

N° d'ordre : 378

50376
1977
186

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1977
186

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ETAT ES SCIENCES

par

Jean-Pierre KUSNIERZ

ETUDE DES VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES
CHEZ ESCHERICHIA COLI K12
PENDANT LA CONJUGAISON



Membres du Jury :	MM. J. GUILLAUME	Président
	R. DEVORET	Rapporteur
	J. DE LAFONTEYNE	Rapporteur
	M. DURCHON	Examineur
	G. MARTIN	Examineur

Lille le 15 novembre 1977

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M. MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie

Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEPRez Gilbert	Physique Théorique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (Et Chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie

M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Géologie
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. FONTAINE Jacques	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GERVAIS Michel	Gestion des Entreprises
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
M ^{lle} LEGRAND Denise	Algèbre
M ^{lle} LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NOTELET Francis	Electrotechnique
M. NUSSEMBAUM Maurice	Sciences Economiques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie

M^{le} SPIK Geneviève
M. STANKIEWICZ François
M. STERBOUL François
M. TAILLEZ Roger
M. THERY Pierre
M. TOP Gérard
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. VILLETTE Michel
M. WALLART Francis
M. WERNER Georges
M^{me} ZIN-JUSTIN Nicole

Biochimie
Sciences Economiques
Informatique
Biologie
Electronique
Sciences Economiques
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Mécanique
Chimie
Informatique
Algèbre

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille sous la direction du Professeur J. Guillaume.

AVANT-PROPOS

La conjugaison bactérienne chez E. coli K 12 est un processus de transfert sexuel qu'il est possible de diviser schématiquement en plusieurs étapes :

- appariement des bactéries donatrices et réceptrices qui aboutit à la formation de couples conjugants.
- transfert de matériel génétique sous forme d'une chaîne de DNA monocaténaire de la bactérie donatrice à la bactérie réceptrice.
- recombinaison du DNA transféré avec le DNA de la bactérie réceptrice.

Nos recherches ont porté sur ce phénomène de transfert sexuel parce qu'il présente l'intérêt d'être un exemple exploitable de système intercellulaire de reconnaissance et d'interaction entre deux cellules. En effet le transfert de matériel génétique ne peut se faire qu'après contact et appariement des cellules bactériennes de sexe opposé. Nous avons étudié les états physiologiques des bactéries qui s'apparient pour conjuguer et les relations entre réplication et transfert de DNA chez les bactéries en croissance exponentielle.

De nombreux travaux ont permis d'élucider certains aspects du mécanisme de transfert de DNA mais très peu ont abordé le problème de la reconnaissance et de l'interaction des cellules pendant le processus d'appariement qui prélude au transfert génétique.

Nous nous sommes demandé si le phénomène de conjugaison se produit au hasard des rencontres des cellules au sein du milieu ou s'il existe un processus de reconnaissance déterminant la possibilité du transfert de DNA d'une cellule à l'autre. Nous avons plus particulièrement cherché à savoir si les bactéries femelles peuvent conjuguer à n'importe quel moment de leur cycle cellulaire ou seulement à un moment déterminé au cours duquel elles passeraient par un état de compétence à la conjugaison. Nous avons également essayé de préciser si au stade de l'appariement la bactérie femelle a un rôle actif dans le déclenchement du transfert de DNA chez la bactérie mâle en contact.

Peu d'études ont été consacrées à la coordination des fonctions cellulaires et du processus de transfert. Les résultats qui ont été publiés à propos de la nécessité d'une synthèse de DNA chez la bactérie donatrice concomitante du transfert, sont restés contradictoires. Les propriétés du DNA obtenu après transfert impliquent cependant la synthèse chez la bactérie donatrice d'un brin de DNA identique au brin transféré. Ceci est en accord avec le modèle d'une répllication spécifique de transfert dirigée par le facteur F. Dans la bactérie mâle en croissance, après le déclenchement, il pourrait donc exister deux types de répllications, l'une semi-conservative de type Θ bidirectionnelle, l'autre de transfert, de type , unidirectionnelle. Aucune relation n'ayant été clairement établie entre répllication végétative, répllication de transfert et processus de transfert de DNA, nous avons abordé le problème de l'interaction des réplicons F et bactériens qui peut résulter de la mise en route du processus de transfert chez une bactérie donatrice en croissance. Nous avons plus particulièrement essayé de savoir comment se poursuit la répllication semi conservative bidirectionnelle chez la bactérie donatrice, après la mise en route de la répllication de transfert unidirectionnelle lors du transfert d'un brin unique de DNA.

Au cours de ce travail, nous avons répondu aux deux questions principales évoquées ci-dessus.

Le transfert de DNA ne peut se dérouler entre bactéries donatrices et réceptrices qu'à la suite d'un processus de reconnaissance entre les deux cellules.

Il se produit, chez les bactéries Hfr conjugantes, une interaction entre les fourches de répllication végétative et celles de transfert, bloquant le déroulement de la répllication végétative et celui du transfert de DNA.

Nous avons plus particulièrement obtenu les résultats suivants :

Dans une population de bactéries réceptrices en phase exponentielle de croissance, seule une fraction de la population est capable de conjuguer à chaque instant.

Les bactéries réceptrices, au contraire des bactéries donatrices n'ont la capacité de conjuguer que pendant la période située entre la terminaison et la mise en route d'un cycle de répllication. L'état de

compétence pour la conjugaison revient donc cycliquement chez les bactéries réceptrices à chaque période de repos de la réplication. Nous avons appelé cette période, stade de compétence.

