

50376
1976
74

N° d'ordre : 591

50376
1976
74

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

par

Jacqueline DEBETTE

**TAXONOMIE DE BACTERIES TELLURIQUES
NON FERMENTANTES A GRAM NEGATIF
(étude d'un groupement phénotypique particulier)**



Membres du Jury : MM. J. GUILLAUME
B. MONTUELLE
R. BLONDEAU
H. LECLERC

Président
Rapporteur
Examineur
Membre invité

Soutenu le 24 Juin 1976

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

Ce travail a été effectué au laboratoire de Biologie appliquée de l'U.E.R. de Biologie de l'Université de Lille avec le concours du département d'Informatique de l'I.U.T. de Lille.

Je suis heureuse de pouvoir remercier ici :

Monsieur le Professeur B. MONTUELLE, Chef du Département de Biologie appliquée de l'I.U.T. de Lille, qui m'a témoigné sa confiance en me laissant toute liberté dans la conduite de ce travail et ses conseils pour la rédaction de ce mémoire m'ont été très utiles. De plus, depuis que j'occupe un poste d'enseignement à l'I.U.T. de Biologie appliquée, j'ai beaucoup apprécié ses qualités humaines et partagé ses expériences orientées vers une pédagogie nouvelle. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur J. GUILLAUME, qui me fait l'honneur d'accepter la responsabilité de présider le Jury de cette Thèse, après avoir examiné avec bienveillance mes précédents rapports de recherche.

Monsieur le Professeur H. LECLERC, Sous-Directeur de l'Institut Pasteur de Lille, Directeur de l'Unité INSERM 146 de Lille qui, malgré ses nombreuses occupations, a bien voulu participer à ce Jury.

Monsieur R. BLONDEAU, Docteur ès-Sciences, qui m'a suggéré ce travail de recherche et qui l'a suivi tout au long avec le même intérêt en me prodiguant avec beaucoup de bienveillance ses conseils et en me faisant profiter de ses connaissances en Microbiologie des Sols. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma sympathie.

Monsieur J. LOSFELD, Docteur ès-Sciences, Chef du Département d'Informatique de l'I.U.T., ainsi que ses collaborateurs qui, grâce à leur compétence, ont participé à l'élaboration de ce travail en traitant sur ordinateur les résultats de l'analyse numérique.

Madame C. LEFEBVRE et Mademoiselle J. DUVET qui ont réalisé la dactylographie de ce travail avec beaucoup de soin et de gentillesse.

Enfin, tous mes amis et collègues des laboratoires voisins pour leur aide technique et morale.

_oo_oo_oo_oo_

ABREVIATIONS

- A.D.N. : acide désoxyribonucléique
- A.R.N. : acide ribonucléique
- RNase : ribonucléase
- DNase : désoxyribonucléase
- % GC : contenu en guanine et cytosine exprimé en pourcentage
- E.D.T.A. : éthylène diamine tétraacétique de sodium
- SSC x 1 ou SSC standard : solution saline citrate (NaCl 0,15 M + citrate trisodique 0,015 M - pH 7)
- SSC x 0,1 ; x $\frac{1}{3}$; x 2 ; x 6 ; x 10 : diverses concentrations de solution saline citrate par rapport à la SSC standard.
- UV : ultraviolet
- nm : nanomètre
- T_m : température correspondant à 50 % de la dénaturation d'un A.D.N.
- μCi : microcurie
- A.D.N.-³H (écrit par erreur ³H-A.D.N. dans le mémoire) : acide désoxyribonucléique radioactif (marqué au tritium)

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
<u>PREMIERE PARTIE - TAXONOMIE NUMERIQUE DE BACTERIES</u>	
<u>TELLURIQUES NON FERMENTANTES A GRAM NEGATIF</u>	3
<u>Introduction</u>	4
<u>Matériel et Méthodes</u>	6
1 - Collection de souches.....	6
2 - Tests utilisés pour la caractérisation des souches.....	7
3 - Analyse numérique.....	9
<u>Résultats</u>	11
1 - Résultats de l'analyse factorielle.....	11
2 - Application des résultats.....	15
<u>Discussion</u>	20
1 - Etude du Phénon 8.....	20
2 - Etude du Phénon 3.....	21
3 - Etude des Phénons 1 et 2.....	22
4 - Etude des Phénons 4, 5, 6 et 7.....	23
<u>Conclusion</u>	25
<u>DEUXIEME PARTIE - ETUDE PARTICULIERE DU PHENON 3 : CALCUL DU COEFFICIENT DE SHAPIRO-CHARGAFF</u>	26
<u>Introduction</u>	27
<u>Matériel et techniques</u>	30
1 - Souches employées et conditions de culture....	30
2 - Extraction de l'A.D.N. bactérien.....	32
3 - Calcul du coefficient de Shapiro-Chargaff.....	37
a) <i>par la technique de dénaturation thermique de l'A.D.N.</i>	37
b) <i>par la technique d'hydrolyse de l'A.D.N. et chromatographie sur papier des bases</i>	39
<u>Résultats et discussion</u>	42
1 - Courbes de dénaturation thermique et Tm.....	42
2 - Calcul des % GC à partir des Tm.....	43
3 - Calcul du % GC de l'A.D.N. de C17 à partir d'un hydrolysate chromatographié.....	50
4 - Analyse des résultats.....	52
<u>Conclusion</u>	53

TROISIEME PARTIE - ETUDE PARTICULIERE DU PHENON 3 :

<u>APPLICATION DES TECHNIQUES D'HYBRIDATION DES A.D.N...</u>	54
<u>Introduction.....</u>	55
<u>Matériel et méthodes.....</u>	58
1 - Méthodologie de l'hybridation.....	58
a) Extraction et purification des A.D.N.....	58
b) Dénaturation et immobilisation des A.D.N....	58
c) Marquage de l'A.D.N. "de référence" (C17)...	59
d) Fragmentation et dénaturation de l'A.D.N. marqué.....	60
e) Hybridation proprement dite.....	61
f) Lavages et mesure de la radioactivité.....	61
2 - Mise au point de la méthode.....	62
a) Détermination des paramètres d'action des ultrasons.....	62
b) Détermination des conditions d'incubation per- mettant l'hybridation.....	63
3 - Etude de quelques modifications apportées par d'autres techniques.....	66
a) la technique "double-filtre".....	66
b) la technique d'hybridation à "basse tempéra- ture".....	66
<u>Résultats.....</u>	68
1 - Résultats des hybridations effectuées à 71°C...	68
2 - Résultats des hybridations à "basse tempéra- ture" (62°C).....	70
<u>Discussion.....</u>	73
1 - Apports des expériences d'hybridation.....	73
2 - Analogies phénotypiques complémentaires entre la souche C17 et <i>Pseudomonas maltophilia</i>	74
<u>Conclusion.....</u>	80
C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S.....	81
B I B L I O G R A P H I E.....	85

INTRODUCTION

La flore bactérienne des sols comprend principalement, outre les Actinomycètes, un ensemble de germes que la réaction de Gram permet de répartir en deux groupes : les bactéries à Gram-positif ou variable, représentées surtout par les genres Bacillus et Arthrobacter, et les bactéries à Gram-négatif.

Les Bacillus, en raison de leur ubiquité et les Arthrobacter, en raison de leur relative homogénéité dans le sol, sont assez facilement identifiables par les méthodes de détermination habituelles.

Pour les germes à Gram-négatif, le problème est très différent car leur position taxonomique est imprécise. De ce fait, ces bactéries sont souvent à l'origine des difficultés d'interprétation propres aux spectres bactériens d'origine tellurique.

Les recherches que nous avons entreprises, concernent donc ces germes à Gram-négatif pour lesquels nous avons essayé, tout d'abord, d'établir un classement basé sur leurs caractères phénotypiques au moyen d'une méthode d'analyse numérique. Comme dans ce groupe peu d'espèces, appartenant essentiellement aux Enterobacteriaceae, fermentent les sucres, nous avons limité notre étude en ne retenant dans notre collection que les souches non fermentantes. Pour donner à nos résultats une valeur taxonomique reposant sur les critères de la nomenclature actuelle, nous avons incorporé quelques souches de référence dans notre analyse.

Enfin, pour un groupement particulier de germes mis en valeur par l'analyse numérique, nous avons recherché, pour préciser son identification, des analogies d'ordre génétique par des méthodes biochimiques : composition en bases des A.D.N. et calcul du % GC, hybridation des chaînes monocaténares d'A.D.N. provenant d'organismes différents.

PREMIERE PARTIE

TAXONOMIE NUMERIQUE DE BACTERIES TELLURIQUES

NON FERMENTANTES A GRAM NEGATIF

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

Depuis une vingtaine d'années, de nouvelles approches de la classification bactérienne se sont développées, préparant ainsi une base solide pour le développement d'une classification naturelle ; la taxonomie numérique en fait partie (COLWELL, 1973 et STALEY et COLWELL, 1973).

La taxonomie numérique est l'expression d'une classification polythétique. Disposant les individus en une hiérarchie de classes, cette science cherche à décrire l'équilibre des espèces, leurs ressemblances et aussi leurs parentés (BENZECRI, 1973). Elle est fondée sur l'analyse adansonienne, première méthode objective de classification qui considère chacun des caractères avec la même valeur et le même poids. Après avoir été appliquée une première fois par SNEATH (1957), plus de 250 travaux sont répertoriés dans ce domaine, surtout depuis que SOKAL et SNEATH (1963) ont mis au point des méthodes aboutissant à des programmes pour calculatrices électroniques. De nombreux articles ont fait le point des apports de la taxonomie numérique à la systématique bactérienne (COLWELL, 1973 - GOODMAN, 1972 - SUNDMAN, 1968 - VERON, 1969).

Un lot de bactéries non sélectionnées est étudié en fonction d'un certain nombre de caractères d'ordre morphologique, physiologique, biochimique ou autre, choisis avec minutie.

La codification des réponses données par chacune des bactéries est variable d'un utilisateur à l'autre, mais les résultats sont toujours traduits en langage binaire et représentés sous forme d'une matrice logique comportant autant de vecteurs-lignes qu'il y a d'individus et autant de vecteurs-colonnes qu'il y a de caractères.

Le plus souvent, c'est après calcul du coefficient de similitude de chaque paire de souches que des groupes "naturels" de similitude phénétique, appelés "phénons" par SNEATH et SOKAL (1962) peuvent être établis suivant des techniques mathématiques assez diverses.

En ce qui nous concerne, nous avons utilisé la méthode d'analyse factorielle des correspondances déjà appliquée par SOUMARE, LOSFELD et BLONDEAU (1973), qui a pour objet de représenter géométriquement dans un espace de faible dimension, des situations multidimensionnelles. Elle présente l'avantage de ne pas dissocier les groupements d'individus (souches bactériennes) de leurs caractères (tests) et peut ainsi aboutir à des diagrammes pour les individus seuls et pour les caractères seuls, en plus de la projection simultanée des deux.

A chaque élément (individu ou caractère) est associé un point représentatif si bien qu'un nuage de points apparaît dans un espace multidimensionnel, ce qui donne par le calcul des distances, une représentation spatiale des similitudes. Ce nuage de points est projeté sur des sous-espaces à deux dimensions et c'est le plan sur lequel la projection du nuage est la moins déformée, qui fournit le plus d'informations.

Le but de ce travail étant la mise au point d'une "clé" de détermination rapide des principales catégories de germes, tous les critères d'identification choisis sont impérativement des tests simples et rapides.

MATERIEL ET METHODES

1. COLLECTION DE SOUCHES

Les souches bactériennes nécessaires à cette étude ont été isolées à partir de huit prélèvements de terre effectués dans la région du Nord de la France et numérotés de A à H. Leur nature est variée : A et H proviennent de terres rhizosphériques (choux et betteraves); G d'une terre de jardin; B, C, E et F de terres à végétation permanente sauvage; et D d'une terre momentanément sans couverture végétale. Leur pH est voisin de 6,0 sauf pour C (pH 5,4), F (pH 4,7) et G (pH 6,7).

L'isolement des souches est effectué après étalement et incubation de suspensions-dilutions de chacune des terres sur plaques nutritives gélosées suivant une technique déjà décrite (Soumaré et Blondeau, 1972). Pour la totalité des échantillons de sols analysés, 881 souches sont ainsi étudiées (tableau 1).

TABLEAU 1
Etablissement de la collection bactérienne

Echantillons de terre	Nb de souches examinées	Souches à Gram-négatif	Souches à Gram-négatif non fermentantes
A	113	22	21
B	112	18	15
C	108	29	28
D	132	21	21
E	138	29	29
F	107	19	19
G	93	12	11
H	78	24	21
Total	881	174	165

Après examen de leur réaction à la coloration de Gram effectuée simultanément sur des cultures jeunes et âgées, toutes celles qui sont Gram-positif ou variable sont éliminées, ainsi que quelques unes proliférant très peu sur les milieux gélosés. L'utilisation de la technique de Hugh et Leifson (1953) permet

ensuite de reconnaître les souches fermentant le glucose qui sont à leur tour écartées.

Les 165 souches récupérées, après contrôle de leur pureté par la méthode des épuisements sur milieu gélosé, sont conservées, d'une part par repiquages réguliers sur milieu gélosé de Bunt et Rovira (1955), d'autre part par congélation en milieu glyceriné selon la technique de Quadling (1960).

Quelques bactéries répertoriées, provenant de la collection de l'Institut Pasteur de Paris, et appartenant à des genres bactériens assez couramment signalés dans le sol, sont ajoutées à cette collection de souches telluriques : *Pseudomonas fluorescens*, CIP 6913, codifiée PSF; *Xanthomonas vasculorum*, CIP 6373, codifiée XAV; *Flavobacterium meningosepticum*, CIP 6057, codifiée FLM; *Agrobacterium tumefaciens*, CIP 6701, codifiée AGT; et *Rhizobium trifolii*, CIP (Microb. du sol), codifiée RHT.

2. TESTS UTILISES POUR LA CARACTERISATION DES SOUCHES

Cinquante et un tests ont été sélectionnés (tableau 2). Pour tous, sauf indication contraire, les milieux de cultures utilisés sont stérilisés à 115°C; les ensemencements sont effectués à partir de cultures âgées de 48 h sur milieu liquide de Bunt et Rovira; l'incubation s'opère à 28°C.

TABLEAU 2
Tests utilisés pour la caractérisation des souches

1. Mobilité	26. Résistance à la streptomycine (25 µg/ml)
2. Production de pigments solubles fluorescents	27. Tolérance au NaCl 3% (forte)
3. Production de pigments solubles non fluorescents	28. Tolérance au NaCl 3% (faible)
4. Production de pigments insolubles	29. Tolérance au NaCl 6%
5. Absence de pigments	30. Tolérance au NaCl 10%
6. Présence d'une cytochrome oxydase	31. Croissance à 4°C
7. Présence d'une uréase	32. Croissance à 8°C
8. Présence d'une phosphatase acide	33. Croissance à 37°C
9. Présence d'une catalase	34. Résistance au lauryl sulfate de sodium
10. Présence d'une gélatinase	35. Croissance sur milieu minéral
11. Présence d'une amylase	36. Exigences en acides aminés
12. Présence d'une DNase	37. Exigences en vitamines
13. Dissolution du CaHPO ₄	38. Exigences en extrait de terre et de levure
14. Présence d'une lipase	39. Croissance sans azote
15. Oxydation du glucose (rapide)	40. Dégradation de l'arginine en anaérobiose
16. Oxydation du glucose (lente)	41. Production de céto lactose à partir de lactose
17. Oxydation du xylose	42. Réduction des nitrates en nitrites
18. Oxydation du saccharose	43. Production de SH ₂
19. Utilisation du citrate de sodium	44. Réduction du lait tournesolé
20. Utilisation de l'acétate de sodium	45. Alcalinisation du lait tournesolé
21. Utilisation du succinate de sodium	46. Acidification du lait tournesolé
22. Utilisation du benzoate de sodium (rapide)	47. Coagulation du lait tournesolé
23. Utilisation du benzoate de sodium (lente)	48. Production de NH ₄ à partir des peptones
24. Résistance à la pénicilline (100 UI/ml)	49. Production d'indole
25. Résistance au chloramphénicol (25 µg/ml)	50. Décarboxylation de la lysine
	51. Dénitrification

La mobilité est recherchée après inoculation par piqûre centrale dans un milieu nutritif gélosé à 3% et la production de pigments est notée après ensemencement du milieu de King B suivi d'une incubation à la lumière. Les pigments fluorescents sont décelés en lumière UV.

Pour la mise en évidence des activités enzymatiques la cytochrome oxydase et l'uréase sont recherchées à l'aide des papiers réactifs "Pathotec" ; la phosphatase acide avec les réactifs "Phosphatases Kit" (B.D. Mérieux) et la catalase selon la technique classique en employant l'eau oxygénée.

La gélatinase est détectée sur gélatine nutritive (Difco) après 10 jours d'incubation; l'amylase sur milieu à base d'amidon de riz après 5 jours de culture; la DNase sur gélose DNase (B.D. Mérieux) après 2 jours de culture.

Les techniques employées pour la mise en évidence de la dissolution du phosphate de calcium et de la production de lipase sont respectivement celles de Katznelson et Bose (1959) et de Sierra (1957).

L'oxydation des sucres est déterminée suivant la technique de Hugh et Leifson (1953), après 7 jours d'incubation sauf pour le glucose dont la réaction est lue après 7 jours (oxydation dite rapide) ou 10 jours (oxydation lente).

Le citrate de sodium, l'acétate, le succinate et le benzoate sont incorporés dans le milieu de Christensen. Leur utilisation est notée après 48 h d'incubation, sauf pour le benzoate qui comporte une lecture supplémentaire après 24 h (utilisation rapide).

La résistance aux antibiotiques, au chlorure de sodium et le comportement aux températures de 4, 8 et 37° C sont étudiés avec le milieu liquide de Bunt et Rovira, et les résultats sont notés après 8 jours d'incubation. Le même milieu de base est employé, mais à l'état gélosé, pour mettre en évidence la résistance au lauryl sulfate de sodium dont l'intérêt est signalé par Christensen et Cook (1972). Cette résistance est déterminée après 5 jours d'incubation en boîtes de Pétri.

Les exigences nutritionnelles (tests 35 à 38) sont étudiées avec les milieux de Lochhead et Chase (1943), mais en employant la technique des répliques de Lederberg et Lederberg (1952). Par ailleurs, un milieu liquide exempt d'azote permet la différenciation des germes fixateurs d'azote moléculaire.

Les derniers tests indiqués dans le tableau 2 sont souvent relatifs à des activités cataboliques. La dégradation de l'arginine en anaérobiose est détectée suivant la méthode de Thornley (1960) ; la production de cétolactose, suivant celle de Bernaerts et de Ley (1963), et la dénitrification, suivant celle de Stanier et coll. (1966).

Les autres tests sont d'utilisation très courante en microbiologie : la réduction des nitrates est révélée après 48 h d'incubation, la production de SH_2 est vérifiée à partir d'un milieu contenant de la cystéine, après 15 jours d'incubation et le comportement des souches sur lait tournesolé (litmus milk BBL), après 10 jours d'incubation. Enfin, la production d'ammoniaque à partir des peptones (Bacto peptone Difco) est mise en évidence avec le réactif de Nessler, celle de l'indole avec le réactif de Kovacs, et la lysine Taylor est employée pour étudier la décarboxylation.

Les résultats donnés par les tests sont notés par plus (+) ou par moins (-) selon que les réactions sont positives ou négatives. Les réponses douteuses sont vérifiées par une deuxième analyse.

3. ANALYSE NUMERIQUE

Le classement des souches en fonction de leurs affinités a été effectué au moyen de l'analyse factorielle des correspondances, selon la méthode et les programmes conçus par le laboratoire du Professeur Benzecri (I.S.U.P., Paris). Le traitement a été effectué sur un ordinateur IBM 360/25 (Département Informatique, I.U.T. Lille). Cette méthode d'analyse avait déjà été appliquée pour l'étude du spectre bactérien d'une microflore d'origine tellurique (Soumaré, Losfeld et

Blondeau, 1973) : à partir d'une matrice logique dans laquelle les réponses données par les tests sont codées par 1 (+) ou 0 (-), l'analyse des vecteurs lignes représentés par les souches bactériennes, et des vecteurs colonnes correspondant aux tests permet de calculer les distances entre chaque couple de bactéries (ces distances sont choisies de telle sorte qu'elles soient faibles pour deux souches présentant des vecteurs lignes comparables, et importantes si deux souches présentent des vecteurs lignes sans rapport). L'obtention de ces distances conduit au regroupement des bactéries en fonction de leurs affinités, par rapport aux tests qui les ont caractérisées.

RESULTATS

Le tableau 3 récapitule le nombre de réponses positives données par les 165 souches en fonction des 51 tests employés. Pour la numérotation de ces tests, les chiffres correspondent à ceux du tableau 3. Ils sont suivis d'une codification comportant quatre lettres ou chiffres, nécessaire à la programmation. Les tests 30 (tolérance au NaCl 10%) et 39 (croissance sans azote) donnant des réponses uniformément négatives, ont été éliminés de l'analyse factorielle.

TABLEAU 3
Nombre de réponses positives données par les 165 souches en fonction des 51 tests

Tests		Nombre de réponses positives	Tests		Nombre de réponses positives
N°	Abréviation		N°	Abréviation	
1	MOBI	54	27	NA3F	94
2	PISF	49	28	NA3P	108
3	PISM	13	29	NA06	5
4	PINS	30	30	NA10	0
5	PAPI	73	31	CT04	31
6	COXY	92	32	CT08	90
7	UREA	41	33	CT37	63
8	PHAC	75	34	RSLS	104
9	CATA	62	35	MG00	56
10	GELA	66	36	MGAA	95
11	PAMY	44	37	MGVI	17
12	PDNA	39	38	MGLT	17
13	DICA	19	39	MSAZ	0
14	PLIP	78	40	ARGI	53
15	GOXR	66	41	CETO	2
16	GOXL	90	42	NITR	43
17	ACXY	67	43	CSH2	3
18	ACSA	31	44	RELT	88
19	UCIT	113	45	ALLT	63
20	UACE	137	46	ACLT	9
21	USUC	131	47	COLT	4
22	UBER	103	48	PNH4	96
23	UBEL	131	49	INDO	4
24	RPEN	147	50	DELY	34
25	RCHL	114	51	DNIT	12
26	RSTR	78			

1. RESULTATS DE L'ANALYSE FACTORIELLE

Cette méthode permet l'établissement de diagrammes qui représentent les souches et les tests projetés sur divers plans déterminés par la combinaison de deux axes exprimant les affinités entre les souches en fonction des tests. Afin d'obtenir une visualisation suffisamment complète de toutes ces affinités, cinq axes ont été utilisés.

Après examen des différents diagrammes découlant de notre étude, il s'est avéré que le maximum d'informations sur la population bactérienne se traduit particulièrement dans ceux qui sont donnés par la combinaison des axes 1 et 2 (1 x 2); 1 et 3 (1 x 3) et 2 et 4 (2 x 4).

L'utilisation des résultats donnés parallèlement par une seconde analyse factorielle réalisée à partir des réponses inverses aux tests ("non tests") apporte aussi des renseignements utiles qui apparaissent dans la combinaison des axes 1 et 2 (1 x 2). Cette analyse complémentaire permet en effet de considérer les analogies entre les souches aussi bien lorsqu'elles donnent un résultat négatif qu'un résultat positif.

Deux de ces diagrammes (1 x 2 et 2 x 4) sont présentés ici (figures 1 et 2). Sur ceux-ci, afin de faciliter la lecture, seule est indiquée la distribution des bactéries, celle des tests étant de moindre intérêt.

L'examen de l'ensemble de ces diagrammes a permis de différencier huit "classes" ou "phénons". Ces groupements de souches, situés de part et d'autre de l'origine (OR) matérialisant leur centre de gravité, sont représentés dans les figures par des symboles alors que la distribution des cinq souches de référence est indiquée par l'intermédiaire de leur codification.

