79 - REYNOLDS E.S.
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J. Cell. Biol., 1963, 17, 208-212.
- 80 - RYTER A., KELLENBERGER E., BIRCH-ANDERSON A. et MAALØE O.
Etude au microscope électronique de plasmas contenant de l'ADN. I - Les nucléosides des bactéries en croissance active.
Z. Naturforsch, 1958, 136, 597-605.
- 81 - SANDERSON K.E.
Revised linkage map of Salmonella typhi-murium.
Bacteriol. Rev., 1967, 31, 354-372.
- 82 - SCHNEIDER H. et FALKOW S.
Characterization of an Hfr strain of Shigella flexneri.
J. Bacteriol., 1964, 88, 682-689.
- 83 - SHREIL W.H. et CHRISTENSEN R.J.
Bacterial conjugation : electron microscope observations of thin sections.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1968, 59, 1152-1157.
- 84 - SILVER S.D.
The Transfer of material during mating in Escherichia coli.
Transfer of DNA and upper limits on the transfer of RNA and protein.
J. Mol. Biol., 1963, 6, 349-360.
- 85 - TATUM E.L. et LEDERBERG J.
Gene recombination in the bacterium E. coli.
J. Bacteriol., 1947, 53, 673-684.
- 86 - TESSMAN E.S. et SLESER
Genetic recombination.
Virology, 1963, 19, 239-240.

- 87 - VALENTINE R.C., SILVERMAN P.M., IPPEN K.A. et MOBACH H.
The F-pilus of Escherichia coli.
In Adv. in Microbiol. Physiol. Acad. Press London and
New York, 1969, 3, 1-52.
- 88 - VALENTINE R.C. et STRAND M.
Complexes of F-pili and RNA bacteriophage.
Science, 1965, 148, 511-513.
- 89 - VALENTINE R.C., WEDEL H. et IPPEN K.A.
F-pili requirement for RNA bacteriophage adsorption.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 21, 277-282.
- 90 - WENDT L.W., IPPEN K.A. et VALENTINE R.
General properties of F-pili.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1966, 23, 375-380.
- 91 - WOLLMAN E.L. et JACOB F.
Sur le mécanisme du transfert de matériel génétique au
cours de la recombinaison chez E. coli K12.
C.R. Acad. Sci., 1955, 240, 2449.
- 92 - WOLLMAN E.L. et JACOB F.
Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez
Escherichia coli. II - La localisation chromosomique du
prophage λ et les conséquences génétiques de l'induction
zygotique.
Ann. Inst. Pasteur, 1957, 93, 323-339.
- 93 - ZINDER N.D.
Sexuality and mating in Salmonella.
Science, 1960, 131, 924-926.