Chaque contact membranaire, établi lors de conjugaisons répétées entre bactéries réceptrices et bactéries donatrices, déclenche un cycle de transfert de DNA. Ceci permet de supposer l'existence d'un signal de conjugaison transmis de la bactérie réceptrice à la bactérie donatrice appariée, indiquant à celle-ci que le transfert de DNA peut être déclenché.

Un processus actif est nécessaire chez la bactérie réceptrice compétente pour la transmission du signal de conjugaison.

L'activation du réplicon qui se produit chez une bactérie Hfr en réponse au signal de la conjugaison, entraîne chez celle-ci le blocage de la réplication semi-conservative par interaction entre les fourches de réplication végétative et celles de transfert. La division cellulaire est également bloquée chez les bactéries Hfr conjugantes. L'inhibition de la réplication végétative et de la division cellulaire ne se produit pas chez les bactéries F' conjugantes où l'épisome F activé est à l'état autonome. Les mêmes phénomènes, quoique atténués, se produisent chez les bactéries donatrices appariées entre elles grâce aux structures femelles sous-jacentes qu'elles possèdent.

Le DNA de la bactérie donatrice semble n'être transféré que dans les bactéries réceptrices au stade de repos de la réplication. Le brin de DNA transféré est cependant répliqué dès l'entrée dans la bactérie réceptrice.

Si le DNA transféré est épisomique, un nouveau cycle de réplication végétative est commencé dans la bactérie réceptrice après séparation des couples.

Si le DNA transféré est chromosomique, la réplication végétative ne reprend chez les zygotes qu'après la période d'intégration du DNA transféré.

Des résultats font penser que le système de recombinaison est induit chez les zygotes après séparation des couples conjugants et que les fonctions S.O.S. sont induites dans les mêmes conditions chez les deux partenaires.

INTRODUCTION

LE TRANSFERT DE MATERIEL GENETIQUE CHEZ E.coli K 12

En 1946, Lederberg et Tatum (117) ont découvert la recombinaison génétique et par là même la conjugaison bactérienne.

La conjugaison est un processus sexué de transfert de matériel génétique entre bactéries donatrices et réceptrices appariées.

Les deux cellules en présence diffèrent à l'origine par un élément génétique extrachromosomique et des structures cellulaires externes.

I - Les types sexuels chez les bactéries E.coli K 12

1) Les bactéries F^+ et les bactéries F^-

Outre le chromosome bactérien, les bactéries peuvent posséder un élément extra chromosomique constitué de DNA, tel le facteur F, mis en évidence par Lederberg et coll. (116) et Hayes (84). Le facteur F peut exister à l'état libre dans le cytoplasme et se multiplier de façon autonome ou être intégré dans le chromosome bactérien et être répliqué avec lui (199). Cet "élément génétique ajouté" a reçu le nom d'épisome par Jacob et Wollman (103).

Le type sexuel d'une bactérie est déterminé par la présence ou l'absence du facteur F ainsi que par l'état et la position de ce facteur (199).

Les bactéries donatrices ou bactéries F^+ diffèrent des bactéries réceptrices ou bactéries F^- par le fait que seules les bactéries qui possèdent le facteur F peuvent le transmettre à celles qui ne le possèdent pas (115). Les bactéries F^+ qui perdent le facteur F deviennent des bactéries réceptrices F^- .

2) Les bactéries Hfr et les bactéries F'

Un autre type de bactérie, donatrice, dérivé des bactéries F^+ , a été caractérisé (33, 85). Ce sont les bactéries Hfr. (haute fréquence de recombinaison). Ces bactéries proviennent des bactéries F^+ chez lesquelles il y a eu intégration du facteur F dans le chromosome bactérien (102) selon le modèle de Campbell (31), par combinaison réciproque entre des séquences d'insertion identiques situées sur le facteur F et le

chromosome bactérien (46, 95).

Suivant le site d'intégration du facteur F dans le chromosome, différents types de bactéries Hfr ayant des origines et des sens d'injection différents peuvent être obtenus. Par le processus inverse, l'excision du facteur F, les bactéries Hfr peuvent redonner des bactéries F^+ . Dans certains cas, l'excision se produit en emportant un morceau du chromosome bactérien d'un côté ou de l'autre du facteur F. Dans ce cas les bactéries Hfr passent à l'état de bactéries F' . Suivant le type de bactérie Hfr et la partie du chromosome enlevée, les bactéries F' formées transfèrent différents loci bactériens (164).

3) Les caractéristiques de transfert des différents types sexuels bactériens.

Les bactéries F^+ transfèrent le facteur F à haute fréquence et les gènes bactériens à basse fréquence. Elles donnent naissance à des bactéries F^+ .

Les bactéries F' transfèrent à haute fréquence le facteur F et la partie du chromosome bactérien attenante à l'épisome. Elles donnent naissance à des bactéries F' qu'on appelle sexductants ou trans conjuguants qui héritent des caractères bactériens transférés avec le facteur F.

Les bactéries Hfr transfèrent le chromosome bactérien selon une polarité génétique, les caractères proximaux étant transmis à très haute fréquence, les caractères distaux à plus basse fréquence. Ce gradient de transfert des gènes bactériens, est dû à la séparation des couples qui se produit tout au long de la période de croisement. Les bactéries Hfr donnent naissance à des recombinants pour les gènes transférés et intégrés dans les bactéries réceptrices. Les recombinants formés sont en général du type F^- , car étant injecté en bout de chromosome, le facteur F est rarement transféré. Il peut l'être exceptionnellement au cours ce croisements de longue durée. S'il est intégré comme les autres gènes bactériens transférés, les recombinants formés peuvent être alors du type Hfr.