Ces huit phénons, dont chacun, conventionnellement représente un minimum de trois souches, regroupent 130 bactéries, c'est-à-dire 78,7 % des individus de notre collection. Deux de ces phénons sont particulièrement importants : le phénon 3 (Ph 3) rassemblant 41 souches, et le phénon 8 (Ph 8) rassemblant 52 souches, associées avec une souche de référence : *P. fluorescens* (PSF). Le pourcentage des réponses positives données par les souches classées en fonction des tests utilisés pour leur caractérisation est indiqué dans le tableau 4 ; et la répartition de celles-ci en fonction de leur origine est donnée dans le tableau 5 qui accentue l'intérêt des souches des phénons 3 et 8 présents dans toutes les terres analysées.

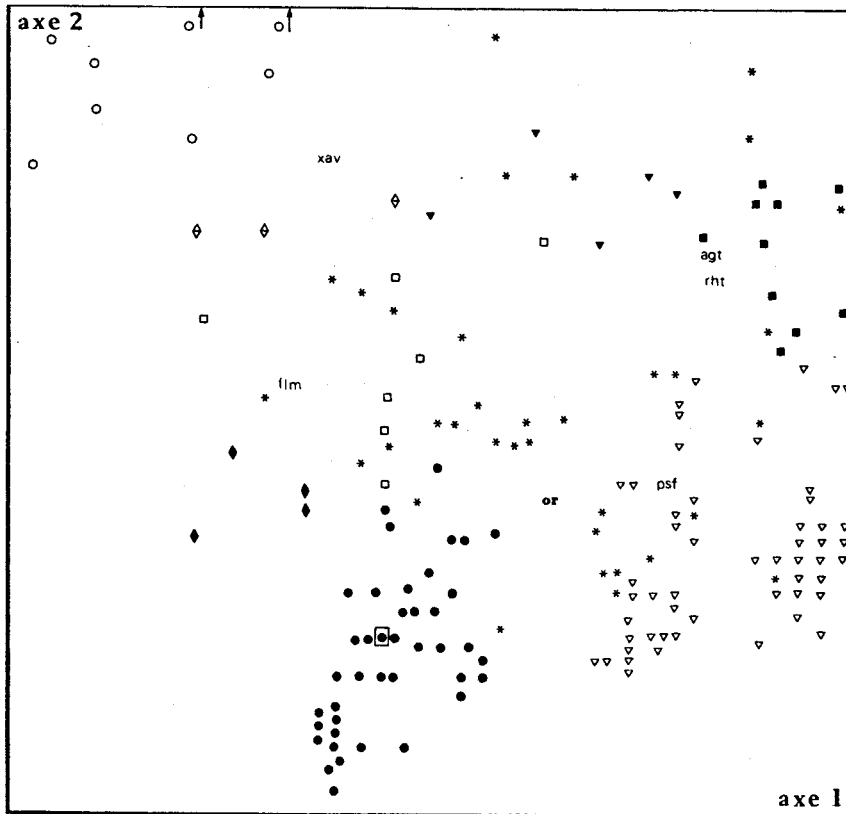


FIG. 1. Distribution des souches donnée par l'analyse factorielle (axes 1 \times 2). ■ Phénon 1, ▼ phénon 2, ● phénon 3, ○ phénon 4, ◆ phénon 5, □ phénon 6, ◇ phénon 7, ▽ phénon 8, * non classables.

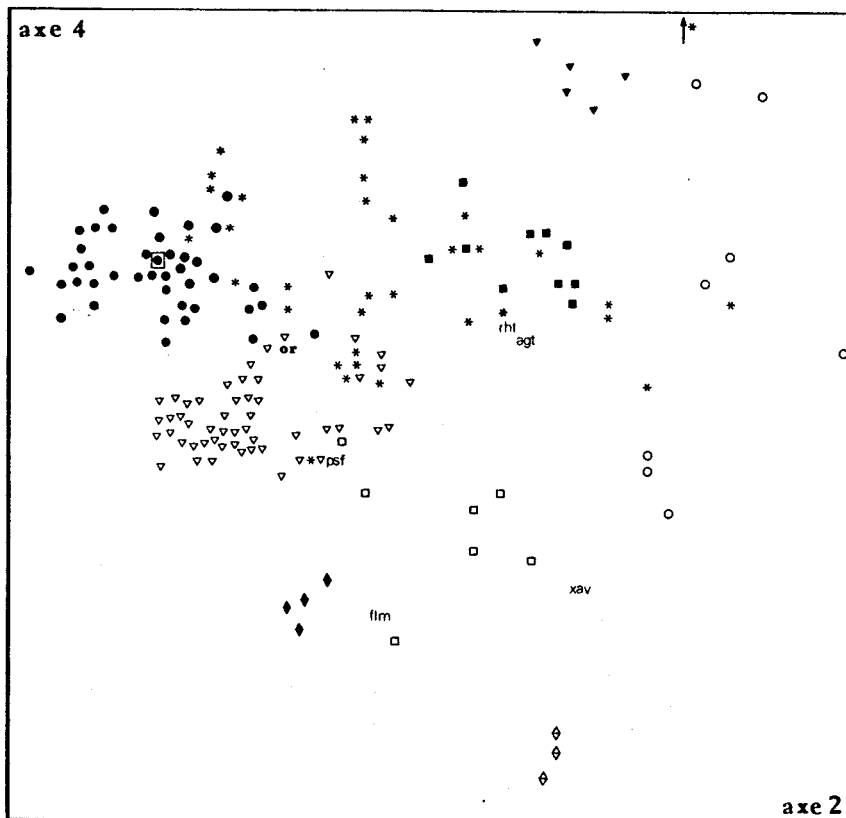


FIG. 2. Distribution des souches donnée par l'analyse factorielle (axes 2 \times 4). ■ Phénon 1, ▼ phénon 2, ● phénon 3, ○ phénon 4, ◆ phénon 5, □ phénon 6, ◇ phénon 7, ▽ phénon 8, * non classables.

TABLEAU 4a

Pourcentage de réponses positives données par les 130 souches classées en fonction des tests

Tests	Ph 1, 10 souches	Ph 2, 5 souches	Ph 3, 41 souches	Ph 4, 8 souches	Ph 5, 4 souches	Ph 6, 7 souches	Ph 7, 3 souches	Ph 8, 52 souches
1. MOBI	90	40	0	0	0	28,57	33,33	53,84
2. PISF	0	0	0	0	0	0	0	94,23
3. PISM	0	0	31,7	0	0	0	0	0
4. PINS	0	0	0	100	100	85,71	100	1,91
5. PAPI	100	100	68,3	0	0	14,28	0	1,91
6. COXY	100	80	4,87	0	100	28,57	0	100
7. UREA	50	40	0	12,5	0	28,57	0	42,30
8. PHAC	0	0	100	50	100	57,14	33,33	23,07
9. CATA	0	40	41,46	50	75	42,85	100	44,25
10. GELA	0	0	97,56	0	100	14,28	33,33	38,47
11. PAMY	10	40	7,31	100	25	57,14	100	21,15
12. PDNA	0	0	56,1	62,5	50	42,85	66,66	1,91
13. DICA	0	0	2,44	12,5	0	0	0	28,84
14. PLIP	0	20	100	75	100	71,42	100	17,30
15. GOXR	50	100	21,95	50	100	42,85	33,33	42,30
16. GOXL	60	100	29,26	50	100	71,42	33,33	71,15
17. ACXY	70	0	9,75	0	0	57,14	100	78,84
18. ACSA	70	0	14,63	12,5	0	28,57	100	13,46
19. UCIT	30	0	97,56	50	25	57,14	100	78,84
20. UACE	100	80	82,92	25	50	57,14	100	92,32
21. USUC	90	40	92,68	37,5	0	71,42	100	92,32
22. UBER	30	0	92,68	0	0	0	0	94,23
23. UBEL	90	40	100	0	0	28,57	0	100
24. RPEN	100	60	97,56	50	100	87,71	0	98,07
25. RCHL	10	0	85,36	25	100	42,85	0	92,32

TABLEAU 4b

Pourcentage de réponses positives données par les 130 souches classées en fonction des tests

Tests	Ph 1, 10 souches	Ph 2, 5 souches	Ph 3, 41 souches	Ph 4, 8 souches	Ph 5, 4 souches	Ph 6, 7 souches	Ph 7, 3 souches	Ph 8, 52 souches
26. RSTR	30	20	63,41	50	100	71,42	100	28,84
27. NA3F	0	60	95,12	37,5	100	28,57	0	65,57
28. NA3P	0	60	97,56	50	100	42,85	0	82,69
29. NAO6	0	0	2,43	0	0	14,28	0	1,91
31. CTO4	0	0	2,43	0	25	14,28	0	51,93
32. CTO8	10	20	36,58	25	50	71,42	0	92,32
33. CT37	10	60	63,41	37,5	0	28,57	100	28,84
34. RSL5	70	20	90,24	0	0	14,28	33,33	73,06
35. MGOO	90	0	0	12,5	50	57,14	100	48,76
36. MGAA	10	0	100	25	50	42,85	0	48,76
37. MGVI	40	0	2,44	12,5	0	14,28	33,33	11,42
38. MGLT	0	100	0	62,5	0	0	0	3,82
40. ARG1	0	0	0	0	0	0	0	98,07
41. CETO	0	0	0	0	0	0	0	0
42. NITR	50	20	34,14	12,5	50	0	0	13,46
43. CSH2	0	0	0	0	0	0	0	1,91
44. RELT	10	20	100	0	100	85,71	100	38,47
45. ALLT	90	80	0	0	0	0	0	61,53
46. ACLT	0	0	0	87,5	0	0	0	0
47. COLT	0	0	0	0	0	14,28	100	0
48. PNH4	0	0	75,61	0	100	14,18	33,33	100
49. INDO	0	0	0	0	100	0	0	0
50. DELY	0	20	21,95	12,5	0	14,28	0	28,84
51. DNIT	70	0	0	0	0	0	0	7,69



TABLEAU 5
Répartition des souches classées en fonction de leur origine

Phénons	Echantillons de terre							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Ph ₁ (10 souches)	1	4	1	2	—	—	1	1
Ph ₂ (5 souches)	—	—	—	4	—	—	1	—
Ph ₃ (41 souches)	10	1	15	2	2	7	2	2
Ph ₄ (8 souches)	1	1	—	1	2	—	—	3
Ph ₅ (4 souches)	—	—	—	—	—	2	—	2
Ph ₆ (7 souches)	1	—	—	1	3	—	—	2
Ph ₇ (3 souches)	1	—	—	—	2	—	—	—
Ph ₈ (52 souches)	5	9	9	3	13	6	5	2
Non classées (35 souches)	2	—	3	8	7	4	2	9
Total (165 souches)	21	15	28	21	29	19	11	21

Une autre relation entre souche de référence et phénons est à remarquer : *F. meningosepticum* (FLM) est associée au phénon 5. Cette similitude, assez peu apparente dans les diagrammes représentés dans les figures 1 et 2, est particulièrement nette dans le diagramme "non test" 1 x 2.

2. APPLICATION DES RESULTATS

Ces résultats ont ensuite été exploités afin de mettre au point une méthodologie applicable aux analyses microbiologiques du spectre bactérien des sols.

Les données du tableau 4 permettent de sélectionner les tests individualisant les phénons. Ces tests ont une valeur discriminative quand les réponses sont en majorité négatives ou positives ou mieux encore, quand elles sont totalement opposées ou presque pour les différents phénons.

Ces tests les plus significatifs, au nombre de 21, sont mentionnés dans le tableau 6. L'analyse factorielle appliquée aux 130 souches classées en ne faisant intervenir que cet ensemble restreint de 21 tests donne des résultats comparables aux précédents, c'est-à-dire que les différents phénons restent bien individualisés dans les diagrammes. La figure 3 représente l'un de ces diagrammes (1 x 2).

A la suite de ce résultat, d'autres sélections plus restreintes de tests ont été analysées (tableau 6) Pour la sélection 2, qui comporte 13 tests, nous avons éliminé d'abord tous ceux qui présentent un caractère de complémentarité, ne conser-

vant que les plus significatifs. Pour des raisons techniques, la mobilité a également été supprimée, sa lecture étant toujours très délicate, surtout pour les germes d'origine tellurique. Le test 14 (lipase) dont les réponses sont variables pour de nombreux phénons et le test 51 (dénitrification) qui n'est positif que pour un phénon sont eux aussi écartés.

Dans les sélections 3 et 4, l'élimination de trois tests réduit leur nombre à 10.

L'analyse numérique appliquée à ces sélections 2, 3 et 4 prouve que si l'utilisation de 13 tests (fig. 4) donne encore un résultat satisfaisant (sauf pour le phénon 4), les deux variantes à 10 tests ne permettent plus l'individualisation correcte des phénons : ceux-ci présentent, sur les diagrammes, soit des chevauchements entre eux, soit des hétérogénéités. Dans le cadre de cette analyse, l'utilisation de ces 13 tests apparaît donc comme une limite.

TABLEAU 6

Listes comparatives des tests composant les quatre sélections retenues

1ère sélection (21 tests)	2ième sélection (13 tests)	3ième sélection (10 tests)	4ième sélection (10 tests)
1. MOBI			
2. PISF	2. PISF	2. PISF	2. PISF
3. PISM			
4. PINS	4. PINS	4. PINS	4. PINS
5. PAPI	5. PAPI		5. PAPI
6. COXY	6. COXY	6. COXY	6. COXY
8. PHAC	8. PHAC	8. PHAC	
10. GELA	10. GELA	10. GELA	10. GELA
14. PLIP			
23. UBEL	23. UBEL	23. UBEL	
35. MGOO			
36. MGAA	36. MGAA	36. MGAA	36. MGAA
37. MGVI			
38. MGLT	38. MGLT		38. MGLT
40. ARG1	40. ARG1	40. ARG1	40. ARG1
44. RELT	44. RELT	44. RELT	44. RELT
45. ALLT			
46. ACLT			
47. COLT	47. COLT		47. COLT
48. PHN4	48. PHN4	48. PHN4	
51. DNIT			

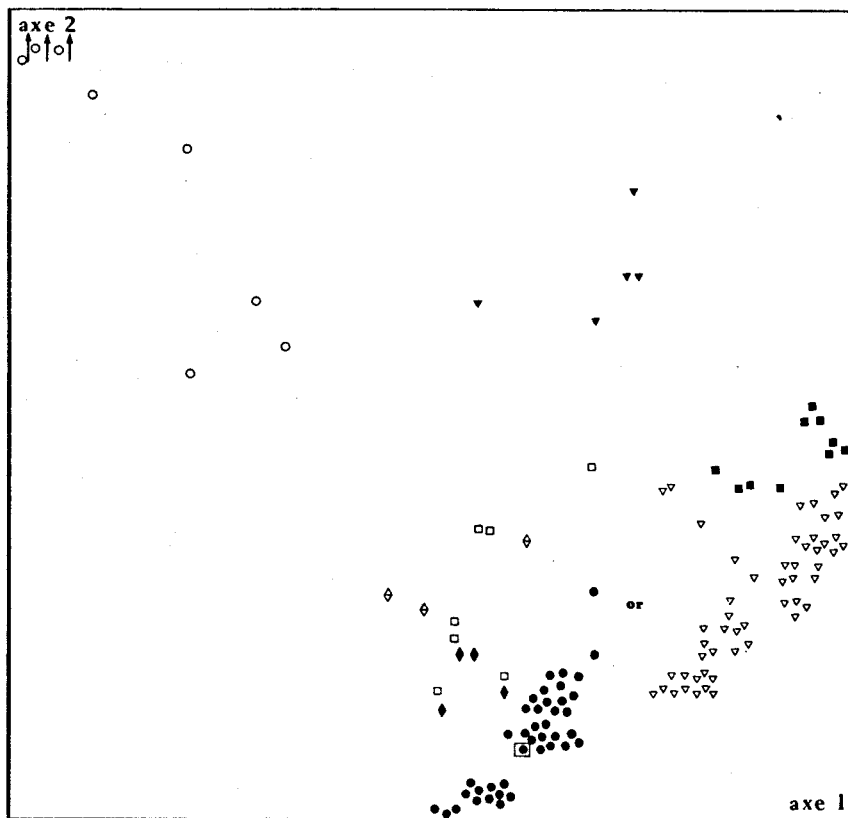


FIG. 3. Distribution des souches classées donnée par l'analyse factorielle en fonction d'une sélection de 21 tests. ■ Phénon 1, ▼ phénon 2, ● phénon 3, ○ phénon 4, ◆ phénon 5, □ phénon 6, ◇ phénon 7, ▽ phénon 8.

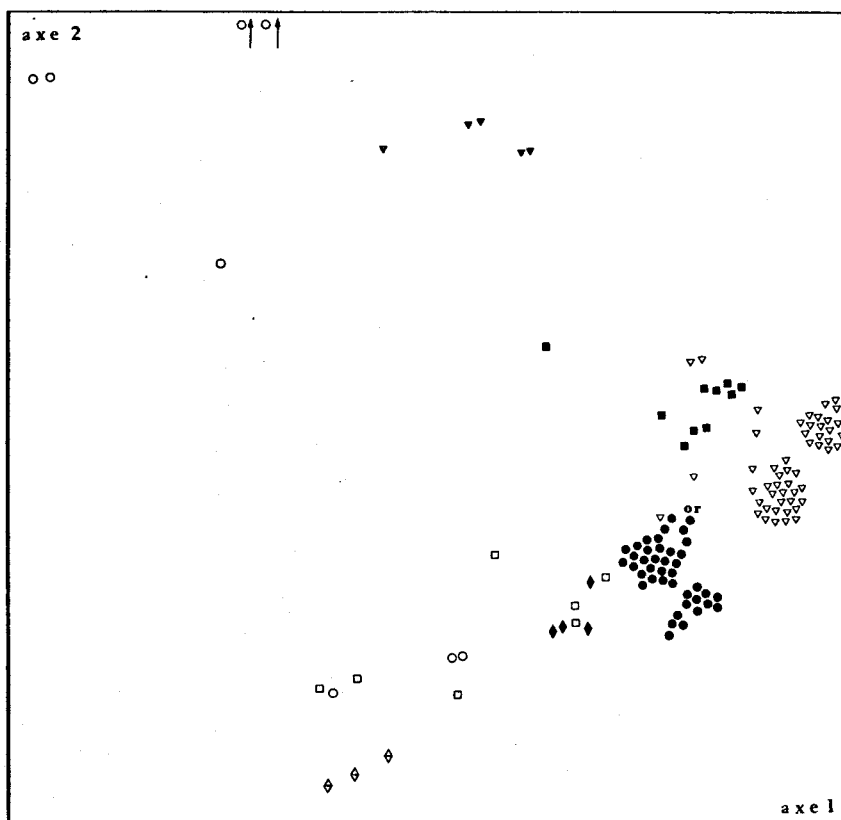


FIG. 4. Distribution des souches classées donnée par l'analyse factorielle en fonction d'une sélection de 13 tests. ■ Phénon 1, ▼ phénon 2, ● phénon 3, ○ phénon 4, ◆ phénon 5, □ phénon 6, ◇ phénon 7, ▽ phénon 8.



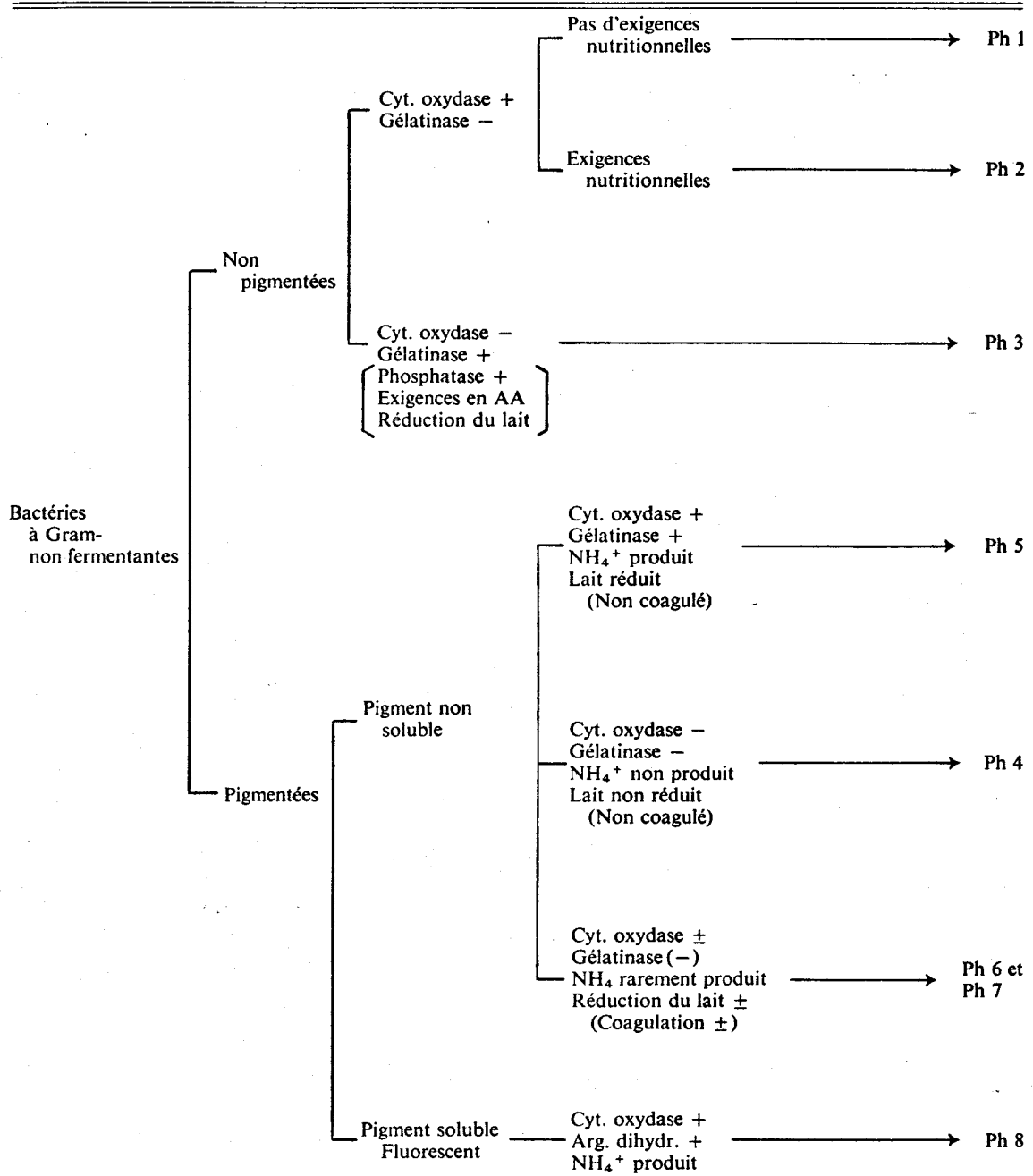
Le tableau 7 permet la comparaison des phénons en fonction de l'utilisation de ces 13 tests, et le tableau 8, en proposant l'établissement d'un ordre hiérarchique parmi ces tests facilite cette comparaison. Enfin, aucune des 35 souches initialement non classées ne peut s'insérer dans l'un des principaux phénons en appliquant l'ordre chronologique des critères de différenciation indiqués dans ce dernier tableau.

TABLEAU 7
Comparaison des différents phénons en fonction des 13 tests sélectionnés

Caractères	Ph 1	Ph 2	Ph 3	Ph 4	Ph 5	Ph 6	Ph 7	Ph 8
2. PISF	-	-	-	-	-	-	-	(+)
4. PINS	-	-	-	+	+	(+)	+	(-)
5. PAPI	+	+	±	-	-	(-)	-	(-)
6. COXY	+	(+)	(-)	-	+	(-)	-	+
8. PHAC	-	-	+	±	+	±	(-)	(-)
10. GELA	-	-	(+)	-	+	(-)	(-)	±
23. UBEL	(+)	±	+	-	-	(-)	-	+
36. MGAA	(-)	-	+	(-)	±	±	-	±
38. MGLT	-	+	-	±	-	-	-	(-)
40. ARG1	-	-	-	-	-	-	-	(+)
44. RELT	(-)	(-)	+	-	+	(+)	+	±
47. COLT	-	-	-	-	-	(-)	+	-
48. PNH4	-	-	(+)	-	+	(-)	(-)	+

NOTE: +: Toutes les souches répondent positivement.
 -: Toutes les souches répondent négativement.
 ±: Toutes les souches répondent positivement ou négativement dans des proportions approximativement égales.
 (+): La majorité des souches répondent positivement.
 (-): La majorité des souches répondent négativement.