Les bactéries F^- ne peuvent être que réceptrices.

II - Les différences phénotypiques entre bactéries donatrices et réceptrices

La présence du facteur F autonome ou intégré donne aux cellules qui le possèdent des caractéristiques morphologiques qui les différencient des bactéries F⁻ et que nous allons étudier maintenant.

1) Mise en évidence des pili portés par les bactéries donatrices

Anderson (6) et Houwink (93), ont montré qu'il existait sur la surface des bactéries des appendices différents des flagelles. Ces appendices qui paraissent plus nombreux, plus courts et plus fins que les flagelles ont été appelés dans un premier temps : "fimbriae" (52). Par la suite Brinton (27) les a nommés pili terme qui lui semblait plus adapté à la description et à la disposition de ces appendices sur les bactéries.

Brinton (24) a décrit cinq types de pili morphologiquement différents dont le plus répandu surtout chez E. coli, semble être le type I. Il a un diamètre de 70 Å et une longueur moyenne de 2 microns ; on en trouve une centaine par bactérie. Les pili de ce type ont pu être isolés et purifiés (30). On les considère comme des filaments creux à caractère hydrophobe (24) (23), de structure hélicoïdale, et formés de sous unités protéiques de piline (29). La synthèse des pili de type I, est sous le contrôle d'un gène bactérien pil (25) (26) (28) qui a été localisé à 98 min sur la carte génétique chez E. coli K 12. Des études de synthèse des pili en présence de chloramphénicol ont montré que la croissance des pili ne se fait pas par synthèse protéique de novo mais par assemblage de sous unités présynthétisées (24).

2) Mise en évidence des pili sexuels

La découverte de bactériophages spécifiques des bactéries donatrices (119) (120) a permis de montrer que ces phages ne se fixent que sur certains des pili présents sur une bactérie donatrice (39). Alors que les pili du type I croissent aussi bien sur les bactéries donatrices que réceptrices, ce type de pili est spécifique des bactéries donatrices et dépend de la présence du facteur F de type sauvage. Pour ces raisons et à cause de leur ressemblance avec ceux du type I, Brinton (27) les a appelés F pili ou pili sexuels.

3) Propriétés des F pili

a) caractéristiques des F pili

Les F pili ont pu être purifiés et analysés par Brinton (25). Ils se présentent comme un assemblage d'un seul type de protéine : la F piline de poids moléculaire 11 400. Deux groupements phosphates, un résidu D-glucose par monomère peptidique et un grand nombre d'acides aminés hydrophobes ont été caractérisés (25).

La F piline semble être codée par le gène du facteur F : tra A (131) (191). La F piline est sans doute modifiée avant l'assemblage en F pili par des enzymes codés par le facteur F ou même par des enzymes bactériens puisque les F pili issus de souches différentes n'ont pas la même densité en gradient de Cs Cl (12).

Les F pili sont des filaments creux ayant une longueur qui peut atteindre 20 μ, un diamètre externe de 85 Å et interne de 20 à 25 Å (25). Ils ne présentent pas la structure hélicoïdale des pili de type I (24). On en trouve au maximum deux à trois par cellule (27).

Ørskov et Ørskov (152) ont déterminé chez les bactéries mâles E. coli la présence d'un antigène f⁺ spécifique. Ishibashi (97) a précisé que l'anticorps correspondant s'agglutine spécifiquement aux F pili.

b) croissance des F pili

Les F pili sont facilement détachables par agitation mécanique. La synthèse reprend dans les 30 s et la reformation totale est achevée en moins de 5 min (140).

Le taux de synthèse des F pili varie selon les conditions de culture. La formation des F pili est favorisée chez les bactéries cultivées en milieu riche et en anaérobiose (43) (78). La production des F pili dépend du stade où se trouve la culture bactérienne. Elle est maximale pendant la phase exponentielle de croissance et s'annule à la phase stationnaire (180) (182).

Les sous unités de F piline ont été trouvées au niveau de la membrane (14). On pense donc que l'assemblage se fait à ce niveau et que le F pili est ancré sur la membrane. La croissance du F pili semble être

continue ; lorsqu'il atteint sa taille normale il se détache dans le milieu et un autre F pilus se reforme (144).

4) Rôle des F pili dans le transfert de DNA

a) rôle au niveau de l'appariement des cellules

Brinton (24) a montré que la présence des F pili est indispensable à la formation de couples conjugants. Les cellules donatrices carencées en acides aminés ou soumises à une agitation violente, perdent leur F pili et parallèlement leur capacité à conjuguer. Elles la retrouvent dès la régénération des F pili.

Ceci a été confirmé par l'utilisation des phages spécifiques des bactéries donatrices, et de nombreux autres travaux (62) (110) (142).