TABLEAU 8
Individualisation chronologique des huit phénotypes suivant les indications données dans le tableau 7



DISCUSSION

Les pourcentages de bactéries à Gram-négatif présentes dans nos échantillons de terre varient de 13 à 27 % et sont comparables à ceux que d'autres types d'analyses ont déjà donnés à partir de sols de la même région géographique (Soumaré et Blondeau, 1972).

En fonction des regroupements que l'analyse factorielle nous a permis d'obtenir, il est possible d'analyser chacun des phénomènes.

1. ETUDE DU PHENON 8

Avec les 52 souches qui le constituent, c'est le phénon le plus important. Il est représenté dans chacun des échantillons de terre analysés, mais plus particulièrement dans l'échantillon E, terre à végétation permanente sauvage.

La présence d'un pigment soluble fluorescent, d'une cytochrome oxydase, d'une arginine dihydrolase, et la production d'ammoniac à partir des peptones sont les principaux critères de différenciation de ce phénon. D'autres propriétés le définissent plus en détail : l'utilisation des acides organiques et du benzoate, la résistance à la pénicilline et au chloramphénicol, la croissance à 8°C et, en général, l'oxydation du glucose et du xylose.

Ces caractéristiques, appuyées par les affinités présentées par la souche de référence *P. fluorescens*, permettent d'assimiler ce phénon 8 au genre *Pseudomonas* (Breed, Murray et Smith, 1957-Shewan et Haynes, 1967) et même au groupe "fluorescent" proposé par Stanier et coll. (1966).

Shewan et coll. (1960) et Gyllenberg et Rauramaa (1966) signalent la résistance à la pénicilline comme caractère significatif du genre *Pseudomonas*. Nos propres résultats confirment cette propriété ; mais sans donner une valeur taxonomique primordiale car les autres phénomènes donnent une réponse semblable. Remarquons aussi que la dissolution du phosphate de calcium, test caractéristique du "groupe fluorescent" d'après Ostwal et Bhide (1972), est positif pour 28,8 % des souches du phénon 8.

2. ETUDE DU PHENON 3

Si la position taxonomique du phénon précédent n'a pas posé de problèmes très particuliers, le cas des 41 souches du phénon 3 est plus délicat étant donné qu'aucune souche de référence n'y est incluse.

Ces souches présentent les caractéristiques suivantes : absence de pigment, de cytochrome oxydase et d'uréase ; immobilité ; présence d'une gélatinase, d'une phosphatase et d'une lipase ; utilisation des acides organiques et du benzoate ; résistance à la pénicilline, au chloramphénicol, au lauryl sulfate ; enfin exigence en acides aminés et réduction du lait. Remarquons au sujet de la pigmentation que le tableau 4 indique la production de pigments solubles non fluorescents pour certaines souches du phénon 3. En réalité, après un examen plus approfondi, il semble que la coloration brunâtre apparaissant dans le milieu de culture soit plutôt la conséquence d'une modification chimique de celui-ci provoquée par ces germes.

Compte tenu des caractéristiques énoncées précédemment, il est possible de comparer les souches du phénon 3 aux *Acinetobacter*, genre proposé par Brisou et Prévot (1954), modifié par Steel et Cowan (1964), rassemblant des bactéries immobiles ne possédant pas de cytochrome oxydase, de façon à les différencier des *Achromobacter*, mobiles (Brisou et Prévot, 1954) et des *Moraxella*, possédant une cytochrome oxydase (Juni 1972-Samuels, Pittman, Tatum et Cherry 1972 - Steel et Cowan 1964).

Les propriétés générales des bactéries de ce phénon présentent en effet des analogies avec la souche type *A. anitratus* (Brisou, 1957) primitivement appelée *Bacterium anitratum* Schaub et Hauber, et analysée par Hugh et Reese ainsi qu'avec les *Acinetobacter* étudiés par d'autres auteurs (Bauman, Doudoroff et Stanier, 1968 - Gilardi, 1969 et 1971 - Thornley, 1967).

Cependant certains critères les différencient : non seulement la production de nitrites décelable pour un tiers de souches, mais aussi l'activité protéolytique et surtout les

exigences nutritionnelles. La gélatinase est en effet produit par 40 souches et le besoin en acides aminés caractérise les 41 souches alors que les *Acinetobacter*, habituellement, prolifèrent sur des milieux très simples (Juni 1972, Snell et Lapage, 1973, Warskow et Juni, 1972).

Ces particularités ne permettant pas de préciser la position taxonomique exacte des souches, des recherches complémentaires devront être envisagées. De ce fait il est utile de définir une souche type, représentative du phénon. Grâce à la méthode d'analyse factorielle, cette souche est facile à désigner ; c'est celle qui doit se situer, dans les différents diagrammes, au centre des projections relatives au phénon 3. Il faut également que ses propriétés correspondent aux caractères représentatifs du phénon, dans leur totalité. C'est la souche C 17, dont le symbole sur les diagramme est encadré (figures 1 et 2) qui a été choisie. Sa fiche signalétique est résumée dans le tableau 9.

TABLEAU 9

Fiche signalétique de la souche type C17 du phénon 3

1. MOBI	-	20. UACE	+	37. MGVI	-
5. PAPI	+	21. USUC	+	38. MGLT	-
6. COXY	-	23. UBEL	+	40. ARG1	-
7. UREA	-	24. RPEN	+	41. CETO	-
8. PHAC	+	25. RCHL	+	42. NITR	+
9. CATA	+	26. RSTR	+	43. CSH2	-
10. GELA	+	27. NA3P	+	44. RELT	+
11. PAMY	-	29. NAO6	-	45. ALLT	-
12. PDNA	+	31. CTO4	-	46. ACLT	-
13. DICA	-	32. CTO8	-	47. COLT	-
14. PLIP	+	33. CT37	+	48. PNH4	+
16. GOXL	-	34. RSL5	+	49. INDO	-
17. ACXY	-	35. MGOO	-	50. DELY	-
18. ACSA	-	36. MGAA	+	51. DNIT	-
19. UCIT	+				

3. ETUDE DES PHENONS 1 et 2

Ils présentent entre eux certaines affinités et regroupent, avec le phénon 3, l'ensemble des souches non pigmentées.

Les souches du phénon 1, qui sont généralement mobiles et possèdent une cytochrome oxydase, mais pas de phosphatase ni de gélatinase et lipase, sont bien distinctes

de celles du phénon 3. En fonction des indications données dans le "Bergey's Manual" (Breed, Murray et Smith-1957) et des précisions de Hendrie et coll. (1964), elles peuvent être assimilées au genre *Achromobacter*. Le pouvoir dénitrifiant des bactéries classées dans le genre, signalé par Moore et Pickett (1960), est d'ailleurs présent chez 70 % de nos souches mais toutes sont catalase négative contrairement aux données de Hugh (1970).

Quant aux souches du phénon 2, elles ne se distinguent pratiquement de celles du phénon précédent que par leur comportement vis-à-vis des sucres (toutes oxydent le glucose, mais pas le xylose ni le saccharose) et leurs exigences nutritionnelles particulières.

4. ETUDE DES PHENONS 4, 5, 6 et 7

Au point de vue de leur importance numérique, ce sont des phénons mineurs, d'autant plus qu'ils ne sont représentés que dans certains échantillons de terre. La pigmentation leur est commune : jaune pour les phénons 5, 6 et 7, jaune ou rose pour le phénon 4.

Les relations taxonomiques de ces phénons avec les genres bactériens bien définis sont très délicates compte tenu de l'absence de nomenclature correcte et des difficultés que les recherches récentes dans ce domaine soulignent (Bean et Everton, 1969 - Gavini, 1972 - McMeekin, Stewart et Murray, 1972).

Pour le phénon 5 cependant, la présence de la souche de référence *F. meningesepticum* facilite le rattachement des souches à ce genre quoique certains tests : la production de lipase, l'utilisation du benzoate et l'action sur le lait donnent des réactions contraires. L'origine clinique de cette souche (Buttiaux et Vandepitte, 1960) peut expliquer ces différences.

Pour les autres phénons, il est très difficile de tirer des conclusions. Les phénons 6 et 7 sont peut-être assez

proches du genre *Xanthomonas*, mais *X. vasculorum* reste assez éloignée sur les diagrammes.

Enfin, en ce qui concerne les souches non classées, elles sont représentées, sur les diagrammes, dans une zone proche de l'origine (OR) pour la plupart, ce qui permet de penser qu'elles correspondent à des intermédiaires entre les phénons établis. Remarquons aussi que *A. tumefaciens* et *R. trifolii* ne sont incluses dans aucun phénon. Leur densité dans les sols est probablement très dépendante de la nature de la végétation.

C O N C L U S I O N

Cette étude a montré que parmi les bactéries à Gram-négatif ne fermentant pas les sucres, deux groupements dominant dans le sol : d'une part les Pseudomonas de type fluorescent dont on a souvent signalé la présence dans ce lieu, et d'autre part des germes présentant des affinités phénotypiques avec les Acinetobacter, habituellement trouvés dans les analyses alimentaires ou médicales.

En ce qui concerne les bactéries pigmentées à pigment non soluble, l'analyse numérique ne permet pas de conclure étant donné que celles-ci ne représentent que 17 % des souches classées. Il conviendrait donc, pour cette seule catégorie de germes telluriques, d'entreprendre une nouvelle analyse numérique à partir d'une collection plus importante de germes.

Notre intérêt se porte en priorité sur le groupement non identifié : le phénon 3, dont nous avons défini une souche-type, représentative de l'ensemble de ce phénon. Le calcul du coefficient de Shapiro-Chargaff nous permettra de préciser éventuellement la parenté de ces germes particuliers avec les Acinetobacter (Pinter et de Ley, 1969) ou de les rattacher à un autre groupement bactérien.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE PARTICULIERE DU PHENON 3 :

CALCUL DU COEFFICIENT DE SHAPIRO - CHARGAFF

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

Les caractéristiques des A.D.N. bactériens fournissent généralement une aide précieuse pour les taxonomistes, tout au moins quand elles sont associées aux descriptions morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Depuis les travaux de CHARGAFF et coll. en 1955 portant sur un grand nombre d'A.D.N. d'origines différentes, on sait en effet que certains rapports entre les bases, tels que $\frac{A}{T}, \frac{G}{C}$, sont constants alors que d'autres comme $\frac{A + T}{G + C}$ varient avec les ADN (A = adénine, T = thymine, G = guanine, C = cytosine). Ce rapport, appelé coefficient de SHAPIRO-CHARGAFF, peut aussi s'exprimer en nombre de molécules de guanine + cytosine pour 100 molécules d'ADN. (GC %).

Par la suite, d'autres chercheurs répertoriés par JONES ET SNEATH en 1970, ont discuté la signification taxonomique de ce coefficient et actuellement on est assuré qu'il a une valeur caractéristique de l'espèce. Ce sont les différences entre les % GC qui sont les plus significatives, puisqu'elles indiquent des différences génomiques importantes. Par contre des % GC voisins ne traduisent pas à priori des génomes proches (DE LEY, 1969). Aussi le coefficient de SHAPIRO-CHARGAFF ne peut-il que compléter une étude taxonomique et parfois des études plus fines sont nécessaires pour mettre en évidence la parenté ou la dissemblance dans les séquences de deux ADN.

L'utilisation du coefficient de SHAPIRO-CHARGAFF présente pour nous un intérêt dans la mesure où les caractéristiques phénotypiques sont insuffisantes pour permettre d'affirmer la parenté du phénon 3 avec un genre, voire même, une espèce bactérienne connue.

Ce coefficient exprime une composition nucléotidique qui peut être déterminée indirectement ou directement par l'hydrolyse de l'A.D.N. suivie d'une chromatographie des bases, technique employée, par exemple, par ROMOND (1965). Une analyse chimique permet une précision d'environ 0,5 % sur les % GC (QUETIER, 1970). Les méthodes indirectes les plus employées sont basées sur :

- l'ultracentrifugation en gradient de densité CsCl (SCHILDKRAUT et coll. 1962)
- l'analyse spectrale (HIRSCHMAN et coll. 1966)
- la dénaturation thermique (MARMUR et DOTY, 1962)

Signalons également d'autres méthodes moins communément utilisées :

- la dénaturation alcaline (FREDERICQ et coll. 1961)
- la détermination spectroscopique du pourcentage relatif de l'adénine réagissant vis-à-vis d'agents brominants (WANG et coll. 1964)

Ne disposant pas d'ultracentrifugeuse analytique, nous avons éliminé la première méthode bien qu'elle présente de nombreux intérêts, car l'A.D.N. étudié ne nécessite pas une grande pureté et de petites quantités suffisent ; de plus cette technique permet de déceler d'éventuels ADN satellites.

Pour l'analyse spectrale, une purification de l'ADN au phénol est indispensable.

Nous avons choisi la dénaturation thermique, méthode bien connue pour laquelle l'extraction de l'ADN selon le procédé MARMUR (1961) -sans phénol- donne des résultats convenables. Elle consiste à chauffer progressivement l'A.D.N. en solution jusqu'à rupture des ponts hydrogène reliant les bases, la molécule d'A.D.N. se scindant en deux chaînes monohélicoïdales.

Les acides nucléiques en solution dans un tampon de pH 7 absorbent fortement les rayons U.V. de 230 à 290 nm du fait de la structure cyclique des molécules et des doubles liaisons conjuguées des bases. Précisons que le maximum d'absorbance se situe vers 258-260 nm, le minimum à 230 nm et la

densité optique est pratiquement nulle à 300 nm. Lorsque l'A.D.N. est dénaturé, son absorbance à 260 nm augmente jusqu'à environ 40 % par rapport à celle de l'A.D.N. natif (HILL, 1968). Or, la température provoquant la dénaturation est fonction de la composition en bases de l'A.D.N. et de la force ionique du solvant dans lequel il est dissous ; si bien qu'on peut en déduire le % GC de l'A.D.N. considéré.

MATERIEL ET TECHNIQUES

1. SOUCHES EMPLOYEES ET CONDITIONS DE CULTURE

Les souches du phénon 3 ont été repiquées systématiquement sur milieu gélosé à l'extrait de levure (Difco) réparti en tubes inclinés en respectant un délai d'environ 2 mois entre chaque repiquage. Compte tenu de son intérêt mentionné dans le chapitre précédent, c'est la souche C₁₇ qui est soumise en priorité aux analyses. Cependant, quelques autres souches de ce phénon ont aussi été étudiées et ont été choisies de façon à ce que, d'une part elles soient différentes de C₁₇ et d'autre part, elles aient entre elles au moins un des 49 caractères phénotypiques différent.

Particularités des souches utilisées par rapport à C₁₇ :

- A₃ : PISM+ ; CATA- ; CT37-
- A₄ : COXY+ ; PNH₄- ; NITR- ; PDNA- ; GOXL+
- B₁₁ : NITR- ; CT37-
- C₂₈ : PISM+ ; CATA-
- D₁₁ : COXY+ ; PNH₄- ; NITR- ; CATA- ; PDNA- ; GELA-
- F₂₈ : GOXL+
- G₉ : DELY+ ; NITR- ; CATA- ; PDNA- ; GOXL+

et enfin C₂₀ comme exemple de souche dont tous les caractères sont identiques à C₁₇.

Quatre souches de référence ont aussi été ajoutées :

- Bacterium anitratum, ATCC 19.606, codifiée B.A.S.
- Xanthomonas vasculorum, CIP 6372, " X.A.V.
- Agrobacterium rhizogenes, ATCC 13.332, " A.G.R.
- Pseudomonas maltophilia, ATCC 13.637, " P.S.M.

Afin d'obtenir un meilleur rendement en A.D.N. final pour ces souches, à partir d'un milieu minéral de base (MMB) nous avons étudié l'influence de diverses sources de carbone et d'énergie sur la croissance bactérienne.

Ces expériences ont été entreprises en employant comme bactérie la souche C₁₇ et le milieu de OWENS et KEDDIE comme MMB, dont la composition est la suivante :

- (NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g	
- K ₂ HPO ₄	1,04 g	
- KH ₂ PO ₄	0,75 g	
- CaCl ₂	0,025 g	
- MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g	
- NaCl	0,1 g	
- Traces de métaux :		
E.D.T.A.	5 g/l)
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	2,2 g/l)
MnSO ₄ , 7H ₂ O	0,57 g/l)
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g/l)
CaCl ₂ , 6H ₂ O	0,161 g/l)
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,157 g/l)
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,151 g/l)
H ₂ O distillée	1000 ml)
pH ajusté à 6 avec KOH)
- H ₂ O distillée	1000 ml	

3 ml

Ce milieu liquide, dont le pH est ajusté à 6,8, est autoclavé pendant 20 mn à 120°C, après avoir été réparti. Nous l'avons complété de 4 manières différentes :

- milieu A : MMB
 - + Glucose (R.A.L.) 4 g/l
 - + Extrait de levure (Difco) 4 g/l
- Milieu B : MMB
 - + Glucose (R.A.L.) 4 g/l
 - + Casaminoacides sans vitamines (Difco)... 4 g/l
- Milieu C : MMB
 - + acétate de sodium trihydraté (Prolabo).. 4 g/l
 - + extrait de levure (Difco) 4 g/l
- Milieu D : MMB
 - + acétate de sodium trihydraté (Prolabo).. 4 g/l
 - + casaminoacides sans vitamines (Difco)... 4 g/l

Ces substances complémentaires sont introduites séparément dans le milieu minéral de base (MMB) stérile après un autoclavage à 110°C pendant 20 minutes. L'acétate de sodium trihydraté est préconisé pour la croissance des Acinetobacter par WARSKOW et JUNI (1972) et BAUMAN et coll. (1968).

Pour préparer les inoculums, on utilise des erlens contenant 100 ml de chaque milieu liquide complet, ensemencé à partir d'une culture jeune entretenue sur milieu gélosé. Après 24 heures d'incubation à 28°C, les inoculums permettent l'ensemencement des milieux de culture qui sont répartis dans des ballons contenant 1 l de milieu. Pendant l'incubation qui se déroule à 28°C sur table d'agitation, nous relevons les densités optiques après 19 h., 27 h. et 54 h.

Les résultats obtenus indiquent que le milieu B donne les meilleurs rendements dès 19 h. de culture. C'est donc le glucose et les casaminoacides qui sont retenus pour compléter le MMB.

2. EXTRACTION DE L'A.D.N. BACTERIEN

La technique de MARMUR (1961) a été utilisée avec quelques petites modifications nécessitées par des difficultés rencontrées avec nos souches.

A partir d'un inoculum de 100 ml de milieu B, chaque souche analysée est incubée dans 3 l du même milieu dans des ballons agités pendant 19 h à 28°C.

Cette culture est ensuite centrifugée pendant 20 mn. (centrifugeuse I.E.C. -modèle PR 6000- 4000 tours/mn. - température \approx 10°C). Le culot bactérien, repris et lavé en le mettant en suspension dans une solution saline - E.D.T.A. de pH8 (NaCl 0,15 M et E.D.T.A. 0,01 M) - à raison de 50 ml pour 2 à 3 g. de culot, est à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Les cellules lavées, remises en suspension dans cette même solution saline - E.D.T.A. dans les proportions de 25 ml. pour 2 à 3 g. de cellules, sont ensuite lysées par 2 ml de laurylsulfate de sodium à 25 % qu'on laisse agir pendant 10 mn au bain-marie à 60°C.

Lorsque la suspension est revenue à la température du laboratoire, 5 ml de perchlorate de sodium 5 M y sont ajoutés.

Une première déprotéinisation est alors effectuée en agitant fermement le tout avec un volume égal d'un mélange de chloroforme et d'alcool iso-amylque (24 v./1 v.) pendant 15 mn au moins. L'émulsion est ensuite centrifugée (centrifugeuse Sorvall - 10400 g - durée 10 mn. - température $\approx 5^{\circ}\text{C}$). La phase supérieure aqueuse est reprise. On y verse doucement l'équivalent de 2 volumes d'éthanol 95° froid et on obtient la précipitation des acides nucléiques. Ils sont prélevés par enroulement sur une baguette de verre et dispersés délicatement dans une solution saline-citrate diluée (SSC x 0,1) de pH 7 obtenue à partir d'une solution saline citrate standard (SSC) de pH $7 \pm 0,2$ (NaCl 0,15 M et citrate de sodium 0,015 M). La solution est alors ajustée approximativement à la concentration de SSC standard en ajoutant de la SSC x 10. Il faut remarquer que toutes ces solutions-tampons sont préparées extemporanément avec de l'eau bidistillée.

Trois à quatre déprotéinisations (centrifugeuse Sorvall - 7700 g - 15 mn - $\approx 5^{\circ}\text{C}$) sont nécessaires pour éliminer la presque totalité des protéines localisées à l'interphase après chaque centrifugation. Les acides nucléiques du dernier surnageant sont précipités par 2 volumes d'éthanol 95° et dispersés comme précédemment dans une SSC dont la quantité correspond à 0,5 ou 0,75 du volume du surnageant.

Sur cette solution d'acides nucléiques, nous laissons ensuite agir de la ribonucléase bovine (Miles-Seravac) à une concentration finale de 50 $\mu\text{g}/\text{ml.}$, le tout étant placé dans un bain-marie à 37°C pendant 30 mn. Cette RNase est préparée en solution à 0,2 % dans NaCl 0,15 M de pH 5 préalablement chauffée à 80°C pendant 10 mn. pour éliminer la DNase éventuellement présente.

Selon la quantité de protéines localisées au niveau de l'interphase lors de la déprotéinisation qui suit, il peut être nécessaire de renouveler la déprotéinisation avant de faire agir de la protéase (Sigma) à 0,2 %, traitée au préalable au bain-

marie à 37°C pendant 2 h comme le préconisent de nombreux auteurs (en particulier GILLESPIE et SPIEGELMAN, 1965 et DE LEY, 1970). Cette protéase est ajoutée au surnageant pipeté à une concentration finale de 50 µg/ml et agit 2 h au bain-marie à 37°C.

Cette opération est encore suivie d'une déprotéinisation au moins jusqu'à disparition des protéines au niveau de l'interphase.

L'A.D.N. est précipité par l'éthanol 95° et dissous dans une solution d'acétate de sodium 3 M d'un volume "v" variant selon le rendement. En ajoutant goutte à goutte "0,54v." au moins d'isopropanol à la surface de cette solution, les fibres d'A.D.N. sont doucement enroulées sur une baguette de verre. Elles sont alors délicatement lavées dans une solution d'acétate de sodium 3 M où est ajouté progressivement de l'éthanol froid.

L'A.D.N. étant plus facilement soluble dans une solution de faible force ionique, il est dissous dans une SSC x 0,1 ; laquelle est ajustée ensuite à la concentration de la SSC standard car la conservation est meilleure quand la force ionique est plus forte.

Cet A.D.N. bactérien en solution est stocké en présence de quelques gouttes de chloroforme à une température de 4°C, cet antiseptique n'interférant pas sur l'absorption des U.V.

- Rendement en A.D.N.

Généralement, pour 24 à 30 g. de culot bactérien initial obtenu à partir de 3 l de culture, nous parvenons à extraire 15 à 50 mg d'A.D.N., cette marge pouvant s'expliquer par le fait qu'un nombre élevé de déprotéinisations entraîne des pertes d'A.D.N. au cours de l'extraction. Selon MARMUR (1961) 1 à 2 mg. d'A.D.N. est généralement obtenu pour 1 g de cellules mais on considère que 1 à 4 mg pour 2 à 3 g de bactéries est un bon rendement (HILL, 1968).