Les phages à RNA (181) : f2 (120) et MS2 (178) s'adsorbent sur des sites récepteurs localisés sur la longueur des F pili⁽³⁹⁾. Les phages à DNA (200) : f1 (115), fd (126) et M13 (90) s'adsorbent à l'extrémité du F pilus. L'utilisation de cette dernière propriété a permis de montrer que les F pili sont nécessaires à la formation des couples conjugants. En effet les phages f1 inhibent la formation des couples lorsqu'ils sont ajoutés aux bactéries donatrices avant le croisement et n'ont plus d'action lorsqu'ils sont ajoutés après la formation des couples. (96)

b) le F pilus est l'unique structure d'appariement chez la bactérie donatrice

Ishibashi (97) a montré que le F pilus était la seule structure de la bactérie donatrice à être impliquée dans le processus d'appariement. Ishibashi a fabriqué un antisérum dirigé contre la bactérie donatrice complète. Il a ensuite éliminé les anticorps communs aux bactéries donatrices et réceptrices en mettant l'antisérum en présence d'un excès de bactéries réceptrices isogéniques. L'antisérum ainsi traité n'agglutinait plus que les bactéries donatrices. Pour savoir s'il ne contenait que des anticorps dirigés contre les F pili, Ishibashi l'a fait agir sur des bactéries infectées par des phages à RNA spécifiques des F pili. L'antisérum est resté sans action sur les bactéries infectées dont les F pili étaient complètement couverts de phages.

Cela montre bien qu'il était dirigé exclusivement contre les F pili qui sont donc les seules structures spécifiques mâles.

c) le F pilus sert-il de "tunnel" de transfert au DNA ?

Brinton (24) (27) et Knolle (110) ont postulé que les F pili servent de plus au passage de DNA. Ceci a été confirmé par des expériences de micro manipulation (150). Ou et Anderson ont observé des couples séparés constamment par un F pilus et qui sans jamais entrer en contact, donnaient des recombinants. Cependant ils ont également montré que la fréquence d'apparition des recombinants était 2 fois plus grande chez les bactéries appariées (150).

d) le F pilus serait plutôt une structure de reconnaissance et d'arrimage des bactéries femelles

Le fait que les recombinants apparaissent plus nombreux chez les couples de bactéries appariées et que le DNA transféré n'a pu être mis en évidence dans les F pili fait penser que le F pilus ne sert que d'élément sensoriel de reconnaissance et d'arrimage des bactéries réceptrices.(142, 190)

Curtiss (42) et Novotny (144) ont émis l'hypothèse que le F pilus stabilise les couples avant la formation du pont intercellulaire par où sera transféré le DNA lors du contact des cellules bactériennes.

Au cours de l'infection des bactéries mâles par les phages spécifiques à RNA, la rétraction des F pili pourrait amener les phages adsorbés au contact de la bactérie réceptrice (21) (190) (127) (141).

L'hypothèse a été émise qu'après reconnaissance de la bactérie réceptrice , le F pilus se rétracte pour l'amener en contact intime avec la bactérie donatrice. (42)

5) Structures femelles complémentaires

Les résultats concernant ce problème sont moins nombreux, l'attention s'étant porté pendant des années sur les structures mâles.

Il existe des phages spécifiques des bactéries femelles : ØII (40) T7 (123) W31 (189) : ils s'adsorbent aussi bien sur les bactéries donatrices que réceptrices mais ne se développent que chez les bactéries réceptrices.

Des observations récentes ont montré qu'il existait bien chez les bactéries femelles des sites spécifiques de conjugaison mais aucune détermination n'a pu être encore faite. Les mutants résistants à l'ampicilline présentent des structures lipopolysaccharidiques modifiées et ont des faibles aptitudes de conjugaison (133). On a montré que l'ion Zn^{++} augmente la capacité d'appariement des cellules F^- alors qu'il inhibe celle des bactéries mâles (148) (149) (151). Skurray (170) a mis en évidence un mutant de conjugaison négatif : $Co\bar{n}$ qui a perdu une protéine essentielle de la membrane externe de l'enveloppe cellulaire.

Depuis d'autres mutants de ce type ont été isolés (47).

Récemment en sélectionnant des bactéries F^- résistantes à des phages spécifiques des structures externes femelles ST1 (170) et K3 (160) a été mise en évidence une série de mutants $Co\bar{n}$ différents (81) (82). Plusieurs classes de mutants $Co\bar{n}$ ont ainsi été trouvées affectant les étapes préliminaires au transfert de DNA mais les déficiences exactes au niveau de ces étapes n'ont pas toutes été caractérisées (57).

III - Les propriétés du facteur F (1) (86) (192) (181)

Le facteur F d'origine (F_1) (4) a un poids moléculaire approximatif de $6,2 \times 10^7$ daltons et une longueur de 30 μ . Il se présente sous la forme d'un double brin de DNA circulaire fermé.

Les fonctions du facteur F autonome dans une bactérie mâle lui permettent de se répliquer ou d'être transféré dans une autre bactérie mais seulement lorsqu'elle est du sexe opposé.

1) La répllication du facteur F

Le démarrage de la répllication du facteur F dépend d'une synthèse de RNA non messenger (108) mais est indépendant de la synthèse protéique (88) (109). Un locus du facteur F et un gène bactérien (106) semblent impliqués dans la répllication du facteur F.

2) Le transfert du facteur F d'une bactérie mâle à une bactérie femelle

Le déclenchement du transfert du facteur F à une bactérie réceptrice

dépend d'une synthèse de RNA non messenger et d'une synthèse protéique (60). Douze cistrons du facteur F (86) (3) et deux cistrons bactériens (2) seraient impliqués dans le phénomène de transfert de DNA d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice. Neuf des cistrons du facteur F codent pour la formation des F pili et parmi eux un pour la synthèse de F piline (131) (191).

3) L'inhibition de transfert d'une bactérie mâle à une bactérie mâle

Le transfert de matériel génétique entre bactéries donatrices est empêché par deux phénomènes : l'exclusion de surface (194) qui s'oppose au transfert même de matériel génétique (116) (138) et l'incompatibilité qui rend impossible la surinfection d'une bactérie mâle par un épisode du type qu'elle possède (56) (165).

L'exclusion de surface n'est pas due à la présence des F pili (3) (35) (43) (129). Eckerson a d'ailleurs montré récemment que la formation des couples était possible entre cellules mâles et que le phénomène d'exclusion devait intervenir à une étape ultérieure. (56)

L'exclusion de surface agirait soit au niveau de la bactérie mâle donatrice en empêchant la sortie du DNA (13) soit au niveau de la bactérie mâle "receveur" en ^{bloquant} la pénétration du DNA (58) (167).

Le phénomène d'incompatibilité inhiberait dans la bactérie mâle receveur la réplication du facteur F qui aurait pu franchir la barrière de l'exclusion de surface lors du contact entre bactéries mâles (51) (66).

IV - Le mécanisme de transfert de DNA d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice

A) Le mode de transfert du DNA

Le DNA peut être transféré sous plusieurs formes :

- 1 - une double chaîne synthétisée avant la conjugaison
- 2 - une double chaîne dont l'un des brins est ancien et l'autre synthétisé pendant la conjugaison
- 3 - une simple chaîne ancienne
- 4 - une nouvelle chaîne synthétisée pendant le croisement

1) Transfert d'une double chaîne à l'aide d'une répllication
semi-conservative

Le transfert, lors de la conjugaison, d'un brin de DNA préexistant au croisement, a été rapidement montré mais les expériences étaient faites dans des conditions qui ne pouvaient pas indiquer s'il était accompagné d'un brin de DNA synthétisé pendant la conjugaison.

- croisement d'une bactérie Hfr ayant le DNA radioactif, dans un milieu non radioactif et analyse par autoradiographie du DNA transféré à la bactérie réceptrice (87).
- mutagénèse de la bactérie Hfr avant la mise en croisement et analyse des recombinants obtenus qui sont tous apparus homozygotes pour le gène muté transféré (185).

Jacob, Brenner et Cuzin (105) ont montré les premiers que la 2^{ème} proposition devait être retenue. Ils ont fait croiser dans un milieu non marqué des bactéries réceptrices avec des bactéries Hfr dont le DNA était marqué par des isotopes lourds. Le DNA, extrait de la bactérie réceptrice après transfert, était sous forme de double chaîne hybride lourde et légère. Les résultats étaient compatibles avec une répllication de transfert semi-conservative dirigée par le facteur F lors de la conjugaison. La répllication servirait de "force" de transfert à la double chaîne de DNA ancienne et nouvelle.

Ce type d'expérience a été plusieurs fois répété dans des conditions semblables, les différences venant du type de marquage et d'analyse du DNA transféré. Ptaschne (157) a ainsi tiré des conclusions semblables concernant le transfert d'un facteur F porteur du prophage λ .

Gross et Caro (75) (76) ont étudié par autoradiographie les propriétés du DNA transféré à une bactérie réceptrice à partir d'une bactérie donatrice ayant le DNA marqué à la thymine ^3H . Ils ont trouvé deux fois plus de marquage dans la bactérie réceptrice lors de croisements effectués en présence de thymine ^3H que lors de croisements effectués en présence de thymine non marquée et confirmé le modèle de Jacob, Brenner et Cuzin.

Personne à l'époque n'avait interprété les résultats dans le sens du transfert d'un brin unique de DNA marqué, retrouvé associé dans la bactérie réceptrice, à un brin complémentaire de DNA non marqué synthétisé après transfert.

Cette interprétation n'a été émise que plus tard par Ohki et Tomizawa (145).

2) Transfert d'une chaîne ancienne à l'aide d'une répllication de type "cercle qui roule"

L'idée qu'un brin unique de DNA est transféré lors de la conjugaison a été apportée par Cohen (35) qui utilisait des bactéries minicellules dérivées de bactéries F^- . Les minicellules sont de petites bactéries sans DNA issues de l'extrémité d'une bactérie mutante ayant des divisions anormales (64). Il a trouvé qu'immédiatement après transfert, le DNA transféré à partir d'une bactérie F^+ , F' ou Hfr est sous forme de simple chaîne dans la bactérie minicellule. Seul un élément court de DNA, comme celui du facteur F est ensuite répliqué en une double chaîne dans la bactérie minicellule.

Rupp et Ihler (161) ont pris des bactéries Hfr et F' qui injectent dans des sens différents. Suivant le sens d'intégration du facteur F, chaque chaîne du chromosome peut être attachée à une chaîne différente du facteur F. Si c'est toujours la même chaîne du facteur F qui est transférée lors de la conjugaison, un brin différent du chromosome sera transféré en utilisant des bactéries donatrices ayant des sens d'injection du chromosome différent.

Le prophage λ s'intégrant dans le chromosome toujours dans le même sens, ils ont pris des bactéries lysogènes pour étudier ce problème. Ils ont analysé en gradient de Cs Cl le DNA du prophage λ transféré. Les chaînes du phage λ peuvent être séparées dans ces conditions à l'aide du polymère UG qui alourdit préférentiellement une des deux chaînes en s'hybridant (95). Ils ont montré que chaque bactérie donatrice transfère une chaîne déterminée du phage λ , lourde ou légère en présence de poly UG, suivant l'orientation du facteur F. C'est toujours le brin de DNA possédant l'extrémité 5'phosphate qui est transféré dans la bactérie

Ohki et Tomizawa (145) ont fait le même type d'expérience et précisé que la réplication qui se fait pendant la conjugaison est du type "cercle qui roule" et que le brin transféré acquiert rapidement un brin complémentaire synthétisé dans la bactérie réceptrice.