La quantité d'A.D.N. ainsi extrait est calculée approximativement en comparant son absorbance à 260 nm. à

celles de solutions d'A.D.N. de thymus de veau lyophilisé (Sigma) de concentrations croissantes dans le même tampon, qui donne une "gamme-étalon" (graphique 1);

- Pureté de l'A.D.N.

Pour vérifier la pureté de l'A.D.N. bactérien, nous calculons toujours les pourcentages d'absorption de celui-ci à 260-230 et 280 nm qui sont respectivement et théoriquement de 1 - 0,45 et 0,515 selon MARMUR (1961). Plus le dernier pourcentage est élevé, plus l'A.D.N. contient de protéines qui absorbent les U.V. à 280 nm.

- Efficacité de la RNase

Comme une contamination de l'A.D.N. par de l'A.R.N. incomplètement hydrolysé était possible, l'efficacité de l'action de la RNase a été contrôlée. Pour cela, nous avons d'abord rejeté la méthode classique à l'orcinol de DISCHE (1953) car elle n'est pas suffisamment précise, l'orcinol ne réagissant pas spécifiquement sur l'A.R.N. Quant à la technique de SAVITSKY et STAND (1965), certainement plus valable, elle demande des concentrations relativement élevées d'A.D.N.

Pour ce contrôle de l'efficacité de la RNase, nous employons un milieu de culture contenant de l'uridine-¹⁴C à une molarité de 10⁻⁶M, c'est-à-dire voisine de celle conseillée par PALLERONI et Coll. (1973). Après extraction, une mesure de radioactivité par scintillation est effectuée :

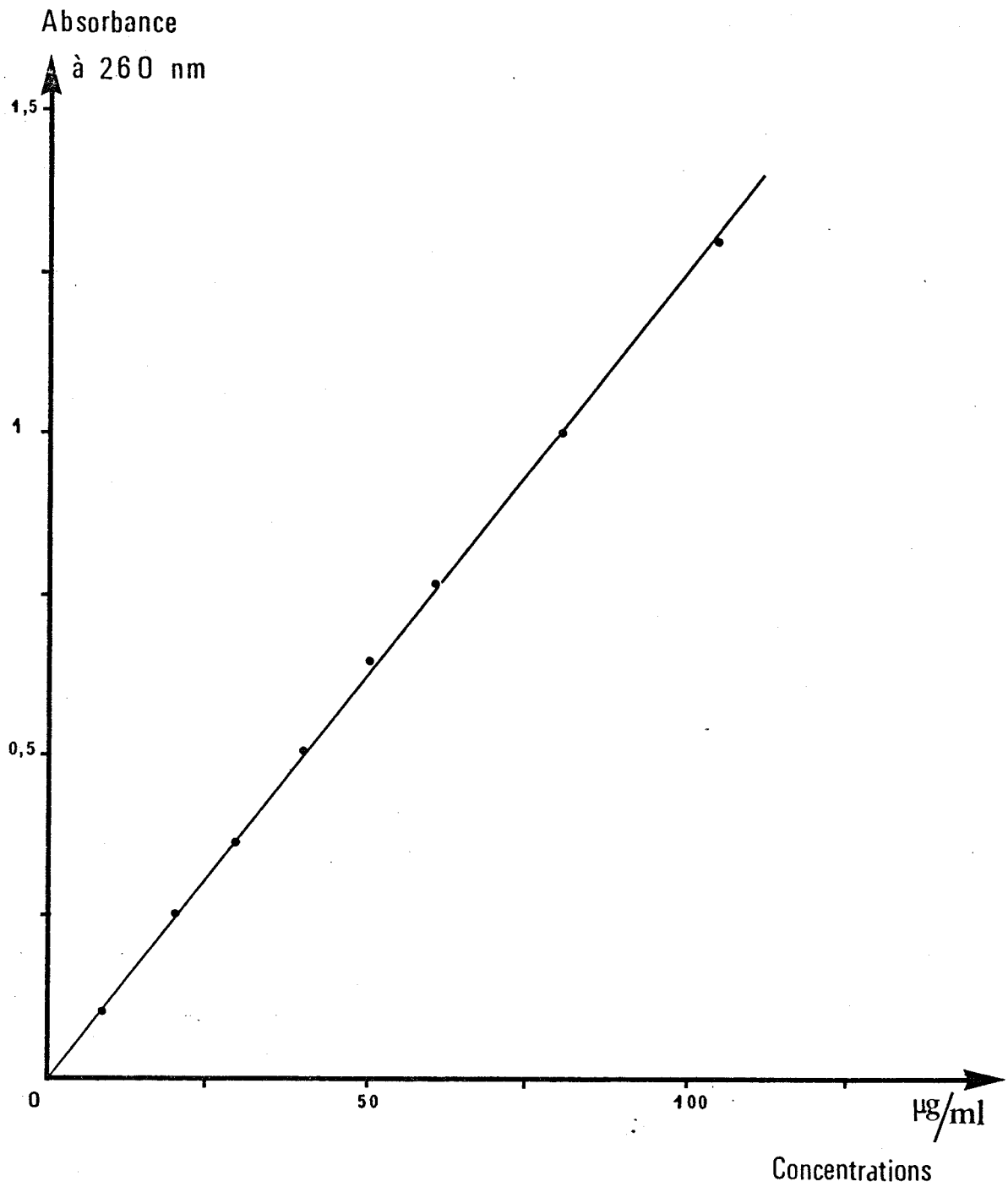
- d'une part avec une solution d'acides nucléiques sur laquelle n'a pas agi la RNase

- d'autre part avec deux solutions d'A.D.N. obtenues, l'une après action de la RNase à la concentration préconisée par MARMUR, et l'autre en utilisant une concentration double.

Les pourcentages respectifs de la radioactivité obtenue dans chacun des 3 cas se résument ci-dessous :

[RNase]	= 0.....	100%	de radioactivité
[RNase]	= 50 µg/ml.....	19%	de radioactivité
[RNase]	= 100 µg/ml.....	9%	de radioactivité

Ces résultats permettent de penser que la RNase employée est



GRAPHIQUE 1



Absorbance à 260 nm de solutions d'A.D.N. lyophilisé de thymus de veau en fonction de leurs concentrations dans la SSC standard.

efficace et l'est d'autant plus que la concentration utilisée est supérieure à celle qu' a préconisée MARMUR.

3. CALCUL DU COEFFICIENT DE SHAPIRO-CHARGAFF :

a) par la technique de dénaturation thermique de l'A.D.N.

Pour calculer le pourcentage du contenu cytosine + guanine de l'A.D.N. bactérien, nous avons principalement appliqué la technique basée sur la dénaturation thermique de l'A.D.N. mise au point par MARMUR et DOTY (1962).

Elle nécessite un matériel assez complexe, mais présente l'avantage d'être rapide et fiable étant donné les multiples mises à l'épreuve que nous avons constatées depuis quelque temps.

Rappelons qu'elle est basée sur le fait que la température de dénaturation thermique de l'A.D.N. varie en fonction de sa composition relative en bases azotées. Quand l'A.D.N. en solution est chauffé progressivement, son absorbance à 260 nm subit une importante augmentation à température donnée ou "température de fusion" qui provoque sa dénaturation : sa structure en doubles chaînes se transforme en une structure en chaînes uniques libres. La température correspondant aux 50 % de l'hyperchromicité totale relevée est appelée le T_m . Il est linéairement proportionnel à la quantité de guanine + cytosine de l'A.D.N., c'est-à-dire que plus le contenu en G + C est élevé, plus la stabilité thermique est grande (MARMUR et DOTY, 1959).

Le solvant de l'A.D.N. préconisé par MARMUR et DOTY est la SSC standard dans laquelle il est conservé. La concentration utilisée est voisine de 50 $\mu\text{g/ml}$.

Pour chaque souche dont le T_m est à déterminer les manipulations sont toujours identiques.

- appareillage (schéma ci-contre).

L'échantillon d'A.D.N. est versé dans une cuve en quartz de 3 ml fermée par un bouchon émeri, qui est placée dans le porte-cuves d'un spectrophotomètre (Unicam SP 800) à côté d'une cuve contenant uniquement le tampon qui sert de blanc. Notons pourtant que KRIEG et LOCKARDT (1970) remplacent ce blanc par une solution

de guanosine dissoute dans SSC à une concentration telle que son absorbance soit identique à celle de l'échantillon d'A.D.N. afin de corriger tout changement dans l'absorbance due à l'expansion thermique.

Dans le porte-cuves circule de l'eau provenant d'un bain-marie dont la température est commandée par l'intermédiaire d'un programmeur (Maton). Une micro-sonde disposée dans une cuve témoin annexe renfermant du tampon, permet le contrôle de la linéarité de l'augmentation de la température de l'eau qui est enregistrée (enregistreur LKB, type 6520-4) et qui correspond donc à la température de l'intérieur des cuves.

Par ailleurs, un thermomètre plongeant dans le bain-marie permet de vérifier éventuellement l'écart de température existant entre celui-ci et les cuves, écart dû aux déperditions de chaleur des tuyaux de raccordement entre le bain-marie et le porte-cuves. Cette différence varie entre 0° et 2°C.

Ce dispositif permet ainsi de faire croître linéairement la température. Généralement nous programmons une première progression de température entre l'ambiance et 45°C à raison de 99°C/heure et ensuite nous modifions le programme de façon à passer de 45°C à 95°C sur un rythme de 24°C/heure (cette augmentation de la température d'abord rapide, puis lente est utilisée par BOWIE et COLL. 1972).

La longueur d'onde du spectrophotomètre est réglée au temps 0 sur 260 nm et les variations d'absorbance sont enregistrées sur un second enregistreur (LEEDS et NORTHROP) relié au spectrophotomètre par un dispositif permettant une expansion d'échelle qui facilite la lecture des écarts de densités optiques.

Après dénaturation thermique de l'A.D.N., l'enregistrement de la température est superposé à celui de l'absorbance et le T_m est déterminé.

- calcul

La détermination du % GC d'un A.D.N. dénaturé dans la SSC standard se déduit du T_m par la relation de MARMUR et DOTY (1962) qui est tout à fait linéaire pour des % GC de 30 à 70 % (HILL 1968)

$$T_m = 69,3 + 0,41 (\% \text{ GC})$$

Si le T_m est supérieur à 90°C, il est possible d'em-

ployer des tampons de force ionique plus faible pour dissoudre l'A.D.N., car la valeur du T_m est proportionnelle à la force ionique de la solution (MARMUR et DOTY, 1962).

BOHACEK et coll. (1967) ont ainsi employé le tampon phosphate-E.D.T.A. pour dénaturer l'A.D.N. et ils donnent la relation suivante permettant de calculer le % GC.

$$T_m = 51 + 0,45 (\% \text{ GC})$$

Il est encore possible de dénaturer l'A.D.N. dans une SSC diluée, telle que SSC x 0,1 préconisée par BOWIE et coll (1972), qui utilisent la formule de DELEY (1970), corrigée par MANDEL et coll. (1970) :

$$T_m = 53,07 + 0,41 (\% \text{ GC})$$

Ces auteurs soulignent que l'exactitude de cette détermination du % GC a été discutée par GASSER et MANDEL (1968), DE LEY (1970) et MANDEL et coll. (1970). La formule de MARMUR et DOTY (1962) permettant de convertir le T_m en % GC est généralement adoptée pour des déterminations faites dans SSC, mais des facteurs de correction doivent être appliqués aux échantillons d'A.D.N. à T_m élevé nécessitant un tampon de force ionique plus faible (MANDEL et coll., 1970). HILL (1968) cite l'équation à 3 variables de SchildKraut et Leifson montrant que le T_m est lié au log de la force ionique de la solution.

SKYRING et QUADLING (1970) dissolvent l'A.D.N. de certaines de leurs souches d'Arthrobacter à T_m élevé dans SSC x 0,5, mais ne signalent pas l'équation qui convertit le T_m en % GC.

Ces incertitudes relatives aux conversions de T_m n'ont pas été approfondies, étant donné que notre principal objectif consiste à examiner des valeurs relatives de % GC d'A.D.N. de souches différentes, afin de mettre en évidence leur éventuelle parenté.

b) par la technique d'hydrolyse de l'A.D.N. et chromatographie sur papier des bases.

Afin de ne pas nous référer uniquement à cette précédente méthode d'analyse rapide, nous avons utilisé pour l'A.D.N.

de la souche type, à titre de contrôle, une technique différente employée par ROMOND (1965) pour l'étude des Streptocoques.

Elle consiste en une hydrolyse de l'A.D.N., suivie d'une séparation chromatographique des bases et d'une estimation quantitative par spectrophotométrie.

Recueilli dans un tube à centrifuger à fond conique préalablement taré, l'A.D.N. est desséché en le passant successivement dans de l'alcool à 70°, 95°, absolu et enfin dans de l'éther où il séjourne au bain-marie à 60°C pendant une heure.

Il est hydrolysé par de l'acide perchlorique à 65 % à raison d'un volume inférieur à 15 μ l/mg de poids sec, sous pression atmosphérique, pendant une heure au bain-marie bouillant, la partie conique du tube étant fermée par une tige de verre.

Un volume égal de KOH 10 N est ensuite ajouté à l'hydrolysate. Il se produit un précipité de perchlorate de potassium qui est éliminé par centrifugation. Le surnageant, recueilli à l'aide d'une pipette Pasteur, est conservé au réfrigérateur.

La séparation des différentes bases est effectuée par chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 1. Le solvant utilisé est celui de Wyatt dont les proportions convenant à une température de 25°C maintenue constante dans la pièce à chromatographie, sont les suivantes :

Alcool isopropylique	600 ml
HCl 11 N	180 ml
H ₂ O bidistillé ^e	220 ml

L'A.D.N. à analyser est déposé par "taches" de 15, 20 et 30 μ l. alternant avec des "taches" des 4 bases de référence (10 et 20 μ l) préparées à une concentration de 1 mg/ml. Précisons que la dissolution s'effectue dans l'eau distillée pour la thymine, la cytosine et l'adénine, après chauffage pour cette dernière. La guanine se solubilise dans le solvant de Wyatt.

Le temps de migration est de 48 heures. Les chromatogrammes sont mis à sécher pendant 36 heures, sous hotte à l'abri de la poussière. Ils sont ensuite révélés par les U.V. Les 4 bases des A.D.N. de la souche - type C₁₇ sont identifiées grâce aux témoins. Les Rf sont :

Guanine : 0,22 - Adénine = 0,32
Cytosine : 0,44 - Thymine = 0,76.

Chaque tache découpée est placée dans un tube contenant 5 ml d'HCl N pendant 12 heures au bain-marie à 37°C.

10

Les dosages des bases sont ensuite effectués par spectrophotométrie en U.V. (spectrophotomètre S-67 LERES). Leur densité optique est mesurée d'une part à la longueur d'onde correspondant à leur absorbance maximum et d'autre part à une longueur d'onde de référence : 290 nm.

La différence entre ces 2 valeurs, diminuée de la différence déterminée pour le blanc correspondant à chaque base, donne la "densité optique corrigée" de la substance. En divisant cette valeur par un coefficient spécifique à la base considérée donné par Lee (thèse de ROMOND, 1965), la proportion de base contenue dans une tache donnée peut être calculée, ce qui permet de connaître les rapports $\frac{A}{T}$, $\frac{G}{C}$, $\frac{A+T}{G+C}$ et enfin le % GC de

l'A.D.N. considéré.

RESULTATS ET DISCUSSION

1) COURBES DE DENATURATION THERMIQUE ET T_m

Dans un premier temps, la dénaturation thermique est effectuée selon la méthode la plus courante, c'est-à-dire sur des échantillons d'A.D.N. en solution dans la SSC standard.

Sont soumis à l'analyse :

- les A.D.N. de quelques souches du phénon 3 - y compris de la souche-type C₁₇ - dont le critère du choix a été précisé antérieurement. De plus elles représentent des exemples bien dispersés dans le nuage de points correspondant au phénon 3 (figure 5).

- l'A.D.N. d'une souche de collection : Bacterium anitratum et l'A.D.N. de thymus de veau (Sigma) dont les T_m respectifs sont bien définis en fonction de ce tampon.

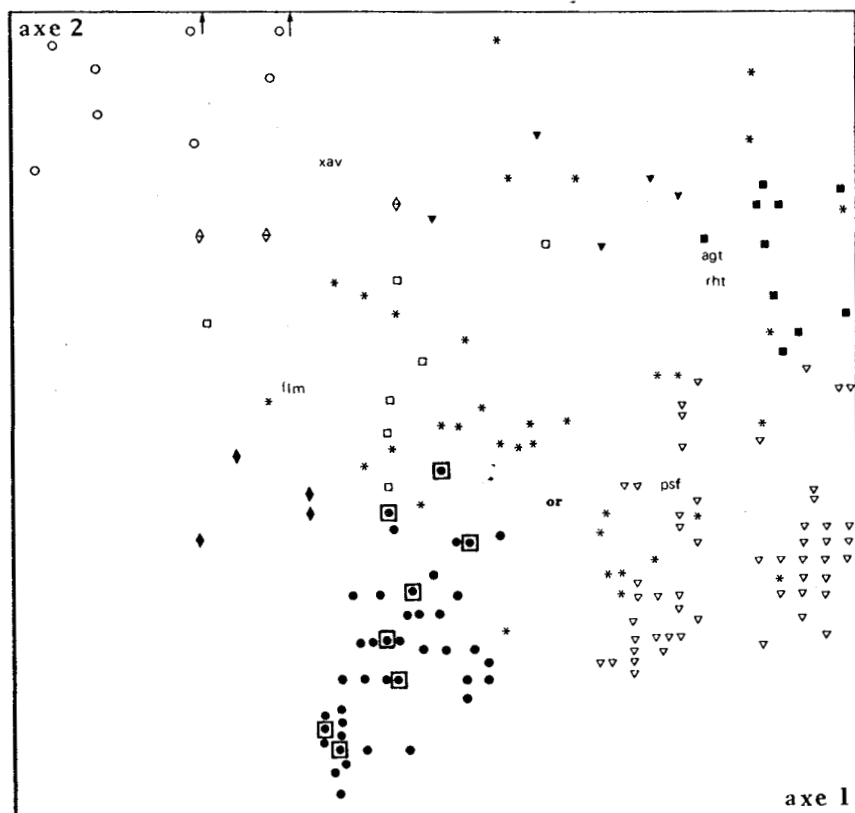


FIGURE 5

Position des souches du phénon 3 choisies pour l'étude de la dénaturation thermique de leur A.D.N. (symbolisées par \blacksquare)
(axes 1 et 2 de l'analyse factorielle)

Pour les A.D.N. des 2 premières souches du phénon 3 étudiées, la souche-type C₁₇ et A₃, aucune augmentation d'absorbance n'est survenue à 260 nm. pour des températures inférieures à 95°, température maximale que peut atteindre l'eau circulant dans le porte-cuves. Par contre, des courbes de dénaturation ont été obtenues pour Bacterium anitratum et l'A.D.N. de thymus de veau. Elles sont transcrites dans le graphique 2, l'hyperchromicité étant enregistrée avec une expansion d'échelle de 2.

Il était donc nécessaire d'utiliser un tampon de force ionique plus faible pour dissoudre l'A.D.N. des souches du phénon 3. Nous avons dilué la SSC au 1/3, ce qui a permis la dénaturation de l'A.D.N. des souches soumises à l'analyse (A₃ - A₄ - B₁₁ - C₁₇ - C₂₈ - D₁₁ - F₂₈ - G₉). A partir de ces courbes le T_m (SSC x 1/3) peut être déduit (graphique 3).

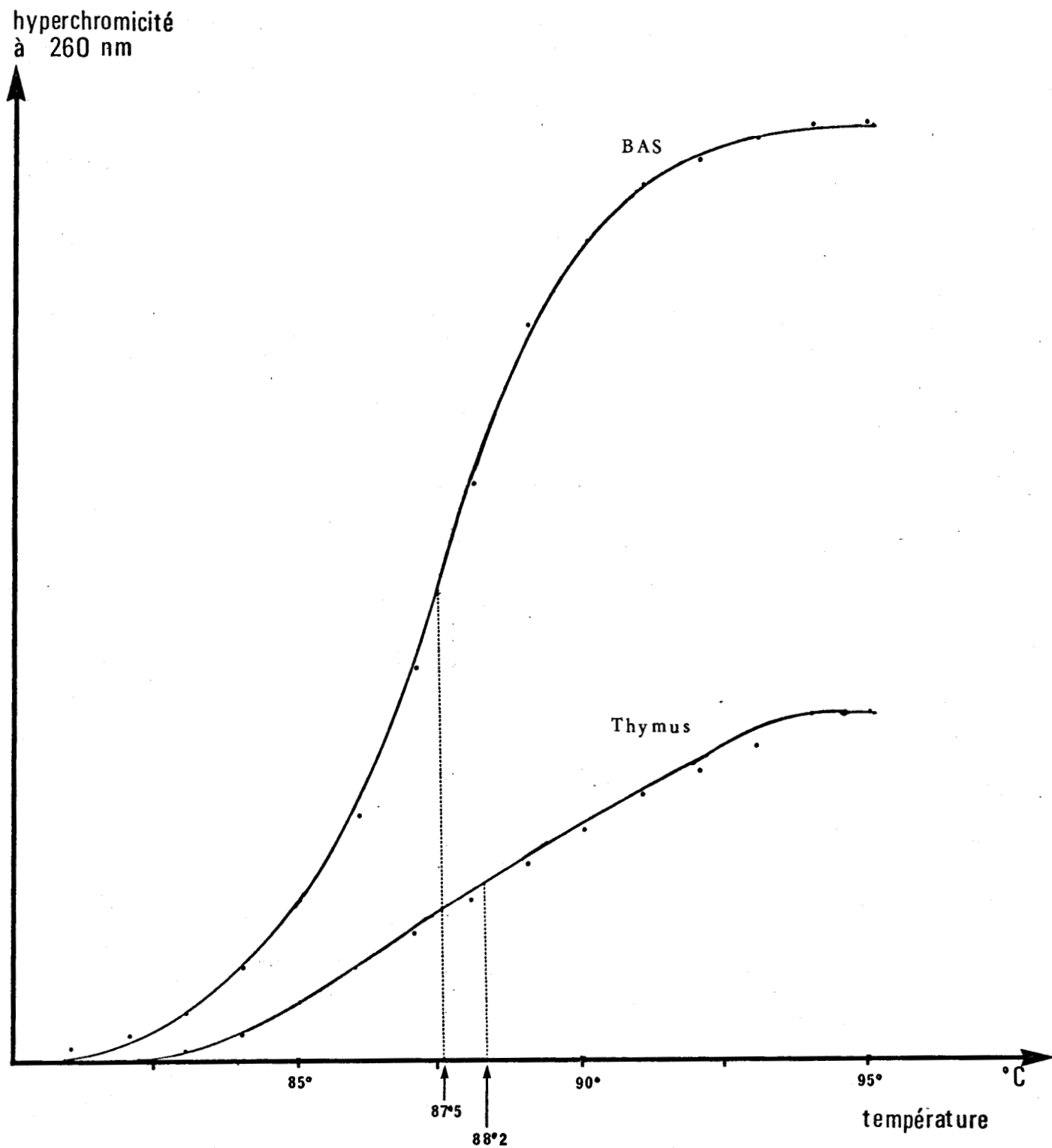
Nous remarquons une certaine homogénéité dans les résultats. En effet, les T_m (SSC X 1/3) sont situés entre 89°C et 92,5°C pour 6 souches, les T_m des 2 autres s'en écartant, légèrement pour A₃, beaucoup plus significativement pour A₄.

2) CALCUL DES % GC à partir des T_m

=====

Ces résultats étant acquis, comme il n'est pas possible d'appliquer une relation bien définie et communément employée pour calculer le % GC à partir des T_m (SSC X 1/3) précédents, nous avons utilisé d'autres tampons de force ionique faible pour lesquels des relations entre le T_m et le % GC sont bien établies. Il est indispensable, en effet, de donner un ordre de grandeur du % GC de l'A.D.N. de la souche-type du phénon 3 de façon à pouvoir la comparer à des espèces bactériennes connues.

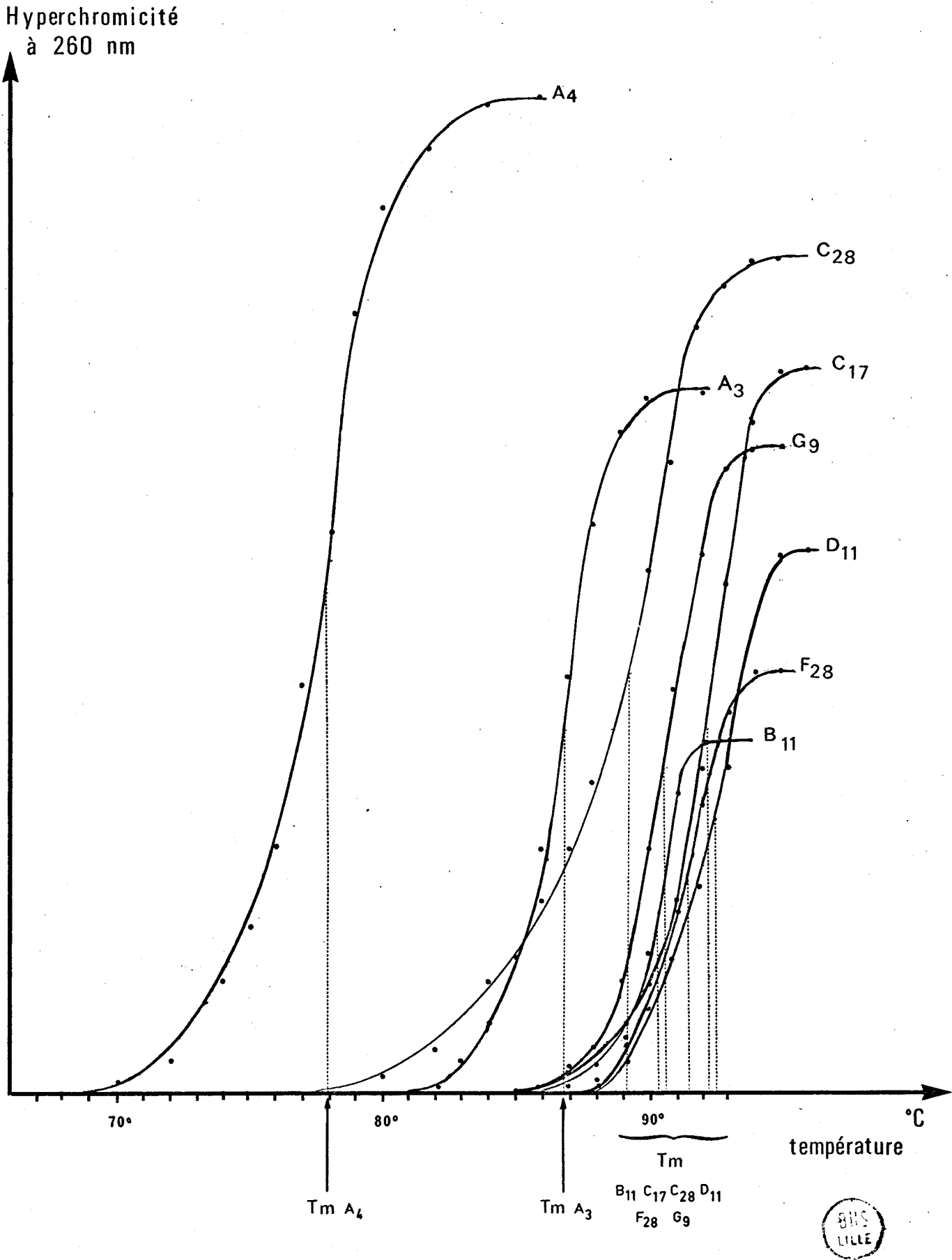
Le tampon de BOHACEK a ainsi été employé, mais il a donné des T_m très élevés avec les A.D.N. de thymus de veau et de B.A.S. (graphique 4) et des % GC nettement supérieurs à ceux qui ont été déterminés avec la SSC standard, lesquels sont très voisins des résultats référenciés (tableau 10 - partie A). Cependant l'utilisation de ce tampon permet de confirmer que



GRAPHIQUE 2

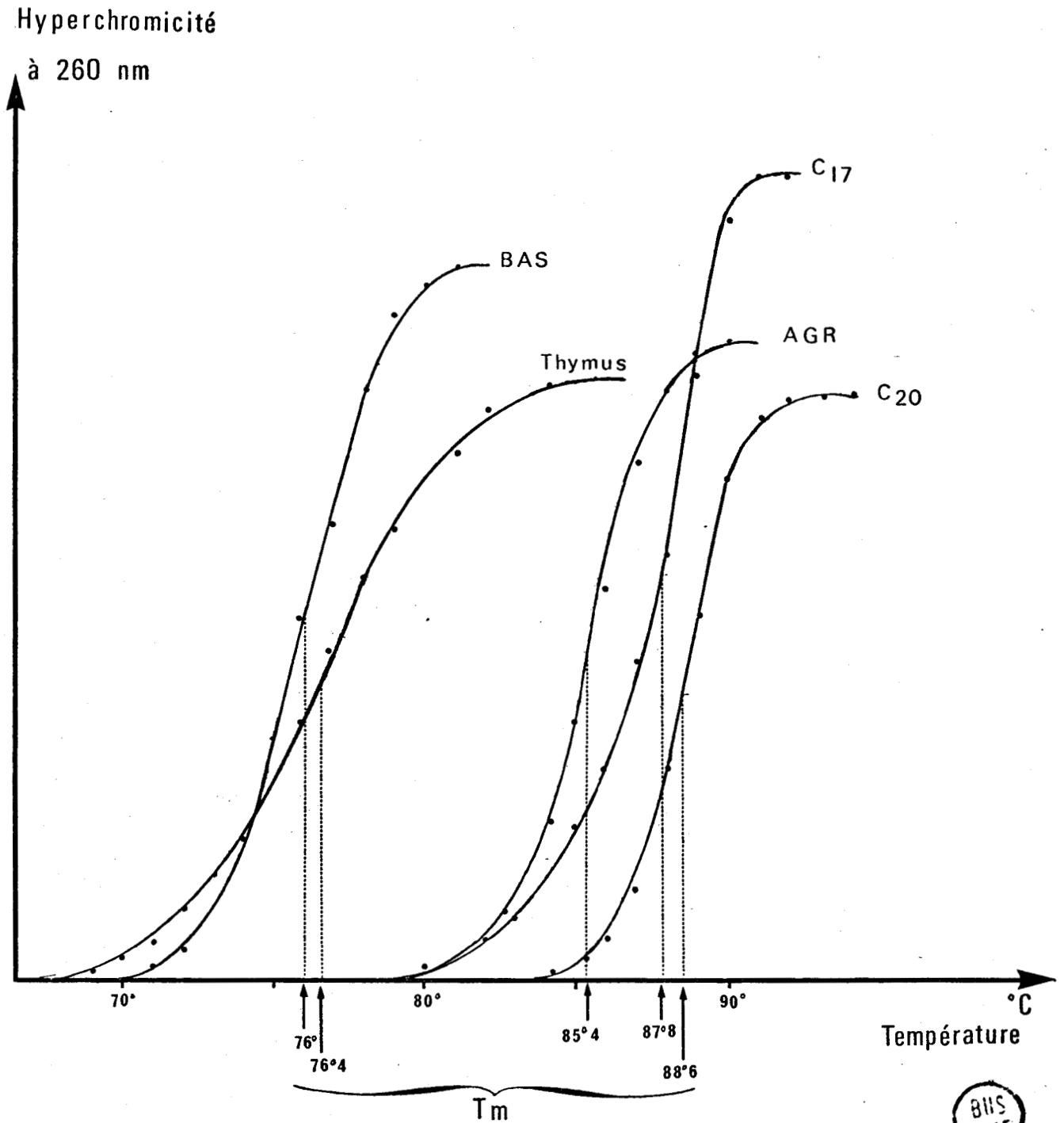


Courbes de dénaturation thermique et T_m des A.D.N. de Bacterium anitratum et de thymus de veau dissous dans la SSC standard.



GRAPHIQUE 3

Courbes de dénaturation thermique et Tm des A.D.N. des souches du phénon 3 soumises à l'analyse, dissous dans $\frac{SSC \times 1}{3}$



GRAPHIQUE 4

Courbes de dénaturation thermique et T_m de quelques A.D.N. dissous dans le tampon de Bohacek.

ORIGINE DE L'A.D.N.	SSC Standard		SSC x $\frac{1}{3}$	tampon de Bohacek		SSC x 0,1		% GC et Références
	Tm	% GC (Marmur et Doty)		Tm	% GC	Tm	% GC	
Thymus	88°3	46,3	-	76°4	56,4	-	-	41,9 % Chargaff (1955) 42 % Marmur et Doty (1962)
B A S	87°5	44,4	-	76°	55,5	71°6	45,1	38-45 % Bøvre et coll. (1969) 41-43 % De Ley (1969) 42,5 % Pinter et coll. (1969) 41,4 % Bohacek et coll. (1970) 40-46,8 % Juni (1972)
C ₁₇	95°	62,6	92°2	87°8	81,7	{79°2 80°	{63,8 65,8	
A ₃	95°	62,6	86°7	-	-	-	-	
A ₄	-	-	77°8	-	-	-	-	
B ₁₁	-	-	90°3	-	-	-	-	
C ₂₀	-	-	-	88°6	83,5	-	-	
C ₂₈	-	-	89°2	-	-	-	-	
D ₁₁	-	-	92°5	-	-	-	-	
F ₂₈	-	-	91°3	-	-	-	-	
G ₉	-	-	90°5	-	-	-	-	
P S M	-	-	-	-	-	79°3	64	66-68 %) Hill (1966) 64,5 %) Mandel (1966) 66,9 % Komagata et coll. (1974) 65,1-66,5% Komagata et coll. (1974) 67 % Bergey's Manual (1974)
X A V	-	-	-	-	-	80°	65,8	62-68 % Hill (1966) 63,5-69,2% Bergey's Manual (1974)
A G R	-	-	-	-	-	78°5	62	59,6-62,8 % De Ley et coll. (1966) 62,1 Heberlein et coll. (1967)

TABLEAU 10



Récapitulation des Tm et des % GC des ADN de quelques souches du phénon 3 et des ADN de Thymus de veau, Bacterium anitratum (BAS), Pseudomonas maltophilia (PSM), Xanthomonas vasculorum (XAV) et Agrobacterium rhizogenes (AGR)

les % GC de l'A.D.N. de C₁₇ et de celui d'une autre souche du phénon 3 : la C₂₀, sont différents et beaucoup plus élevés que celui de l'A.D.N. de B.A.S.

En utilisant la SSC x 0,1 (BOWIE et coll. 1972), nous obtenons le même écart entre les T_m des A.D.N. de B.A.S. et de C₁₇ (graphique 5). Le calcul des % GC selon la relation de BOWIE et coll. aboutissant à des résultats assez conformes pour B.A.S., a donné pour l'A.D.N. de C₁₇ une valeur moyenne de 65 % (tableau 10 - partie B).

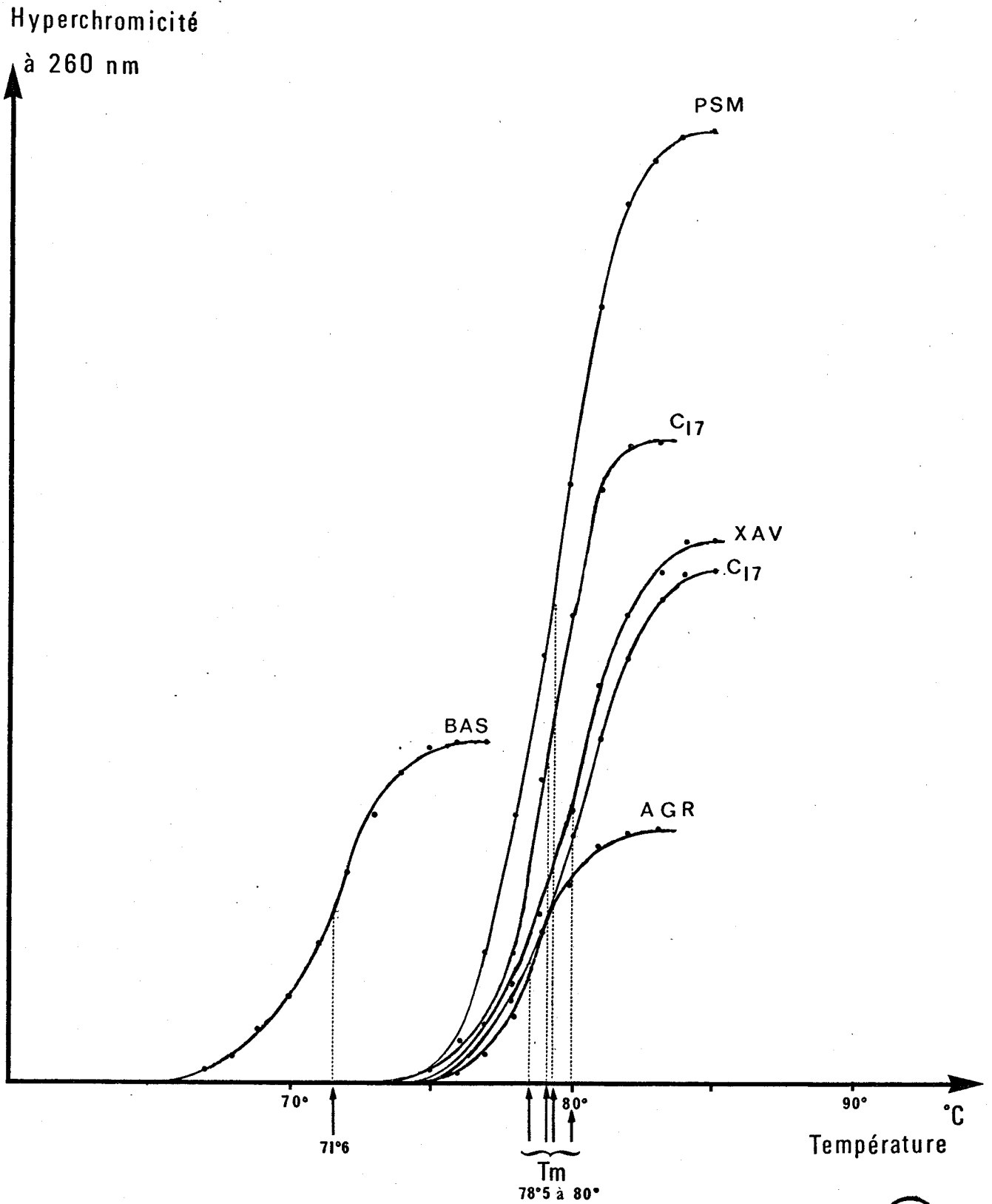
Compte tenu de cette valeur, nous avons recherché dans diverses nomenclatures les genres bactériens à Gram négatif dont le % GC est voisin de 65 %.

- Selon COLWELL (1973), on relève les genres :

- . Pseudomonas : 57 - 66 %
- . Xanthomonas : 62 - 63 %
- . Rhizobium : 59 - 66 %

- Dans son index, HILL (1966) rapporte les résultats de COLWELL et MANDEL (1964) et DE LEY ET VAN MUYLEM (1963) qui donnaient alors des valeurs de % GC s'étendant de 62 à 68 % pour le genre Xanthomonas. Il distingue aussi 2 groupes de Pseudomonas l'un à % GC faible (35-45 %), l'autre à % GC élevé (55-70 %). Dans ce dernier groupe, l'espèce Pseudomonas maltophilia a retenu notre attention, d'une part pour son % GC, et d'autre part parce que c'est le seul Pseudomonas qui ne présente pas de cytochrome-oxydase, comme les souches du phénon 3. Le genre Rhizobium, du fait de sa particularité physiologique, ne peut être retenu. Toutefois, parmi les Rhizobiacées, Agrobacterium rhizogenes qui ne stimule pas la tumorigénèse comme A. tumefaciens et dont le % GC est compris entre 59,6 et 62,8 % (DE LEY et coll., 1966), peut offrir quelque intérêt à priori ; de plus, sur le plan phénotypique, il ne produit pas de cétolactose et présente des exigences nutritionnelles, caractéristiques du phénon 3.

- Selon la dernière édition du Bergey's manual (1974), nous relevons aussi le genre Flavobacterium dont le % GC peut s'élever jusqu'à 63-70 %, mais comme il correspond à des germes



GRAPHIQUE 5

Courbes de dénaturation thermique et T_m des A.D.N. de C₁₇ et de quelques souches répertoriées, dissous dans la SSC x 0,1



pigmentés, nous l'éliminons. Il en est de même pour le genre Alcaligenes, assez mal défini, dont le % GC est compris entre 57,9 et 70 %, puisqu'il présente une cytochrome-oxydase.

Cet index de détermination bactériologique nous amène à retenir plus précisément :

- Pseudomonas maltophilia (P.S.M.) dont % GC = 67 %
- le genre Xanthomonas dont % GC compris entre 63,5 et 69,2 %
- Agrobacterium rhizogenes (A.G.R.) dont % GC compris entre 59,6 et 62,8 %

C'est la raison pour laquelle nous nous sommes procurés des souches de collection pour ces espèces, Xanthomonas vasculorum (X.A.V.) y compris. Nous en avons extrait l'A.D.N. et effectué une dénaturation thermique dans une SSC x 0,1. Les courbes correspondantes sont reportées dans le graphique 5. Leurs % GC respectifs ont été calculés et sont indiqués dans le tableau 10 (partie C) Les résultats obtenus concordent bien avec les valeurs citées dans des travaux antérieurs.

3) CALCUL DU % GC DE L'A.D.N. de C17 A PARTIR D'UN HYDROLYSAT CHROMATO- ===== GRAPHIE =====

Compte tenu du but indiqué page 39, plusieurs chromatogrammes ont été réalisés, mais c'est uniquement celui qui donne des rapports $\frac{A}{T}$ et $\frac{G}{C}$ les plus voisins de l'unité, qui est considéré pour les calculs.

Les longueurs d'onde d'absorbance maximale utilisées sont celles données par ROMOND (1965), soit :

- pour l'adénine : 262,5 nm
- pour la guanine : 249,0 nm
- pour la cytosine : 275,0 nm
- pour la thymine : 264,5 nm

Nous indiquons dans le tableau 11 ci-après toutes les valeurs obtenues au spectrophotomètre (Zeiss) pour les bases et pour chaque "blanc" correspondant, aux différentes longueurs d'onde d'absorption maximale et à la longueur d'onde de référence: 290 nm.

	Densités optiques des bases			Densités optiques des "blancs"		
	à λ maxi	à 290 nm	différence (1)	à λ maxi	à 290 nm	différence (2)
GUANINE	0,593	0,205	0,388	0,016	0,005	0,011
ADENINE	0,347	0,015	0,332	0,002	0,002	0
CYTOSINE	0,545	0,251	0,294	0,006	0,003	0,003
THYMINE	0,174	0,014	0,160	0,012	0,004	0,008

Tableau 11

Densités optiques des bases et des "blancs" correspondant de l'A.D.N. de C₁₇ (20 μ l) après chromatographie.

La "densité optique corrigée" est déduite de ce tableau pour chaque base par la relation : différence de densités optiques lues à λ maxi et à $\lambda = 290$ nm pour la base [colonne (1)] - différence des densités optiques lues à λ maxi et à $\lambda = 290$ nm pour le blanc [colonne (2)] .

Nous déterminons ensuite le nombre de μ mol/100 ml de solution d'A.D.N., sachant qu'on a déposé 20 μ l sur le chromatogramme, en divisant cette "densité optique corrigée" par des coefficients propres à chaque base donnés par LEE (guanine = 1,44; adénine = 2,42; cytosine = 1,21 et Thymine = 1,37). On obtient :

$$- \text{GUANINE} = \frac{0,388 - 0,011}{1,44} \times \frac{100}{20} = 1,30 \mu \text{ mol. } \%$$

$$- \text{ADENINE} = \frac{0,332 - 0}{2,42} \times \frac{100}{20} = 0,69 \mu \text{ mol. } \%$$

$$- \text{CYTOSINE} = \frac{0,294 - 0,003}{1,21} \times \frac{100}{20} = 1,20 \mu \text{ mol. } \%$$

$$- \text{THYMINE} = \frac{0,160 - 0,008}{1,37} \times \frac{100}{20} = 0,55 \mu \text{ mol. } \%$$

Nous en déduisons les rapports :

$$\frac{A}{T} = 1,2$$

$$\frac{G}{C} = 1,09$$

$$\frac{A + T}{G + C} = \frac{1,24}{2,5} \approx \frac{1}{2}$$

$$(G + C) \% = 66,8 \%$$

Cette valeur de % GC pour l'A.D.N. de C₁₇ confirme donc l'ordre de grandeur que nous en avons donné à partir du T_m des courbes de dénaturation thermique obtenues dans SSC x 0,1 (tableau 10 - partie B).

4) ANALYSE DES RESULTATS

=====

En ce qui concerne les souches de référence, les % GC calculés dans des conditions différentes présentent une concordance certaine avec les valeurs rapportées dans la bibliographie, sauf lorsque la dénaturation est réalisée dans le tampon de Bohacek. Dans ce cas, les résultats obtenus sont nettement supérieurs.

Par contre, puisque la SSC x 1 ne peut convenir à des A.D.N. de % GC élevé, il semble que la dilution au $\frac{1}{10}$ et l'application de la formule de Bowie et coll. aboutissent à des valeurs plus proches de celles qui sont couramment admises.

Les procédés d'extraction pourraient expliquer les écarts ci-dessus mentionnés. En effet, KRIEG et LOCKHART (1970) ont vérifié qu'au cours des extractions, chacune des molécules d'A.D.N. intactes d'E. Coli était cassée en une centaine de morceaux, si bien qu'une courbe de dénaturation thermique correspond finalement à la dénaturation d'une population de fragments de chaînes dont les pourcentages individuels de bases sont légèrement différents. D'autre part, ils ont montré que plus les poids moléculaires des A.D.N. étaient petits, plus la variation du T_m était grande et plus l'hyperchromicité était faible.

Ces remarques expliquent les variations dans les résultats que nous avons obtenus, mais ne mettent pas en cause les comparaisons que nous voulons établir.

- C O N C L U S I O N -

Cette étude nous permet de vérifier que l'homogénéité des souches du phénon 3 déterminée par analyse numérique sur des critères phénotypiques, se retrouve lors de l'étude physico-chimique du génome, confirmant ainsi que des groupes phénotypiquement semblables ont des % GC homogènes (JONES et SNEATH, 1970).

Le coefficient de Shapiro-Chargaff de ces souches est finalement très élevé, celui de la souche-type étant voisin de 65 mol. %

Le genre Acinetobacter auquel nous avons comparé nos souches précédemment (première partie), s'avère ne plus convenir après ces études physico-chimiques du génome. En effet, le contenu en guanine + cytosine des Acinetobacter est compris entre 40 et 47 mol. % (Bergey's Manual, 1974) soit une différence de 18 à 25 %. Or, DE LEY (1969) précise que lorsque la composition moyenne en nucléotides de bactéries diffère d'au moins 18 à 30 % GC, il n'y a pratiquement aucune séquence nucléotidique commune et les organismes sont de ce fait très éloignés sur le plan évolutif et ne possèdent aucune relation taxonomique.

Par contre, une faible différence de % GC étant significative, nous avons recherché les genres, puis les espèces bactériennes dont le contenu en guanine + cytosine est compris entre 60 et 70 % (étant donné que la déviation standard du % GC moyen des fragments d'A.D.N. varie de 3 à 5,5 % GC selon DE LEY, 1969).