Vapnek et Rupp ont confirmé ces résultats en étudiant le transfert du facteur F et en analysant le type de chaîne transférée en gradient de Cs Cl contenant le polymère UG (183) (184).

Ils ont montré que la chaîne la plus dense en poly UG est transférée dans la bactérie F^- où la chaîne complémentaire est synthétisée après le transfert. La chaîne non transférée dans la bactérie mâle est également complétée par une nouvelle chaîne synthétisée pendant la conjugaison. L'analyse de ces chaînes nouvellement synthétisées en Cs Cl-poly UG et par hybridation montre bien qu'elles sont complémentaires.

B) Les effets du stade de réplication sur la conjugaison des bactéries

Peu d'études ont été faites sur ce sujet. Spelina et Starka (175) ont montré les premiers que la fréquence de recombinaison était supérieure chez les bactéries F^- synchronisées et croisées au milieu de leur cycle cellulaire. Ces résultats ont été confirmés en utilisant d'autres types de bactéries F^- synchronisées (135).

Par contre l'efficacité de conjugaison des bactéries mâles semble indépendante de leur stade de réplication (136) (175).

Des résultats semblent montrer que l'apparition des recombinants se fait plus rapidement chez une bactérie F^- carencée en acides aminés et croisée avec une bactérie Hfr au moment de la restitution de ceux-ci. Par contre les mêmes bactéries F^- donnent un nombre diminué de sexductants quand elles sont croisées avec des bactéries F' . Ces résultats contradictoires sont difficilement interprétables.

Walsmsley, (186) en mesurant l'appariement des bactéries mâles et femelles à l'aide d'un "coultter counter", a montré qu'une fraction seulement des bactéries F^- d'une population en phase exponentielle de croissance peut s'apparier à tout instant aux bactéries mâles. Ceci est en faveur de l'existence d'un stade particulier de la croissance bactérienne nécessaire à la conjugaison, en accord avec les résultats obtenus par Spelina et Starka (175).

C) Relations entre synthèse et transfert de DNA

1) les différentes méthodes de mesure employées

Le transfert de DNA à la bactérie réceptrice peut être mesuré de différentes manières :

L'apparition de recombinants peut être utilisée quand les deux parents possèdent des caractères génétiques différents mais ce n'est qu'une mesure indirecte puisqu'elle fait appel au transfert et à l'intégration du DNA (104) (138).

L'induction zygotique qui fait appel au transfert du prophage λ d'une bactérie donatrice lysogène à une bactérie réceptrice non lysogène. Le transfert du prophage λ est mesuré par le nombre de plages de lyse correspondant aux bactéries réceptrices chez lesquelles le phage λ est entré en phase végétative. (101) (197)

L'expression immédiate d'un gène transféré à la bactérie F^- peut mesurer le transfert de DNA de la bactérie mâle par la quantité d'un produit synthétisé dans la bactérie réceptrice. (153)

Les deux derniers moyens de mesure du transfert génétique ne peuvent être employés que si la bactérie réceptrice est métaboliquement active.

la quantité de DNA radioactif transféré peut être mesurée dans la bactérie F^- par la quantité de produit acido insoluble marqué ou par autoradiographie (168) (75). Cependant le DNA transféré peut être dégradé à son entrée dans la bactérie F^- et ne pas donner de matériel acido insoluble alors qu'il y a eu transfert (147) (154).

Il est donc possible que le processus de transfert ait lieu sans qu'il soit pour autant mesurable.

La plupart des auteurs ont étudié les relations entre synthèse et transfert de DNA, en bloquant la synthèse de DNA chez l'un ou l'autre parent ou en recherchant l'existence d'une synthèse de DNA propre au transfert.

2) les moyens de blocage du métabolisme et de la synthèse de DNA

Fisher (61) en privant l'un des parents d'une source de carbone a montré que la bactérie mâle est active en conjugaison et la bactérie réceptrice passive. Curtiss et coll. ont montré par ailleurs qu'il y avait

perte de F pili dans ces conditions et qu'il fallait réinterpréter les résultats obtenus par Fisher (43).

L'utilisation de différentes combinaisons de bactéries donatrices et réceptrices capables ou incapables d'utiliser une source de carbone donnée a permis de montrer qu'un métabolisme actif est nécessaire chez la bactérie donatrice pour commencer le transfert et la bactérie réceptrice pour contrôler la vitesse de pénétration du DNA (44) (45).

l'acridine orange

On a vu que Jacob Brenner et Cuzin ont postulé l'existence d'une réplication semi conservative commencée à partir du facteur F et servant de force de transfert au DNA (105).

La confirmation de ce modèle a été apportée par l'utilisation de l'acridine orange qui bloque plus spécifiquement la réplication du facteur F que celle du chromosome bactérien (83).

Jacob Brenner et Cuzin ont montré que l'acridine orange bloque le transfert de DNA puisqu'on ne trouve pas de recombinants lors d'une conjugaison effectuée en sa présence (105).