Nous avons ainsi retenu d'abord les genres Pseudomonas, Xanthomonas et Agrobacterium correspondant à cet écart de % GC, puis certaines espèces de ces genres qui présentaient des analogies phénotypiques avec les souches du phénon 3.

Il importe maintenant de compléter ces résultats par une étude plus fine afin de faire apparaître d'une façon plus évidente les relations taxonomiques de la souche-type C17.

TROISIEME PARTIE

ETUDE PARTICULIERE DU PHENON 3 :

APPLICATION DES TECHNIQUES D'HYBRIDATION DES A.D.N.

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

La compatibilité de séquences nucléotidiques (encore appelée hybridation, homologie, réassociation, appariement..., autant de termes pouvant prêter à confusion avec la terminologie de la biologie générale) a été étudiée depuis 1961. A cette époque, ces travaux étaient acceptés avec réticence par les taxonomistes bactériens, mais actuellement leur validité et leur utilité en tant que critère complémentaire à la détermination des % GC et aux analyses phénotypiques ne sont plus mises en doute.

Les techniques d'hybridation moléculaire sont basées sur la propriété de renaturation d'un A.D.N. dénaturé et sur la spécificité de réassociation des séquences de bases complémentaires de chaque chaîne d'A.D.N.

Les A.D.N. de souches bactériennes taxonomiquement très proches s'hybrideront presque complètement alors que ceux des souches de parenté éloignée s'hybrideront moins. Par conséquent, plus l'hybridation est complète, plus le degré d'homologie est élevé (STALEY et COLWELL, 1973).

Dans la plupart des procédés employés pour étudier ces hybridations, l'A.D.N. d'un ou plusieurs organismes est rendu radioactif, puis il est fragmenté et dénaturé : c'est l'A.D.N. "de référence". Il est ensuite mis en présence d'A.D.N. non marqué, non fragmenté mais également dénaturé provenant soit du même organisme (hybridation homologue) soit d'un autre (hybridation hétérologue). Maintenus à une température précise dite température d'hybridation, variant selon la composition nucléotidique des A.D.N., des molécules hybrides radioactives peuvent ainsi se former. Elles sont séparées des fragments d'A.D.N. n'ayant pas réagi et la compatibilité des deux A.D.N. est déduite quantitativement du rapport entre le degré de réassociation de l'A.D.N. hétérologue et celui de la réaction homologue.

Les premières investigations concernant cette réassociation sont celles de SCHILDKRAUT et coll. (1961). Elles con-

sistaient à incorporer un isotope radioactif à un A.D.N. et à séparer les molécules hybrides formées par une centrifugation en gradients de densité. Par la suite, cette méthode a été peu usitée en taxonomie bactérienne et d'autres procédés de séparation de l'A.D.N. hybride ont été décrits (STALEY et COLWELL, 1973).

La séparation ou le piégeage des molécules hybrides a évolué surtout vers l'emploi de membranes filtrantes en nitrocellulose (DEN HARDT, 1966) et de colonnes d'hydroxyapatite (BERNARDI, 1965 et MIYAZAWA et THOMAS, 1965). Ces deux procédés ont leurs avantages et leurs inconvénients propres et tous deux sont reproductibles en donnant des résultats à 5 % près (BRENNER, 1973).

Nous avons choisi la méthode des membranes filtrantes en nitrocellulose qui présente l'avantage d'être peu onéreuse et surtout de permettre d'effectuer en même temps plusieurs expériences d'hybridation sur des A.D.N. différents. Elle consiste, en résumé, à immobiliser par filtration sur une membrane en nitrocellulose, de l'A.D.N. en chaînes monohélicoïdales de poids moléculaire élevé. La membrane chargée d'A.D.N., séchée, est placée dans un récipient contenant une solution d'A.D.N. marqué (^3H -A.D.N.) fragmenté et dénaturé. L'homologie est calculée en considérant le pourcentage de la radioactivité de l'A.D.N. immobilisé sur la membrane dans le système hétérologue par rapport à celle du système homologue. L' ^3H -A.D.N. en solution est à une concentration très faible, 10 à 20 fois inférieure à celle de l'A.D.N. adhérent au filtre afin de minimiser la propre réassociation des fragments marqués et donc d'augmenter l'hybridation spécifique des brins marqués et non marqués.

De nombreux paramètres peuvent affecter plus ou moins sensiblement la réassociation de l'A.D.N.. Si la taille des fragments d' ^3H -A.D.N. et la force ionique du milieu d'incubation peuvent varier assez largement sans influencer de façon significative les résultats, par contre, les valeurs d'homologie peuvent varier considérablement selon le degré de pureté des préparations d'A.D.N. et selon la température d'incubation (BRENNER, 1973).

MATERIEL ET METHODES

La méthode de piégeage de l'A.D.N. hybride sur des membranes filtrantes de nitrocellulose repose surtout sur les principes exposés par GILLESPIE et SPIEGELMAN (1965) et sur les modifications apportées par DENHARDT (1966).

1. METHODOLOGIE DE L'HYBRIDATION

Une expérience d'hybridation comprend plusieurs étapes résumées schématiquement page ci-contre.

a) Extraction et purification des A.D.N.

Tous les A.D.N. bactériens retenus pour cette étude : ceux de C₁₇ (la souche-type), de Bacterium anitratum (BAS), de Xanthomonas vasculorum (XAV), d'Agrobacterium rhizogenes (AGR) et de Pseudomonas maltophilia (PSM) ont été extraits selon la méthode de Marmur modifiée (en particulier traitement supplémentaire avec la protéase d'après GILLESPIE et SPIEGELMAN, 1965) mentionnée dans la 2ème partie de ce mémoire.

Leur conservation s'effectue à 4°C dans la solution saline citrate standard (SSC x 1) en présence de quelques gouttes de chloroforme. L'élimination des molécules organiques contaminantes est opérée par dialyse à 4°C (1 v. de solution d'A.D.N. contre 500 v. de SSC x 1). Toutefois, à la différence de KRIEG et LOCKHART (1970), cette dialyse n'est maintenue que pendant 24 h. Elle est réalisée juste avant la poursuite des opérations afin d'éliminer tout problème de stockage après la dialyse.

b) Dénaturation et immobilisation des A.D.N.

Après dialyse, les solutions d'A.D.N. sont diluées au $\frac{1}{10}$ avec de l'eau bidistillée afin de faciliter la dénaturation thermique qui se déroule au bain-marie bouillant pendant 10 mn.

Elles sont ensuite refroidies rapidement en les plongeant dans de la glace pilée. On y ajoute alors de la SSC d'une concentration et d'un volume tels que l'A.D.N. se trouve finalement en solution dans une SSC x 6 (GILLESPIE et SPIEGELMAN, 1965 et JOHNSON et coll., 1970). En effet, lorsque l'A.D.N. est en solution dans une SSC x 6, il adhère davantage à la membrane que dans une SSC x 2, quelquefois utilisée (GILLESPIE et SPIEGELMAN, 1965).

Chaque solution d'A.D.N. est filtrée lentement sur une membrane filtrante de nitrocellulose (Millipore HAWP - 47 mm de \varnothing - 0,45 μ) préalablement trempée dans de la SSC x 6 pendant une nuit au réfrigérateur (COOPER, 1972). La vitesse de filtration est régulée par une pompe à eau : 3 à 4 mn pour filtrer 20 à 40 ml. de solution d'A.D.N. dénaturé (COOPER, 1972). Chaque filtre est ensuite lavé avec 30 ml. de SSC x 6, filtrés lentement.

Le volume de la solution d'A.D.N. dénaturé à filtrer et la concentration de la solution d'A.D.N. initiale sont fixés en fonction de la quantité d'A.D.N. à immobiliser sur filtre (100 à 200 μ g).

Nous avons estimé la quantité d'A.D.N. fixé sur une membrane en mesurant la densité optique à 260 nm. de la solution avant et après filtration, comme le signalent DE LEY et TIJTGAT (1970). Nous n'avons obtenu qu'une efficacité de charge de 60 à 70 %, alors qu'elle est évaluée à 95-96 % environ par DENHARDT (1966) et GIBBINS et GREGORY (1972). Selon GILLESPIE (1968), la mauvaise fixation de l'A.D.N. sur le filtre peut s'expliquer, soit par une fragmentation des molécules pendant l'extraction et la purification, soit par une dénaturation incomplète. La première raison, surtout, semble la cause de ce déficit de charge que nous avons constaté. En effet, une dénaturation incomplète est peu probable car elle est effectuée sur des solutions peu concentrées en A.D.N. et avec un tampon de faible force ionique.

Chaque expérience d'hybridation est accompagnée de filtres "blancs" traités de la même façon, mais sans être chargés d'A.D.N.

De façon à éviter la renaturation de l'A.D.N., les membranes sont ensuite séchées dans un dessiccateur sous vide à température ambiante pendant 4 h., puis à 80°C pendant 2 h. (GILLESPIE et SPIEGELMAN, 1965). Elles sont enfin conservées dans ce dessiccateur à l'obscurité, à température ambiante, jusqu'à l'étape suivante (GIBBINS et GREGORY, 1972).

c) Marquage de l'A.D.N. "de référence" (C₁₇)

L'isotope le plus couramment employé pour marquer radioactivement l'A.D.N. "de référence" est le ¹⁴C (HEBERLEIN, 1967 - COOPER, 1972 - GIBBINS et GREGORY, 1972 - DE LEY et coll., 1973). Nous avons cependant préféré le ³H, parce qu'il présente le moins d'inconvénients, et incorporé de lathymidine tritiée au

milieu de culture dans des proportions similaires à MURATA et STARR (1973).

Dans le cadre de nos travaux, l'A.D.N. "de référence" est toujours celui de C₁₇. Un inoculum de 10 ml de cette souche est d'abord préparé dans le milieu B (composition p. 31) et, après une nuit d'incubation à 28°C, il est introduit dans un erlen renfermant 300 ml de ce même milieu additionné stérilement de ³H-thymidine (CEA-France) à raison de 3 µCi/ml. Après une quinzaine d'heures d'incubation à 28°C sur table d'agitation, l'A.D.N. marqué de C₁₇ est extrait et purifié.

On vérifie à chaque fois l'incorporation de la ³H-thymidine dans l'A.D.N. de C₁₇ en mesurant l'activité spécifique de celui-ci par comptage en scintillation liquide. On enregistre en moyenne 9.000 à 10.000 cpm/µg d'³H-A.D.N., ce qui est satisfaisant et assez proche de l'activité spécifique donnée par MURATA et STARR (1973) et SOTTILE et coll. (1973).

d) Fragmentation et dénaturation de l'A.D.N. marqué

Trois méthodes de fragmentation de l'A.D.N. marqué sont signalées par SEIDLER et MANDEL (1971) et sont diversement employées :

- par compression à travers "une aiguille" (STRAUS et BONNER, 1972)
- par compression à travers une cellule de French (SEIDLER et MANDEL, 1971 - DE LEY et coll. 1973)
- par action des ultrasons (MIYAZAWA et coll., 1965 - GROSS et WAYNE, 1970 - GIBBINS et GREGORY, 1972 - MURATA et STARR, 1973 - SOTTILE et coll. 1973)

C'est ce dernier procédé que nous avons utilisé, mais sans pouvoir tenir compte des indications de durée et d'amplitude des ultrasons fournis par ces auteurs puisque nous ne disposions pas du même appareil. Ces paramètres seront définis dans le paragraphe suivant de mise au point de la méthode.

Le passage aux ultrasons se fait toujours sur de petites quantités de solutions d'³H-A.D.N. (1 ml) dans des tubes à hémolyse plongés dans de la glace pilée (GROSS et WAYNE, 1970).

Après stabilisation pendant un séjour d'au moins

24 h. au réfrigérateur, cet ^3H -A.D.N. fragmenté est dénaturé au bain-marie bouillant pendant 15 mn. Il est ensuite immédiatement refroidi en plaçant la suspension dans de la glace et en ajoutant 1 ml de SSC x 3 froide de façon à ce que l' ^3H -A.D.N. soit finalement en solution dans SSC x 2.

e) Hybridation proprement dite

Pour éviter l'adsorption des fragments d' ^3H -A.D.N. non hybridés sur la membrane, il faut effectuer une préincubation des filtres en présence d'albumine (DENHARDT, 1966).

Chaque membrane filtrante séchée est placée au fond d'un bécher de 100 ml, la face chargée vers le dessus. Elle est recouverte avec une SSC x 2 additionnée d'albumine bovine (Sigma) à une concentration de 0,02 %. Le volume de ce milieu de préincubation sera défini plus loin.

Ce prétraitement, que subissent également les filtres "blancs", dure 6 h. au bain-marie à 65°C (MURATA et STARR, 1973 - STALEY et COLWELL, 1973), les béchers étant hermétiquement bouchés pour éviter l'évaporation.

A ce milieu de préincubation est ensuite ajouté, sur chaque filtre, y compris les "blancs", 0,1 ml d' ^3H -ADN fragmenté et dénaturé, soit $\approx 3 \mu\text{g}$. L'incubation est alors poursuivie pendant une durée que nous préciserons plus loin.

Théoriquement, la température d'incubation permettant l'hybridation maximale est inférieure au T_m (SSC x 1) de 25 à 30°C (BRENNER, 1973).

Pratiquement, comme ce T_m n'a pas pu être déterminé dans la SSC x 1 pour l'A.D.N. de C_{17} , nous l'avons déduit de la valeur moyenne du % GC (65 %) calculé p. 47 en employant la relation de MARMUR et DOTY (1962) déjà citée p. 38, soit T_m (SSC x 1) $\approx 96^\circ\text{C}$.

Les premiers essais d'hybridation ont donc été effectués à $\approx 71^\circ\text{C}$ ($96^\circ - 25$) ou à $\approx 66^\circ\text{C}$ ($96^\circ - 30$).

f) Lavages et mesure de la radioactivité

Lorsque l'incubation est terminée, les béchers contenant les filtres sont sortis du bain-marie et les filtres sont délicatement lavés par trempage dans 25 ml. de SSC x 2 (JOHNSON et coll., 1970).

Chaque filtre est ensuite roulé et plongé dans un flacon à scintillation renfermant 15 ml. du liquide scintillant de KENNEDY. Après stabilisation, la radioactivité est mesurée et le pourcentage d'hybridation ensuite évalué :

$$\frac{\text{cpm. sur filtre avec A.D.N. hétérologue} - \text{cpm. sur filtre "blanc"}}{\text{cpm. sur filtre avec A.D.N. homologue} - \text{cpm. sur filtre "blanc"}} \times 100$$

2. MISE AU POINT DE LA METHODE

a) Détermination des paramètres d'action des ultrasons

Ils sont essentiellement représentés par la durée et l'intensité de l'application des ultrasons émis par un désintégrateur à ultrasons (MSE-150 Watt) équipé d'une microsonde au titane (\emptyset 3 mm à son extrémité).

- la durée des ultrasons

Pour la première série d'expériences, une amplitude constante de vibrations ultrasoniques égale à 12μ est appliquée à une suspension d' $^3\text{H-A.D.N.}$ extrait de C_{17} pendant 15, 30 ou 60 secondes. L' $^3\text{H-A.D.N.}$ est ensuite dénaturé et mis en présence de filtres "blancs", mais traités selon la méthodologie décrite plus haut.

Après une incubation de 24 h. à 71°C , les filtres sont lavés deux fois dans une SSC x 2, puis ils sont coupés en 2 parties égales, une des moitiés de chacun d'eux subissant un 3e lavage prolongé dans une SSC x 2.

La radioactivité de chaque $\frac{1}{2}$ filtre est déterminée en scintillation liquide.

	Temps de sonication en secondes		
	15	30	60
2 lavages	5613	1962	766
3 lavages	2072	1878	683

Tableau 12

Radioactivité en cpm retenue par des $\frac{1}{2}$ filtres incubés en présence d' $^3\text{H-A.D.N.}$ ayant subi une sonication pendant des durées différentes

Du tableau 12, on peut déduire que l'adsorption non spécifique de l' ^3H -A.D.N. aux filtres est minimale pour une sonication de 60 secondes et que, dans ces conditions, un lavage supplémentaire n'apporte guère d'effet notable.

- l'amplitude des vibrations ultrasoniques

Pour la 2ème série d'expériences, de l' ^3H -A.D.N. de C_{17} subit, pendant 60 secondes, l'action des vibrations ultrasoniques d'une amplitude de 12μ ou de 20μ . Des filtres "blancs" sont incubés pendant 24 h. à 71°C avec 1 ml de SSC x 2 additionné de 0,1 ml de cet ^3H -A.D.N. dénaturé. Ils sont lavés 2 fois dans une SSC x 2, avant d'être soumis au comptage.

- amplitude de 12μ :

213 - 161 - 145 cpm retenue par les filtres.

- amplitude de 20μ :

881 - 227 - 258 cpm retenue par les filtres.

De ces résultats on peut conclure qu'une amplitude des vibrations ultrasoniques élevée a plutôt tendance à augmenter l'adsorption de l' ^3H -A.D.N. sur les filtres (MURATA et STARR, 1973) alors qu'il convient de l'éviter, ce que confirmeront les tableaux 13 et 14.

A la suite de ces expériences, l' ^3H -A.D.N. de C_{17} sera donc toujours soumis aux ultrasons de la même manière : pendant 60 s. avec une amplitude de vibrations de 12μ .

b) Détermination des conditions d'incubation permettant l'hybridation

Cette étape est la plus délicate, la moindre variation d'un paramètre pouvant avoir une influence considérable. Aussi devons-nous préciser dans cette mise au point les conditions d'incubation.

- la durée

Des essais préalables d'hybridation entre l' ^3H -A.D.N. de C_{17} et des A.D.N. homologue ou hétérologues immobilisés sur des filtres ont été réalisés pour 2 durées d'incubation : 24 h ou 46 h, à 71°C .

sonication	durée d'incubation	type d'hybridation		"blanc"
		C ₁₇ -C ₁₇ homologue	C ₁₇ -BAS hétérologue	
60 s 12 μ	24 h	1328	668	232
60 s 12 μ	46 h	5890	3839	1977
60 s 20 μ	46 h	7923	4028	-

- Tableau 13 -

Radioactivité, en cpm, des filtres incubés à 71°C pour des durées différentes, en présence de la même quantité d'³H-A.D.N., dans 1 ml de milieu d'incubation.

Lorsque l'incubation dure 46 h., l'adsorption de l'³H-A.D.N. sur les filtres chargés ou non d'A.D.N. atteint des valeurs beaucoup plus importantes que pour 24 h. (tableau 13). Comme attendu, cet effet est accru lorsque l'³H-A.D.N. a subi une sonication forte (20 μ).

D'autres essais, effectués plus tard, ont donné des résultats similaires et ont montré qu'un dessèchement et un jaunissement des filtres devenaient perceptibles pour des incubations durant 40 ou 46 h.

De ce fait, nous avons limité définitivement l'incubation à 24 h.

- volume du milieu de préincubation

Constatant cette tendance au dessèchement des filtres, nous avons essayé de doubler le volume du milieu de préincubation.

volume du milieu de préincubation	sonication	type d'hybridation		"blanc"
		C ₁₇ -C ₁₇ homologue	C ₁₇ -BAS hétérologue	
1 ml	60 s - 12 μ	3009	792	213
2 ml	60 s - 12 μ	2695	199	161
1 ml	60 s - 20 μ	3641	-	881
2 ml	60 s - 20 μ	3589	417	227

- Tableau 14 -

Radioactivité, en cpm, des filtres incubés à 71°C pendant 24 h. en présence de la même quantité d'³H-A.D.N. dans 1 ou 2 ml de milieu de préincubation.

Les résultats obtenus (tableau 14) nous permettent de conclure qu'un volume double de milieu de préincubation provoque une diminution de l'adsorption non spécifique de l'³H-A.D.N. Par ailleurs, ils confirment que les ultrasons d'amplitude élevée (20 μ) sont défavorables.

- une quantité double d'³H-A.D.N. incorporée au milieu d'incubation nous a montré, comme on pouvait s'y attendre, qu'elle entraînait une diminution de l'hybridation, probablement par propre réassociation des fragments d'³H-A.D.N.

- une incubation à 66°C détermine un pourcentage de radioactivité plus élevé pour les filtres chargés d'A.D.N. (de l'ordre de 25 à 35 %) que pour une incubation à 71°C. Craignant que cela soit le résultat d'une réassociation non spécifique, nous avons fixé la température à 71°C. En effet, plus la température d'incubation est inférieure à l'optimum (T_m - 25°C), plus des séquences de bases peuvent mal s'apparier.

En résumé, les conditions d'incubation pour les expériences d'hybridation sont les suivantes :

- ³H-A.D.N. fragmenté par sonication pendant 60 s avec une amplitude de vibrations de 12 μ .

- filtres chargés d'A.D.N. et filtres "blancs" préincubés dans 2 ml de SSC x 2 additionnés d'albumine.
- quantité d' ^3H -A.D.N. fragmenté et dénaturé ajouté au milieu de préincubation fixée à $\approx 3 \mu\text{g}$ contenus dans 0,1 ml de SSC x 2.
- incubation pendant 24 h. au bain-marie à 71°C.

3. ETUDE DE QUELQUES MODIFICATIONS APPORTEES PAR D'AUTRES TECHNIQUES

a) la technique double-filtre

Nous avons d'abord étudié la technique originale de MURATA et STARR (1973) qui permet de déterminer l'homologie des A.D.N., non plus de 2 organismes à la fois mais de 3 ou davantage.

Cette technique consiste à incuber ensemble dans une solution contenant l' ^3H -A.D.N. "de référence", fragmenté et dénaturé, deux membranes filtrantes : l'une chargée de l'A.D.N. homologue, l'autre de l'A.D.N. hétérologue, tous 2 n'étant pas marqués, pas fragmentés, mais dénaturés.

Plusieurs essais, menés selon le mode opératoire exposé ci-dessus, n'ont abouti à aucun résultat cohérent, sans doute parce que les 2 filtres en présence avaient tendance à s'appliquer l'un contre l'autre au cours de l'incubation. Les auteurs n'apportent aucune précision technique à ce sujet.

b) la technique d'hybridation à "basse température"

Considérant que la température élevée d'incubation favorise la mise en liberté de l'A.D.N. immobilisé sur le filtre durant l'incubation (jusqu'à 40 à 85 % de sa totalité pour des températures comprises entre 70 et 80°C d'après DE LEY et TIJTGAT, 1970), des hybridations à "basse température" ont été réalisées selon la technique de LEGAULT-DEMARE et coll. (1967) en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO). L'adjonction de DMSO évite, en outre, l'adsorption non spécifique d' ^3H -A.D.N.

Les conditions expérimentales d'incubation sont alors les suivantes :

- chaque filtre chargé d'A.D.N., au lieu d'être préincubé dans une SSC x 2 additionnée d'albumine, est directement mis en incubation dans 2 ml d'un mélange de SSC x 2 et de DMSO (Merck) dans les proportions respectives de 70 et 30 %.

- l'incubation des filtres, après adjonction d'³H-A.D.N., dure 20 h. à 62°C.

- les filtres lavés une première fois dans (SSC x 2 - DMSO) et une 2ème fois dans une SSC x 2 seule, sont séchés pendant 3 h. à 105°C (DE LEY et TIJTGAT, 1970) avant d'être incorporés dans le liquide scintillant.

R E S U L T A T S

1. RESULTATS DES HYBRIDATIONS EFFECTUEES à 71°C

Ces résultats correspondent aux hybridations de l' ^3H -A.D.N. de C_{17} avec l'A.D.N. de diverses origines, retenu sur les filtres.

Le tableau 15 rassemble les résultats de 2 expériences d'hybridation menées à des moments différents, l'expérience 1 ayant été réalisée simultanément sur deux filtres dans chaque condition.