Arai et Watanabe (7) ont sélectionné des bactéries donatrices résistantes à l'acridine orange qui, contrairement aux bactéries sauvages sensibles, n'ont pas la croissance inhibée par l'acridine orange. Ils ont croisé ces bactéries donatrices avec des bactéries réceptrices et observé que le transfert de DNA était bloqué chez les bactéries donatrices sensibles et avait lieu chez les bactéries résistantes. Ces résultats ont été interprétés dans le sens du modèle de Jacob, Brenner et Cuzin.

L'arrêt de transfert pourrait cependant être consécutif à l'arrêt de la croissance de la bactérie donatrice plutôt qu'à l'inhibition de la réplication du facteur F. Il est possible que le blocage de la réplication chez la bactérie sensible à l'acridine orange induise une dégradation du DNA qui bloque à son tour le transfert, ou que le transfert des lésions ne donne pas de DNA recombiné.

l'alcool phénéthylque

L'alcool phénéthylque, inhibiteur de la synthèse de DNA (15), utilisé dans le système de conjugaison (18) a permis de déterminer que la synthèse de DNA est indispensable au transfert

chez la bactérie mâle. Cependant l'alcool phénéthylque n'est pas un inhibiteur spécifique au sens propre du mot puisqu'il agit également au niveau de la membrane en bloquant les transports ioniques (163) et provoque la mort des cellules. De plus il inhibe l'apparition des F pili (139). Cette dernière observation à elle seule pourrait expliquer l'inhibition de transfert observée chez la bactérie mâle.

l'acide nalidixique (71)

L'acide nalidixique apparaît à priori comme un bon inhibiteur de la synthèse de DNA puisqu'il agit rapidement sans trop altérer la synthèse de RNA et des protéines (72). Son emploi était donc particulièrement indiqué pour démontrer la corrélation entre synthèse et transfert de DNA. (92)

Les différents moyens de mesure du transfert : taux de recombinaison (19) (79) expression des gènes (9) (41) induction zygotique (19) (79) mise en évidence du DNA transféré dans les bactéries minicellules (63), détermination de la synthèse résiduelle de DNA après blocage de la réplication végétative⁽²²⁾ ont chaque fois révélé que le transfert était bloqué quand la bactérie mâle était sensible à l'acide nalidixique. Là encore la synthèse de DNA apparaît indispensable au transfert de DNA chez la bactérie mâle et mais non chez la bactérie femelle.

Cependant les remarques suivantes peuvent être faites :

- l'inhibition du transfert par l'acide nalidixique n'est pas réversible dans le sens que le transfert ne reprend pas au point où il était bloqué mais à l'origine de transfert de chromosome. Ceci implique l'initiation d'un nouveau cycle de transfert (19) (79). Or l'inhibition par l'acide nalidixique de la synthèse de DNA est réversible (49).
- la présence d'acide nalidixique pendant le déroulement de la conjugaison entraîne une diminution de l'apparition des recombinants même quand les deux parents sont résistants (19). Or incubés séparément, ils ne présentent aucune inhibition de la synthèse de DNA pour la même concentration en acide nalidixique. Il est donc difficile d'établir une relation directe entre

blocage du transfert de DNA et l'inhibition de la réplication par l'acide nalidixique chez la bactérie donatrice.

- l'acide nalidixique provoque de plus l'altération (135) et la dégradation du DNA (37) l'induction du prophage λ dans une bactérie lysogène (179) et le déclenchement prématuré de cycles de réplication (20) (188).

- les mutants thermosensibles dna B

Bonhoeffer a utilisé des mutants bactériens thermosensibles chez qui la réplication du DNA se bloque immédiatement après passage à la température non permissive. (16)

Au contraire des expériences citées plus haut, il a montré, par l'apparition de recombinants, que le transfert n'est pas bloqué à température non permissive quand la bactérie mâle porte la mutation dna Bts

Ceci a été confirmé plus tard ^{Stallions et} par Curtiss (177). Si la bactérie réceptrice est porteuse de la même mutation, le transfert est bloqué à température non permissive. Ceci impliquerait chez la bactérie réceptrice une synthèse de DNA nécessaire au transfert de DNA.

Bonhoeffer a confirmé ses résultats en mesurant cette fois le transfert de DNA par l'induction de β galactosidase dans le zygote (17).

Cependant, le transfert de DNA n'est que faiblement affecté lorsque d'autres souches possédant la même mutation dna Bts sont croisées à température non permissive (41) (59) (134). Après blocage de la réplication végétative à température non permissive, une synthèse de DNA qui doit correspondre à la réplication de transfert (22) (124) a même été observée pendant le croisement, mais il n'a pas pu être déterminé si elle était à attribuer à la bactérie donatrice ou à la bactérie réceptrice.

- privation de purines

Freifelder a trouvé des résultats qui sont en accord avec ceux de Bonhoeffer (70). En privant de purines une bactérie réceptrice exigeante, il a montré qu'aucun transfert de DNA n'était détecté que ce soit à partir de bactéries donatrices prototrophes Hfr ou F'. Mais les effets observés pourraient être aussi bien dus au blocage de la synthèse de DNA, de RNA ou de protéines ou même d'une source énergétique.

- Homologie entre la partie proximale du DNA transféré et le segment de DNA répliqué dans la bactérie réceptrice.