	Origine de l'A.D.N. immobilisé sur filtre					"blanc"
	C_{17}	C_{20}	XAV	BAS	AGR	
expérience 1	16351	12665	2521	1972	754	5869
	16721	16225	2079	-	-	-
expérience 2	16524	-	8246	4811	3406	1028

Tableau 15

Radioactivité (en cpm) des filtres chargés de 100 μg d'A.D.N. de diverses souches mis en présence de $\approx 3 \mu\text{g}$ d' ^3H -A.D.N. de C_{17} (incubation de 24 h. à 71°C - 2 ml de milieu d'incubation).

La radioactivité retenue par le filtre "blanc" de l'expérience 1 est beaucoup trop importante par rapport aux filtres chargés d'A.D.N.

De même, la radioactivité retenue par les filtres chargés d'A.D.N. homologue est élevée, puisqu'elle correspond à environ 70 % de la radioactivité totale incorporée avec l' ^3H -A.D.N. de C_{17} dans le milieu d'incubation (activité spécifique particulièrement faible dans cette expérience : 24080 cpm) alors que d'après STALEY et COLWELL (1973) cette valeur devrait se ranger entre 40 et 60 %.

Il semble possible, toutefois, de tenir compte de ces résultats dans une analyse comparative, puisque la radioactivité relative est également très élevée pour le filtre chargé de l'A.D.N. de C₂₀, phénotypiquement identique à C₁₇, alors qu'elle est beaucoup plus faible pour les 3 souches de collection (XAV = Xanthomonas vasculorum, BAS = Bacterium anitratum et AGR = Agrobacterium rhizogenes)

D'autres expériences d'hybridation ont donné des résultats qui permettent de renforcer la comparaison précédente (tableau 16).

	Origine de l'A.D.N. immobilisé sur filtre					" blanc "
	C ₁₇	C ₂₀	PSM	BAS	AGR	
Radioactivité adsorbée en cpm	2378	1254	1053	666	490	360

Tableau 16.

Radioactivité (en cpm) retenue par des filtres chargés de 180 µg d'A.D.N. de diverses souches mis en présence de ≈ 3 µg d'³H-A.D.N. de C₁₇. Les valeurs indiquées sont les moyennes de 3 exemplaires. (incubation de 24 h. à 71°C - 2 ml. de milieu d'incubation).

Par contre, la radioactivité adsorbée par les filtres chargés de l'A.D.N. de C₂₀ est étonnamment faible par rapport au système homologue, comme elle est faible pour l'ensemble des filtres en comparaison avec les résultats homologues. Quant à l'A.D.N. de Pseudomonas maltophilia (P.S.M.), c'est parmi les A.D.N. des souches de collection, celui qui retient relativement le plus d'³H-A.D.N. de C₁₇ (plus du double de l'A.D.N. d'AGR et une fois et demie celui de BAS). Cependant son pourcentage d'homologie (défini p. 62) n'étant que de 34 % $\left(\frac{1053 - 360}{2378 - 360} \times 100 \right)$ et les écarts de radioactivité entre les filtres chargés des A.D.N. de C₁₇ et de C₂₀ étant importants, nous avons entrepris d'autres expériences.

Le tableau 17 permet, en effet, de penser que la radioactivité retenue par les filtres chargés de l'A.D.N. de C_{17} dans l'expérience précédente est relativement élevée.

	Origine de l'A.D.N. sur filtre		
	C_{17}	PSM	"Blanc"
Radioactivité adsorbée en cpm	1403	1159	519

Tableau 17

Radioactivité (en cpm) des filtres chargés de 150 μg d'A.D.N. de C_{17} et de PSM mis en présence de $\approx 3 \mu\text{g}$ d' ^3H -A.D.N. de C_{17} . Les valeurs indiquées sont les moyennes de 3 exemplaires. (incubation de 24 h. à 71°C - 2 ml de milieu d'incubation).

Si nous calculons le pourcentage d'homologie entre les A.D.N. de C_{17} et de PSM, nous obtenons cette fois :

$$\frac{1159 - 519}{1403 - 519} \times 100 \approx 72 \%$$

2. RESULTATS DES HYBRIDATIONS EFFECTUEES A "BASSE TEMPERATURE" (62°C)

Comme nous l'avons mentionné précédemment, après des essais infructueux de la méthode "double-filtre", de MURATA et STARR (1973), nous avons entrepris des expériences d'hybridation à température relativement basse en incorporant dans le milieu d'incubation du DMSO (procédé de LEGAULT-DEMARE et coll.).

Les résultats obtenus dans une expérience préliminaire sont rapportés dans le tableau 18.

	Origine de l'A.D.N. sur filtre			"Blanc"
	C_{17}	PSM	BAS	
Radioactivité adsorbée en cpm	4160	2623	1201	1046

Tableau 18

Radioactivité (en cpm) des filtres chargés de 110 μg d'A.D.N. de diverses souches mis en présence de 3 μg d' ^3H -ADN de C_{17} . Les valeurs indiquées sont les moyennes de 6 exemplaires. (incubation de 20 h. à 62°C - 2 ml de [SSC x 2 - DMSO]),

Il en ressort définitivement que l'A.D.N. de B.A.S. (Bacterium anitratum) ne présente aucune analogie avec l'A.D.N. de C₁₇ (5% d'homologie) et on calcule 50% d'homologie entre les A.D.N. de C₁₇ et de PSM (Pseudomonas maltophilia).

Le tableau 19 rassemble d'autres résultats qui confirment ce pourcentage d'homologie, puisque nous obtenons alors 49%.

	Origine de l'A.D.N. sur filtre		
	C17	PSM	"Blanc"
Radioactivité adsorbée en cpm	3366	2129	944

Tableau 19

Radioactivité (en cpm) des filtres chargés de 150 µg d'A.D.N. de C₁₇ ou de PSM, mis en présence de 3 µg d'³H-ADN de C₁₇. Les valeurs indiquées sont les moyennes de 6 exemplaires. (incubation de 20 h à 62°C - 2 ml de [SSC x 2 - DMSO])

Dans un dernier temps, nous avons essayé de réaliser des hybridations en présence d'un A.D.N. "compétitif". Le protocole expérimental est suivi de la même façon, mais on incorpore au milieu d'incubation, en même temps que l'³H-ADN, un excès d'A.D.N. homologue ou hétérologue, non marqué, fragmenté et dénaturé. On empêche ainsi, partiellement, l'hybridation entre l'A.D.N. fixé sur le filtre et l'³H-A.D.N., car il y a compétition pour les sites complémentaires de l'A.D.N. immobilisé sur le filtre. La réduction de cette hybridation est donc proportionnelle à la complémentarité des séquences nucléotidiques des A.D.N. marqué et non marqué.

En considérant les résultats indiqués dans le tableau 20, nous constatons que la présence d'A.D.N. "compétitif" intervient peu sur l'hybridation entre l'³H-ADN de C₁₇ et l'A.D.N. fixé sur filtre de C₁₇ (système homologue). Toutefois, on peut remarquer que l'A.D.N. "compétitif" homologue (C₁₇) inhibe légèrement plus l'hybridation que l'A.D.N. "compétitif" hétérologue (PSM).

Si nous appliquons la formule utilisée par DE LEY et TIJTGAT (1970), par JOHNSON et coll. (1970) ainsi que par PECKNOLD et GROGAN (1973) pour calculer le pourcentage d'homologie en établissant le rapport entre la différence des radioactivités produites par l'incorporation d'A.D.N. "compétitif" hétérologue (12078-11559) et la différence des radioactivités causée par l'A.D.N. "compétitif" homologue (12078-11060), nous obtenons un pourcentage d'homologie de 50 %.

Ce résultat aurait sans doute été amélioré si nous avions ajouté une quantité d'A.D.N. "compétitif" plus importante (150 μ g par filtre selon PECKNOLD et GROGAN, 1973) mais nos solutions d'A.D.N. initiales n'étaient pas suffisamment concentrées. Aussi n'avons-nous probablement pas obtenu l'effet de saturation souhaitable par l'A.D.N. "compétitif" qui n'était pas suffisamment en excès.

filtre chargé de 110 μ g d'A.D.N.	A.D.N. en solution		Radioactivité adsorbée en cpm
	Radioactif 6 μ g	"Compétitif" 25 μ g	
C17	C17	0	12078
C17	C17	PSM	11559
C17	C17	C17	11060
PSM	C17	0	6848
"blanc"	C17	0	1270

Tableau 20

Radioactivité (en cpm) des filtres chargés d'A.D.N. de C17 ou PSM mis en présence d'³H-ADN et d'A.D.N. "compétitif" ou non.
Les valeurs indiquées sont les moyennes de 3 exemplaires.
(Incubation pendant 20 h à 62°C - 2 ml de [SSC x 2 - DMSO])

Notons au passage que cette dernière expérience nous permet de calculer le pourcentage d'homologie entre les A.D.N. de C17 et de PSM selon les conditions précédentes (sans A.D.N. "compétitif") ce qui donne:

$$\frac{6848 - 1270}{12078 - 1270} \times 100 \approx 51\%$$
, en accord avec les résultats antérieurs.

D I S C U S S I O N

I. APPORTS DES EXPERIENCES D'HYBRIDATION

Sur le plan technique, les expériences d'hybridation sont délicates, compte tenu surtout des nombreux paramètres qui interviennent.

Les résultats que nous avons obtenus, illustrent ces difficultés qui sont accrues par l'utilisation d'une température d'incubation élevée du fait du contenu important en guanine + cytosine de nos souches. En effet, le travail à température élevée augmente les risques de relâchement de l'A.D.N. fixé au filtre, ce qui explique la variabilité de nos premiers résultats (hybridations à 71°C).

L'emploi de diméthylsulfoxyde (DMSO) peut résoudre partiellement ce problème.

La température que nous avons fixée à 62°C pour l'incubation dans (SSC x 2 - DMSO) est peut-être encore trop forte et peut expliquer la faible radioactivité retenue par les filtres chargés. En effet, PECKNOLD et GROGAN (1973), travaillant sur des Pseudomonas, ont réalisé leurs expériences d'hybridation à deux températures différentes : 63-64°C et 53-54°C, pendant 16 h. et ils ont constaté que :

1) à la température la moins élevée, correspondant à $T_m(\text{SSC} \times 2 - \text{DMSO}) - 25^\circ\text{C}$, 80 % et plus de l'A.D.N. fixé était retenu au filtre en fin d'incubation, alors qu'il n'y en avait que 70 % avec une température de 63-64°C.

2) par contre, cette dernière température, dite "rigoureuse", correspondant à $T_m(\text{SSC} \times 2 - \text{DMSO}) - 15^\circ\text{C}$, ne permet la formation de molécules hybrides qu'entre des séquences nucléotidiques parfaitement complémentaires, la spécificité étant moindre pour des températures plus basses, mais l'hybridation optimale.

BRENNER (1973) insiste également sur le rôle de la température d'incubation ainsi que sur la pureté de l'A.D.N. employé dans les expériences d'hybridation. Il précise, en particulier, qu'il peut être dangereux, pour cette raison, d'assi-

miler le degré de formation de molécules hybrides entre 2 chaînes d'A.D.N. hétérologues avec le degré d'homologie entre les 2 organismes correspondants.

Réalisant des hybridations à trois températures différentes, il a montré qu'une augmentation de 15°C entraînait une hybridation 4 à 6 fois moins importante qu'à la température la plus basse. Certes, plus les organismes sont effectivement homologues, moins la température d'incubation a d'effet, puisque les molécules hybrides formées sont parfaitement réassociées et donc très stables.

Sur le plan technique, notre méthodologie mériterait d'être affinée en effectuant des hybridations à température plus basse en présence de (SSC x 2 - DMSO) avec la compétition d'un excès important d'A.D.N. homologue ou hétérologue.

Mais, en fonction de l'objectif que nous nous étions proposé, les résultats sont suffisants pour établir par rapport à la souche-type C₁₇ :

- une homologie relative avec Pseudomonas maltophilia
 - une absence d'homologie avec Bacterium anitratum et Agrobacterium rhizogenes
 - une homologie partielle avec Xanthomonas vasculorum
- mais il faut préciser que cette espèce présente un phénotype assez différent de C₁₇.

II. ANALOGIES PHENOTYPIQUES COMPLEMENTAIRES ENTRE C₁₇ ET PSEUDOMONAS MALTOPHILIA

Lorsque nous avons relevé comme genre bactérien à % GC élevé les Pseudomonas, le choix de l'espèce s'est effectué en fonction des similitudes phénotypiques répertoriées pour cette espèce.

Nous avons consulté pour cela les travaux de STANIER et coll. (1966) et le Bergey's manual (8e édition, 1974).

Ce dernier fait état de 4 groupes différents dans le genre Pseudomonas, le 4e regroupant des espèces exigeantes en un ou plusieurs facteurs de croissance. Trois espèces y sont incluses :

- P. maltophilia
- P. vesicularis
- P. diminuta

De ces 3 espèces, la première nous intéresse plus particulièrement car elle hydrolyse la gélatine et ne présente pas de cytochrome-oxydase, comme les souches du phénon 3, caractères qui nous ont conduits à choisir cette souche pour les expériences d'hybridation.

En fonction des résultats obtenus, nous avons alors comparé en détail son phénotype à celui de la souche type C₁₇ ainsi qu'à celui de l'ensemble du phénon 3 (tableau 21) et nous nous sommes arrêtés sur les divergences.

1. la mobilité

Tous les auteurs signalent la présence de plus d'un flagelle chez P. maltophilia.

Dans la première partie de ce mémoire, nous avons déjà noté le problème posé par la mobilité dont la mise en évidence est délicate (LATHAM et JOHNSTONE, 1972) surtout pour les germes d'origine tellurique, lorsqu'on emploie des méthodes de détection simples.

Nous avons alors effectué une coloration de cils selon la technique de Rhodes (dans BUTTIAUX et coll., 1966) pour C₁₇ et PSM uniquement. Dans chacun des cas, nous avons observé des bactéries présentant au moins 2 flagelles en position polaire, tout à fait semblables aux images proposées par HUGH et LEIFSON (1963) et par IIZUKA et KOMAGATA (1964).

2. la pigmentation

Le Bergey's manual ainsi que d'autres auteurs précisent que les colonies de P. maltophilia peuvent être jaunissantes, ce qui est exact pour l'ensemble des souches du phénon 3, mais la pigmentation étant peu prononcée, la réponse au caractère PINS a été considérée comme négative. D'ailleurs, IIZUKA et KOMAGATA (1964) ont inclus P. maltophilia au groupe "achromogène" du genre Pseudomonas.

TESTS	Ph ₃	C ₁₇	Bergey's manual 1974	<u>Pseudomonas maltophilia</u>				
				Komagata et coll. 1974	Kekessy 1972	Gilardi 1970	Stanier et coll. 1966	Hugh et Leifson 1963
1. MOBI	+	+	+	+	+	+	+	+
2. PISF	-	+	+	+	-	-	-	-
3. PISM	+	-	-	-	-	+	-	-
4. PINS	-	-	j	j	-	j	-	j
6. COXY	(-)	-	-	-	-	-	-	-
7. UREA	-	-	-	-	+	-	-	-
9. CATA	+	+	-	-	+	+	-	+
10. GELA	(+)	+	(+)	+	+	+	+	+
11. PAMY	(-)	-	(-)	-	-	-	-	-
12. PDNA	+	+	-	+	+	+	-	-
14. PLIP	+	+	+	+	+	+	+	-
23. UBEL	+	+	-	-	-	-	-	-
36. MGAA	+	+	meth+	meth+	meth+	meth+	meth+	meth+
40. ARG1	-	-	-	-	-	-	-	-
42. NITR	+	+	-	(+)	+	-	-	+
50. DELY	+	-	-	+	+	+	-	+
51. DNIT	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLEAU 21



Comparaison de quelques caractères du phénon 3 et de la souche-type C₁₇ avec ceux de Pseudomonas maltophilia

- + : toutes les souches répondent positivement
- : toutes les souches répondent négativement
- ± : réponse variable
- (+) : la majorité des souches répondent positivement
- (-) : la majorité des souches répondent négativement
- j : jaune clair
- meth : méthionine

De plus, 31,7 % d'entre elles produisent un pigment brunâtre diffusible dans le milieu gélosé, dont la nature est probablement proche des mélanines, ce que signale également GILARDI (1970) mais pas comme un caractère spécifique.

3. l'exigence en acides aminés

Cette exigence caractérise aussi bien nos souches que P. maltophilia mais celui-ci requiert spécifiquement un seul acide aminé : la méthionine. Nous avons donc étudié en détail le comportement de nos souches en fonction de cette exigence. Toutes les souches, sauf 3 (A₄, D₁₁ et H₈ également COXY+) se sont développées sur MMB (milieu de Owens et Keddie) additionné de glucose RAL (4 g/l) et de méthionine (20 mg/l, concentration précisée par STANIER et coll. 1966). Nous avons alors essayé de localiser à quel niveau était bloquée la synthèse de la méthionine sur le plan métabolique. Nous n'avons pu qu'observer que l'homosérine remplaçant la méthionine ne suffit pas pour stimuler la croissance alors que la L-cystéine ou la L-cystine provoque la croissance de toutes les souches exceptées les 3 signalées précédemment.

IIZUKA et KOMAGATA (1964) qui sont les premiers à rapporter l'exigence de P. maltophilia, précisaient d'ailleurs : méthionine ou cystine.

4. l'utilisation de benzoate

STANIER et coll. (1966) notent l'absence de développement de P. maltophilia lorsque des composés aromatiques sont utilisés comme seule source de carbone organique, et PALLERONI et DOUDOROFF (1972) précisent l'extrême toxicité de ce composé pour ces organismes.

Or, toutes les souches du phénon 3 se sont montrées aptes à utiliser du benzoate lorsqu'il était incorporé au milieu de Christensen.

Nous avons repris cette analyse en réalisant le test cette fois en milieu liquide. Nous avonsensemencé nos souches sur trois milieux différents :

- MMB (milieu de Owens et Keddie) + méthionine (20 mg/l)
+ glucose RAL (4 g/l)
- MMB + méthionine (20 mg/l) + benzoate (2 g/l, concentration indiquée par IIZUKA et KOMAGATA, 1963)

- MMB + méthionine (20 mg/l) + glucose RAL (8 mg/l)
+ benzoate (2 g/l)

Le premier milieu sert de témoin positif puisque toutes les souches y poussent. Au bout de 7 jours d'incubation à 28°C, on n'observe aucune croissance sur le 2e milieu et un léger louche dans le 3e, l'adjonction de glucose à l'état de traces n'ayant pas suffi pour induire la culture.

Le benzoate ne peut donc pas être utilisé comme seule source de C organique, mais il ne semble pas qu'il soit toxique pour les souches puisqu'incorporé au milieu de Christensen, riche par lui-même en glucose et en extrait de levure, il n'empêche pas la croissance.

5. présence de Lysine-décarboxylase

Ce caractère phénotypique auquel répondaient positivement seulement 21,95 % des souches du phénon 3, nous a paru important à revoir car de nombreux auteurs le signalent comme un des critères d'identification de P. maltophilia (GILARDI, 1970 - KEKESY, 1972 - KOMAGATA et coll. 1974) et AL DELAIMI (thèse, 1975) précise que seuls P. cepacia et P. maltophilia sont dotés de lysine décarboxylase.

En reprenant la technique utilisée pour l'étude systématique de souches telluriques à Gram - dans la première partie, nous nous sommes rendus compte que la durée d'incubation avait une importance primordiale pour la lecture de ce test. Après 18 h. d'incubation dans le milieu Lysine Taylor, la cadavérine, produit du catabolisme, a été mise en évidence par la ninhydrine pour les souches du phénon 3 et PSM, d'autres souches servant de témoins négatifs (DELY-). Par contre, une incubation prolongée provoque le catabolisme de la cadavérine pour la plupart de nos souches, si bien qu'elle ne peut plus être mise en évidence, d'où l'explication de nos premiers résultats.

6. Autres caractéristiques

Quelques nouveaux tests fréquemment cités pour la caractérisation de P. maltophilia ont également été effectués.

Ce sont :

- l'hydrolyse de l'esculine signalée par GILARDI, 1970 -

SNEATH et COLLINS, 1974. KEKESY (1972) précise même que ce caractère est spécifique de cette espèce parmi le genre Pseudomonas. Or, l'ensemble du phénon 3 hydrolyse fortement l'esculine en un ou trois jours (méthode rapportée dans BUTTIAUX et coll., 1966).

- l'utilisation du lactose, notée en particulier par LOWE et INGLEDEW (1975), STANIER et coll. (1966) qui précisent que le catabolisme du lactose chez P. maltophilia s'arrêterait au galactose par insuffisance ou absence de β galactosidase. Toutes les souches du phénon 3 sauf A₄, D₁₁ et H₈ peuvent utiliser le lactose comme source de carbone.

- l'hydrolyse de la caséine, spécifique de P. maltophilia et P. pseudomallei (GILARDI, 1970) a été également obtenue pour le phénon 3. (méthode rapportée dans BUTTIAUX et coll., 1966).

C O N C L U S I O N

Les essais d'hybridation entre l'A.D.N. de notre souche-type C₁₇ et l'A.D.N. de diverses souches taxonomiquement bien définies nous conduisent donc à établir une parenté entre le phénon 3 et P. maltophilia.

Sur le plan du biotope, AL DELAIMI (thèse, 1975) analysant la place du germe Pseudomonas dans l'environnement, note que P. maltophilia est "une bactérie ubiquitaire". En effet, si la plupart des souches répertoriées comme P. maltophilia sont d'origine clinique, le fait d'en isoler à partir de l'eau et du lait suggère qu'il serait largement dispersé dans la nature (STANIER et coll., 1966 et GILARDI, 1968). Signalons qu'il a également été signalé dans des résidus aquatiques enrichis en pétrole (IIZUKA et KOMAGATA, 1964) et que FENTON et coll. (1973) ont proposé ce nom d'espèce pour une souche isolée du sol par PRAMER et STARKEY (1951).

Sur le plan de la classification, HUGH et LEIFSON (1963) ont évoqué les problèmes de nomenclature posés par cette espèce qui avait d'abord été décrite sous le nom de Xanthomonas maltophilia en 1953 ou comme une espèce mobile de Alcaligènes.

KEKESSY (1972) signale aussi que P. maltophilia était en général confondu avec les espèces du groupe Alcaligènes-Achromobacter et KOMAGATA et coll. (1974) proposent pour P. melanogena le synonyme de P. maltophilia.

En considérant ces problèmes de nomenclature et de situation écologique propres à cette espèce, il semble que des expériences d'hybridation plus fines entre la souche-type du phénon 3 et des P. maltophilia de diverses provenances, pourraient apporter des indications intéressantes.

C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S

Le premier objectif de notre travail était d'entreprendre, à l'aide d'une méthode numérique, une étude taxonomique de germes à Gram-négatif non fermentants des sols de notre région. Celle-ci a abouti à l'individualisation de deux groupements taxonomiques importants :

- l'un identifiable au genre Pseudomonas du type fluorescent qui a souvent été signalé en tant que genre tellurique dominant.

- l'autre, dont les caractères phénotypiques n'étaient pas suffisants pour une identification précise, a été soumis, dans un second objectif, à des études physico-chimiques du génome et à des recherches d'homologie avec une bactérie connue. L'ensemble des résultats permet de l'apparenter à Pseudomonas maltophilia.

Notre travail a permis la mise au point d'une "clé" qui sera utile pour l'étude de ce dernier phénon très bien représenté dans la flore hétérotrophe du sol. L'ordre des tests proposé dans cette "clé" a été choisi de façon à aboutir le plus simplement à la plus grande rapidité d'identification qui passe par les étapes suivantes :

1°) Toutes les souches pigmentées sont d'abord éliminées (pigments diffusibles fluorescents et pigments non diffusibles apparaissant dès le début de l'incubation)

2°) Toutes les souches ne présentant pas d'exigences nutritionnelles sont rejetées (en employant la méthode des répliques sur milieu minimum et sur milieu enrichi en méthionine).

3°) La recherche de la cytochrome-oxydase conduit ensuite à l'élimination des souches donnant une réponse positive.

4°) A partir des souches cytochrome-oxydase (-), on ne conserve alors que celles qui donnent une réaction négative au Gram.

5°) Le test de Hugh et Leifson permet éventuellement l'élimination des souches fermentant le glucose.

6°) Enfin, la présence de gélatinase est utilisée comme dernier critère discriminatif de ce phénon.

Sur les souches ainsi sélectionnées, d'autres tests complémentaires ont été effectués, tels que la mise en évidence de la lipase et la réduction du lait. Ils ont confirmé la validité de cette démarche expérimentale.

Etant données les exigences en acides aminés de ces souches, particularité biochimique qui les oppose aux Pseudo-monas fluorescents, il était intéressant d'examiner les conditions de prolifération par des données écologiques. Anticipant sur un futur développement de nos travaux, nous avons recherché des germes du phénon 3 dans les zones rhizosphériques qui sont enrichies en substances organiques excrétées par les plantes.

Nous l'avons fait d'abord dans une "terre rhizosphérique proche" de choux et dans la terre témoin correspondante en appliquant la clé de détermination proposée ci-dessus. Sur un nombre total de 172 souches d'origine rhizosphérique et de 179 souches de la terre témoin, nous avons identifié respectivement 4 et 3 souches hétérotrophes assimilables au phénon 3.

Ensuite, nous avons comparé une "terre rhizosphérique proche" de betterave sucrière et la terre témoin correspondante. Sur 132 souches isolées de part et d'autre, nous avons sélectionné 10 bactéries assimilables au phénon 3 dans la terre rhizosphérique et seulement 4 dans la terre témoin.

Il semble donc qu'effectivement un enrichissement du sol en acides aminés favorise la prolifération de ces germes. Il serait intéressant d'entreprendre des analyses semblables au niveau de sites écologiques différents en fonction de ces exigences nutritionnelles.

Quant au rôle éventuel de ces bactéries dans le sol, il n'a pas été abordé mais il est possible de suggérer, compte tenu de leur équipement enzymatique particulier (potentialités protéolytique et lipolytique), leur rôle éventuel dans des processus de dégradation, parallèles ou complémentaires à ceux des Pseudomonas fluorescents.

Enfin, certaines de ces bactéries produisant des pigments solubles proches des mélanines; peut-être pourraient-elles aussi contribuer secondairement à la formation du complexe humique.

Outre les précisions systématiques sur la microflore du sol qu'ont ainsi apporté ces travaux, l'accent a donc été mis sur un groupement dominant apparenté à l'espèce Pseudomonas maltophilia dont l'aspect écologique serait intéressant à développer.

BIBLIOGRAPHIE

- AL DELAIMI, K. 1975. Méthodes de diagnostic en bactériologie générale. Application à l'étude des Pseudomonas fluorescents. Thèse. 3e cycle. Sci., Poitiers.
- BAUMAN, P., M. DOUDOROFF et R. Y. STANIER. 1968. A study of the Moraxella Group. II. Oxidative - negative species (genus Acinetobacter). J. Bacteriol. 95 : 1520-1541.
- BEAN, P.G., et J.R. EVERTON. 1969. Observations on taxonomy of chromogenic bacteria isolated from cannery environments. J. Bacteriol. 32 : 51-59.
- BENZECRI, J. P. 1973. L'analyse des données. Tomes 1 et 2 - Dunod Ed. Paris. 615 et 619 p.
- BERNAERTS, M. J. et J. DE LEY. 1963. A biochemical test for crown-gall bacteria. Nature (Lond.) 197 : 406-407.
- BERNARDI, G. 1965. Chromatography of nucleic acids on hydroxyapatite. Nature. 206 : 779-783.
- BOHACEK, J., M. KOCUR et T. MARTINEC. 1967. DNA base composition and taxonomy of some micrococci. J-Gen. Microbiol. 46 : 369-376.
- BOHACEK, J., O. MRAZ et K. RASIN. 1970. Contribution to the study on deoxy-ribonucleic acid base composition of Pseudomonas mallei and Achromobacter (Acinetobacter) anitratus. Acta Vet. Brno. 39: 29-33.
- BØVRE, K., M. FIANDT et W. SZYBALSKI. 1969. DNA base composition of Nisseria, Moraxella and Acinetobacter, as determined by measurement of buoyant density in CsCl gradients. Can. J. Microbiol. 15 : 335-338.
- BOWIE, J.S., M.R. GRIGOR, G.G. DUNCKLEY, M.W. LOUTIT et J.S. LOUTIT. 1972. The DNA base composition and fatty acid constitution of some gram-positive pleomorphic soil bacteria. Soil Biol. Biochim. vol. 4 : 397-412.
- BREED, R.S., E.G.D. MURRAY et N.R. SMITH. 1957. Bergey's manual of determinative bacteriology (7e edit.). Williams et Wilkins Co, Baltimore.
- BRENNER, J. 1973. DNA reassociation in the taxonomy of Enteric bacteria. Intern. J. Syst. Bacteriol. 23 : n° 4, 298-307.
- BRISOU, J. 1957. Contribution à l'étude de la systématique des Pseudomonadacea. Ann. Inst. Pasteur, (Paris), 93 : 397-404.

- BRISOU, J., et A. R. PREVOT. 1954. Etudes de systématique bactérienne. X. Révision des espèces réunies dans le genre *Achromobacter*. Ann. Inst. Pasteur (Paris), 86 : 722-728.
- BUCHANAN, R.E. et N.E. GIBBOWS. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology (8e édit.). Williams et Wilkins Co, Baltimore.
- BUNT, J. S., et A. D. ROVIRA. 1955. Microbiological studies of some subantarctic soils. J. Soil Sci. 6 : 119-128.
- BUTTIAUX, R., et J. VANDEPITTE. 1960. Les *Flavobacterium* dans les méningites épidémiques des nouveaux-nés. Ann. Inst. Pasteur (Paris), 98 : 398-404.
- BUTTIAUX, R., H. BEERENS et A. TAQUET. 1966. Manuel de techniques bactériologiques. 2e édit. Flammarion Edit.
- CHARGAFF E. 1955. The nucleic acids. Chargaff et Dandson. Ed. Academic Press. New-York.
- CHRISTENSEN, P. J., et F. D. COOK. 1972. The isolation and enumeration of *Cytophagas*. Can. J. Microbiol. 18 : 1933-1940.
- COLWELL, R. R. 1973. Genetic and phenetic classification of bacteria. Advan. Appl. Microbiol. 16 : 137-175.
- COLWELL, R. R., R. V. CITARELLA et I. RYMAN. 1965. Deoxyribonucleic acid base composition and adansonian analysis of heterotrophic, aerobic pseudomonads. J. Bacteriol. 90 : 1148-1149.
- COLWELL, R. R. et M. MANDEL. 1964. Adansonian analysis and deoxyribonucleic acid composition of some Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 67 : 1412-1422.
- COOPER, T. G. 1972. Procedure for uniform binding of DNA to nitrocellulose filters. Ann. Biochim. 47 : 481-486.
- DE LEY, J. 1969. Compositional nucleotide distribution and the theoretical prediction of homology in bacterial DNA. J. Theor. Biol. 22 : 89-116.
- DE LEY, J. 1970. Reexamination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 101, n° 3 : 738-754.
- DE LEY, J., M. BERNAERTS, A. RASSEL et J. GUILMOT. 1966. Taxonomy of the *Agrobacterium*. J. Gen. Microbiol. 43 : 7-17.
- DE LEY, J. et R. TIJTGAT. 1970. Evaluation of membrane filter methods for DNA-DNA hybridization. Antonie van Leeuwenhoek - 36 : 461-474.
- DE LEY, J., R. TIJTGAT, J. DE SMEDT et M. MICHIELS. 1973. Thermal stability of DNA = DNA hybrids with the genus *Agrobacterium*. J. Gen. Microbiol. 78 : 241-252.
- DE LEY, J. et J. VAN MUYLEM. 1963. Some applications of deoxyribonucleic acid base composition in bacterial taxonomy. Antonie van Leeuwenhoek ; J. Microbiol. serol. 29 : 344-358.

- DENHARDT, D.T. 1966. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 23 : 641-646.
- DISCHE, Z. 1953. Qualitative and quantitative colorimetric determination of heptoses. *J. Biol. Chem.* 204 : 983-997.
- FENTON, J. J., H. H. HARSCH et KLEIN DOLPH. 1973. Production of volatile nitrogenous compounds from the degradation of streptomycin by *Pseudomonas maltophilia*. *J. Bacteriol.* 116 : 1267-1272.
- FREDERICQ, E., A. OTH et F. FONTAINE. 1961. The ultraviolet spectrum of deoxyribonucleic acids and their constituents. *J. Molec. Biol.* 3 : 11.
- GASSER, F. et M. MANDEL. 1968. Deoxyribonucleic acid base composition of the genus *Lactobacillus*. *J. Bacteriol.* 96 : 580-588.
- GAVINI, F. 1972. Contribution à l'étude taxinomique des groupes *Cytophaga-Flavobacterium-Xanthomonas*. Thèse doctorat Pharmacie, Lille.
- GIBBINS, ANN. M. et K. F. GREGORY. 1972. Relatedness among *Rhizobium* and *Agrobacterium* species determined by three methods of nucleic acid hybridization. *J. Bacteriol.* 111 : 129-142.
- GILARDI, G. L. 1968. Diagnostic Criteria for differentiation of *Pseudomonads* pathogenic for man. *Appl. Microbiol.* 16 : n° 10, 1497-1502.
- GILARDI, G. L. 1969. Characterization of the oxidase-negative, Gram negative coccobacilli (the *Achromobacter-Acinetobacter* group). *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 35 : 421-429.
- GILARDI, G. L. 1971. Characterization of non fermentative non fastidious, Gram-negative bacteria encountered in medical bacteriology. *J. appl. Bacteriol.* 34 (3) : 623-644.
- GILLESPIE, D. 1968. The formation and detection of DNA-RNA hybrids. *Methods in Enzymology.* 12 : 641-668.
- GILLESPIE, D. et S. SPIEGELMAN. 1965. A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. Mol. Biol.* 12 : 829-842.
- GOODMAN, Y. E. 1972. Bacterial identification : clues from computers and chemistry. *Can. J. Medic.* 34, n° 1 : 2-16.
- GROSS, W. M. et L. G. WAYNE. 1970. Nucleic acid homology in the genus *Mycobacterium*. *J. Bacteriol.* 104, n° 2, 630-634.
- GYLLENBERG, H. G., et V. RAURAMAA. 1966. Taxometric models of bacterial soil populations. *Acta Agric. Scand.* 16 : 30-38.
- HEBERLEIN, G. T., J. DE LEY et R. TIJTGAT. 1967. DNA homology and taxonomy of *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Chromobacterium*. *J. Bacteriol.* 94 : 116 - 124.
- HENDRIE, M. S., W. HODGKISS et J. M. SHEWAN. 1964. Considerations on organisms of the *Achromobacter-Alcaligenes* group. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 15 : 43-60.

- HILL, L. R. 1966. An index to deoxyribonucleic acid base compositions of bacterial species. *J. gen. Microbiol.* 44 : 419-437.
- HILL, L. R. 1968. The determination of deoxyribonucleic acid base compositions and its application to bacterial taxonomy. *Identif. Methods for microbiologists. Part B. Acad. Press. (Lond. N-Y)* 177-186.
- HIRSCHMAN, S. Z. et G. FELSENFELD. 1966. Determination of DNA composition and concentration by spectral analysis. *J. Mol. Biol.* 16 : 347-358.
- HUGH, R. 1970. A practical approach to the identification of certain nonfermentative Gram-negative rods encountered in clinical specimens. *Public Health Lab.* 28 : 168-187.
- HUGH, R. et E. LEIFSON. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbo-hydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 66 : 24-26.
- HUGH, R. et E. LEIFSON. 1963. A description of the type strain of *Pseudomonas maltophilia*. *Intern. Bull. of Bacteriol. Nom. et Taxon.* 13 : n° 3, 133-138.
- HUGH, R. et R. REESE. 1967. Designation of the type strain for *Bacterium anitratum* Schaub and Hauber 1948. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 17 : 245-254.
- HUGH, R. et R. REESE. 1968. A comparison of 120 strains of *Bacterium anitratum* Schaub and Hauber with the type strain of this species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18 : 207-229.
- IIZUKA, H. et K. KOMAGATA. 1963. Taxonomy of genus *Pseudomonas* with special reference to their modes of metabolism of carbon compounds. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 9 : 83-95.
- IIZUKA, H. et K. KOMAGATA. 1964. Microbiological studies on petroleum and natural gas. I. Determination of hydrocarbon - utilizing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 10 : 207-221.
- JOHNSON, J.L., R.S. ANDERSON et E.J. ORDAL. 1970. Nucleic acid homologies among oxidase-negative *Moraxella* species. *J. Bacteriol.* 101 : 568-573.
- JONES, D. et P.H.A. SNEATH. 1970. Genetic transfer and bacterial taxonomy - *Bacteriol. Rev.* 34 : 40-81.
- JUNI, E. 1972. Interspecies transformation of *Acinetobacter* : genetic evidence for a ubiquitous genus. *J. Bacteriol.* 112 : 917-949.
- KATZNELSON, H., et B. BOSE. 1959. Metabolic activity and phosphate dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere and nonrhizosphere soil. *Can. J. Microbiol.* 5 : 79-85.
- KEKESY, D.A. 1972. Caractérisation de *Pseudomonas maltophilia*. *Path. Microbiol.* 38 : 17-18.
- KENNEDY, J. F. 1969. Liquid scintillation counting medium for aqueous samples. *Experientia*, 25 : n° 10, 1120.

- KOMAGATA, K., E. YABUUCHI, Y. TAMAGAWA et A. OHYAMA. 1974. Pseudomonas melanogena Iizuka and Komagata 1963, a later subjective synonym of Pseudomonas maltophilia Hugh and Ryschenkow 1960. Intern. J. Syst. Bacteriol. 24 : 242-247.
- KRIEG, R-E. et W.R. LOCKHART. 1970. Analysis of the thermal transition curves of deoxyribonucleic acid from microorganisms. Canad. J. Microbiol. 16 : 989-995.
- LATHAM, M. et G. F. JOHNSTONE. 1972. The determination of Bacterial mobility - Medical Laboratory Technology. 29 : 59-61.
- LEDERBERG, J., et E. M. LEDERBERG. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol. 63 : 187-190.
- LEGAULT-DEMARE, J., B. DESSEAUX, T. HEYMAN, S. SEROR et G. P. RESS. 1967. Studies on hybrid molecules of nucleic acids. I. DNA-DNA hybrids on nitrocellulose filters. Biochem. Biophys. Res. Comm. 28 : 550-557.
- LOCHHEAD, A. G. et F. E. CHASE. 1943. Qualitative studies of soil microorganisms V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora. Soil Sci. 55 : 185-195.
- LOWE, W. E. et W. M. INGLEDEW. 1975. Lactose utilization by Pseudomonas maltophilia. Intern. J. Syst. Bacteriol. 25 : 7-11.
- MANDEL, M. 1966. Deoxyribonucleic acid base composition in the genus Pseudomonas. J. Gen. Microbiol. 43 : 273.
- MANDEL, M., L. IGAMBI, J. BERGENDAHL, J.L. DODSON Jr et E. SCHELT GEN. 1970. Correlation of melting temperature and CsCl buoyant density of bacterial deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 101 : 333-338.
- MARMUR, J. 1961. A procedure for the isolation of DNA from organisms. J. Mol. Biol. 3 : 208-218.
- MARMUR, J. et P. DOTY. 1959. Heterogeneity in deoxyribonucleic acids. I. Dependence on composition of the configuration stability of deoxyribonucleic acids. Nature. 183 : 1427-1429.
- MARMUR, J. et P. DOTY. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol. 5 : 109 - 118.
- Mc MEEKING, T.A., D.B. STEWART et J.G. MURRAY. 1972. The adansonian taxonomy and the deoxyribonucleic acid base composition of some Gram-negative, yellow pigmented rods. J. Appl. Bacteriol. 35 : 129-138.
- MIYAZAWA, Y. et C.A. THOMAS. 1965. Composition of short segments of DNA molecules. J. Mol. Biol. 11 : 223-237.
- MOORE, M. B. et M. J. PICKETT. 1960. The Pseudomonas-Achromobacter Group. Can. J. Microbiol. 6 : 35-42.
- MURATA, N. et M.P. STARR. 1973. A concept of the genus Xanthomonas and its species in the light of segmental homology of DNA. Phytopath. Z. 77 : 285 - 323.

- OSTWAL, K. P. et U.P. BHIDE. 1972. Solubilization of tricalcium phosphate by soil Pseudomonads. Indian J. Exp. Biol. 10 : 153-154.
- PALLERONI, N. J., R.W. BALLARD, E. RALSTON et M. DOUDOROFF. 1972. Deoxyribonucleic acid homologies among some Pseudomonas species. J. Bacteriol. 110 : 1-11.
- PALLERONI, N. J., R. KUNISAWA, R. CONTOPOULOU et M. DOUDOROFF. 1973. Nucleic acid homologies in the genus Pseudomonas. Intern. J. Syst. Bacteriol. 23 : n° 4, 333-339.
- PECKNOLD, P.C. et R.G. GROGAN. 1973. Deoxyribonucleic acid homology groups among phytopathogenic Pseudomonas species. Intern. J. Syst. Bacteriol. 23 : n° 2, 111-121.
- PINTER, M., et J. DE LÉY. 1969. Overall similarity and D.N.A. base composition of some Acinetobacter strains. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 35 : 209-214.
- PRAMER, D. et R. L. STARKEY. 1951. Decomposition of streptomycin. Science. 113 : 127.
- QUADLING, C. 1960. Preservation of Xanthomonas by freezing in glycerol broth. Can. J. Microbiol. 6 : 475-478.
- QUETIER, F. 1970. Mise en évidence, isolement et propriétés de l'A.D.N. nucléaire satellite riche en G+C des végétaux supérieurs. Thèse Sci., Paris.
- ROMOND, C. 1965. Contribution à l'étude de la systématique des streptocoques anaérobies. Introduction d'un nouveau critère : la composition du DNA bactérien. Thèse Doctorat Pharmacie, Strasbourg.
- SAMUELS, S. B., B. PITTMAN, M. W. TATUM et W. B. CHERRY. 1972. Report on a study set of Moraxellae and allied bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 22 : 19-38.
- SAVITSKY, J. P. et F. STAND. 1965. A simple method for measuring ribonucleic acid content of preparations of deoxyribonucleic acid. Nature (London), 207 : 758-759.
- SCHILDKRAUT, C.L., J. MARMUR et P. DOTY. 1961. The formation of hybrid D.N.A. molecules and their use in studies of DNA homologies. J. Molec. Biol. 3 : 595-617.
- SCHILDKRAUT, C.L., J. MARMUR et P. DOTY. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. J. Mol. Biol. 4 : 430-443.
- SEIDLER, R.J. et M. MANDEL. 1971. Quantitative aspects of deoxyribonucleic acid renaturation : base composition, state of Chromosome replication and polynucleotide homologies. J. Bacteriol. 106 : 608-614.
- SHEWAN, J.M. et W.C. HAYNES. 1967. Report of the subcommittee on Pseudomonas and related organisms. Int. J. Syst. Bacteriol. 17 : 255-259.

- SHEWAN, J. M., G. HOBBS et W. HODGKISS. 1960. A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram negative bacteria, with special reference to the Pseudomonadaceae. J. Appl. Bacteriol. 23 : 379-390.
- SIERRA, G. 1957. A simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek ; J. Microbiol. Serol. 23 : 15-22.
- SKYRING, G. W. et C. QUADLING. 1970. Soil bacteria : principal component analysis and G.C contents of some Arthrobacter coryneform soil isolates and of some named cultures. Can. J. Microbiol. 16 : 95-106.
- SOKAL, R. R. et P. H. A. SNEATH. 1963. Principles of numerical taxonomy. Freeman, San Francisco. 359 p.
- SNEATH, P. H. A. 1957. Some thoughts on bacterial classification. J. Gen. Microbiol. 17 : 184-200.
- SNEATH, P. H. A. et R. R. SOKAL. 1962. Numerical taxonomy. Nature (Lond.) 193 : 855-860.
- SNEATH, P. H. A. et V. G. COLLINS. 1974. A study in test reproducibility between laboratories = Report of a Pseudomonas Working Party. Antonie van Leeuwenhoek. 40 : 481-527.
- SNELL, J. J. S., et S. P. LAPAGE. 1973. Carbon source utilization tests as an aid to the classification of non-fermenting Gram negative bacteria. J. Gen. Microbiol. 74 : 9-20.
- SOUMARE, S. et R. BLONDEAU. 1972. Caractéristiques microbiologiques des sols de la région du Nord de la France : importance des Arthrobacter. Ann. Inst. Pasteur (Paris), 123 : 239-249.
- SOUMARE, S., J. LOSFELD et R. BLONDEAU. 1973. Apports de la taxonomie numérique à l'étude du spectre bactérien de la microflore des sols du Nord de la France. Ann. Microbiol. 124B : 81-94.
- SOTTILE, M. L., J. N. BALDWIN et R. E. WEAVER. 1973. DNA hybridization studies in Flavobacterium meningosepticum. Appl. Microbiol. 26 : 535-539.
- STALEY, T. E. et R. R. COLWELL. 1973. Application of molecular genetics and numerical taxonomy to the classification of bacteria. Ann. Rev. Ecol. System. 4 : 273-300.
- STANIER, R. Y., N. I. PALLERONI et M. DOUDOROFF. 1966. The aerobic Pseudomonads : a taxonomic study. J. Gen. Microbiol. 43 : 159-271.
- STEEL, K. J. et S. T. COWAN. 1964. Le rattachement de Bacterium anitratum, Moraxella Lwoffii, Bacillus mallei et Haemophilus parapertussis au genre Acinetobacter Brisou et Prévot. Ann. Inst. Pasteur (Paris), 106 : 479-484.
- STRAUS, N. A. et T. I. BONNER. 1972. Temperature dependance of RNA-DNA hybridization kinetics. Biochim. Biophys. Acta. 277 : 87-95.

- SUNDMAN, V. 1968. Characterization of bacterial populations by means of factor profiles. Acta Agric. Scand. 18 : 22-32.
- THORNLEY, M. J. 1960. The differentiation of Pseudomonas from other Gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl. Bacteriol. 23 : 37-42.
- THORNLEY, M. J. 1967. A taxonomic study of Acinetobacter. J. Gen. Microbiol. 49 : 211-257.
- VERON, M. 1969. Taxonomie numérique et classification des bactéries. Ann. Inst. Pasteur (Paris). 67 : 2739-2766.
- WANG, S. Y. et J. M. HASHAGEN. 1964. The determination of the base composition of deoxyribonucleic acids by bromination. J. Mol. Biol. 8 : 333-340.
- WARSKOW, A. L. et E. JUNI. 1972. Nutritional requirements of Acinetobacter strains isolated from soil, water and sewage. J. Bacteriol. 112 : 1014-1016.

R E S U M E

Une étude taxonomique de bactéries telluriques à Gram négatif non fermentantes a permis par l'analyse factorielle des correspondances une répartition en 8 groupes bactériens homogènes (phénons) dont deux rassemblent environ les 2/3 des souches.

Parmi ces 2 phénons, le premier est assimilable au genre Pseudomonas du groupe fluorescent et le deuxième, par ses seuls caractères phénotypiques, n'a pu être identifié avec certitude.

En soumettant l'A.D.N. des souches de ce phénon à la dénaturation thermique, le coefficient de Shapiro-Chargaff a pu être calculé. En fonction des valeurs obtenues (% GC voisin de 65 %), des expériences d'hybridation entre cet A.D.N. et celui de souches de référence ont été entreprises en utilisant la méthode des membranes filtrantes en nitrocellulose. Les résultats obtenus conduisent à établir une similitude avec Pseudomonas maltophilia.