Curtiss (44) a montré qu'il doit exister une homologie entre la région proximale du chromosome transféré de la bactérie donatrice et la région comparable du chromosome de la bactérie réceptrice pour que le transfert soit efficace. Une délétion de 3% du chromosome de la bactérie réceptrice, correspondant à la région proximale transférée, provoque un retard dans l'apparition des recombinants. Curtiss a suggéré qu'en répliquant son chromosome la bactérie réceptrice tire le DNA transféré hybridé au sien, ce qui assure la "force" de transfert et l'intégration du DNA. (45)

V - Conclusion

La conjugaison bactérienne entre cellules donatrices et réceptrices chez E. coli K 12 peut être décomposée schématiquement en quatre étapes.

- collision entre bactéries de sexe opposé.

Les bactéries donatrices entrent en contact par l'intermédiaire des F pili avec les sites récepteurs des bactéries réceptrices.

- appariement effectif entre des bactéries donatrices et réceptrices en contact.

Il y a formation de couples conjugants après l'établissement d'un pont de conjugaison entre les bactéries donatrices et réceptrices en contact.

On ne sait pas encore si l'appariement des cellules se produit au hasard des rencontres ou s'il existe un processus de reconnaissance entre bactéries donatrices et réceptrices pouvant être le signal du transfert de DNA. On ignore aussi si à ce stade de l'appariement, la bactérie réceptrice a un rôle actif chez la bactérie donatrice à laquelle elle est appariée, dans le déclenchement du transfert de DNA

- Transfert du DNA de la bactérie donatrice à la bactérie réceptrice.

Le DNA de la bactérie donatrice est transféré à la bactérie réceptrice à partir du point d'intégration du facteur F.

Des résultats contradictoires ont été publiés à propos de la nécessité d'une synthèse de DNA concomitante du transfert. De plus aucune relation n'a été clairement établie entre répllication semi-conservative bidirectionnelle de type Θ , répllication de transfert unidirectionnelle de type σ et processus de transfert de DNA.

- Recombinaison génétique.

La dernière étape est constituée par l'ensemble des processus qui conditionnent l'intégration du brin unique de DNA transféré dans le chromosome de la bactérie réceptrice.

Nous avons abordé, d'une part, le problème de la reconnaissance et de l'interaction des cellules pendant le processus d'appariement. Nous avons cherché à savoir si les bactéries réceptrices peuvent conjuguer à n'importe quel moment de leur cycle cellulaire ou seulement à un moment déterminé ; si de plus elles transmettent un signal de conjugaison aux bactéries, donatrices auxquelles elles sont appariées.

Nous avons abordé, d'autre part, le problème de l'interaction entre réplicons F et bactériens qui peut résulter de la mise en route du processus de transfert de DNA chez une bactérie donatrice en croissance, appariée à une bactérie réceptrice.

Nous avons également tenté de montrer que la recombinaison génétique qui se produit chez le zygote, est inductible et qu'elle est couplée à l'induction des fonctions S. O. S.

Nous allons décrire dans un premier temps le matériel et les méthodes utilisées et présenter ensuite les résultats en cinq chapitres :

- Mise au point de techniques et amélioration des conditions expérimentales classiquement utilisées.

- Les cycles de compétence à la conjugaison chez les bactéries réceptrices.

- Intéraction entre réplicons bactériens et épisomiques chez les Bactéries donatrices après activation du réplicon F.
- Reprise de la réplication végétative chez les bactéries donatrices issues d'un croisement avec des bactéries réceptrices.
- Résumé du travail et conclusion générale.

I - Souches de Phages et de Bactéries

1) Souches de Phages

<u>Souches</u>	<u>Marqueurs génétiques utilisés</u>	<u>Origine</u>
λ	type sauvage	Kaiser 1957, Dove 1969
λ vir	mutant insensible au répresseur de λ	Jacob et Wollman 1953
λ ind ⁻	mutant non inductible de λ	Jacob et Campbell 1959
λ b ₂ imm 4 34	λ délétion b ₂ immunité 4 34	R. Devoret (de Eisen)
P I Kc	mutant clair de P I K	Lennox 1955

2) Souches bactériennes donatrices F'

<u>Souches</u>	<u>Marqueurs génétiques utilisés</u>	<u>Origine</u>
200 PS/F-lac ⁺	lac ⁻ /F-lac ⁺	F. Jacob
MK 18/F-lac ⁺	lac ⁻ /F-lac ⁺ BU ^r *	souche 200 PS/F-lac ⁺ rendue résistante au 5 BU
MK 20/F-lac ⁺	lac ⁻ /F-lac ⁺ strA	sexductant de MK 20 X 200 PS/F-lac ⁺
MK 13/F-lac ⁺	lac ⁻ /F-lac ⁺ thy A str A	sexductant de MK 13 X 200 PS/F-lac ⁺
GY 2427	gal ⁻ /F-gal ⁺	W 3101/F-gal ⁺ ; R. Devoret

* Phénotype 5 Bromouracil résistant (67)



3) Souches bactériennes donatrices Hfr

<u>Souches</u>	<u>Marqueurs génétiques utilisés</u>	<u>Origine</u>
Hfr H		Hfr Hayes, PO 1 ; Bachmann (1972) $\xleftarrow{\text{thy}^+ \text{leu}^+ \text{lac}^+ \lambda \text{his}^+ \text{arg}^+}$
MK 1	<u>thy A</u>	mutant <u>thy A</u> de Hfr H par sélection à la triméthoprime
MK 2	<u>str A</u>	mutant <u>str A</u> de Hfr H par sélection sur streptomycine
GY 2200	(λ <u>ind⁻</u>)	Hfr H lysogène pour λ <u>ind⁻</u> ; J. George
MK 3	<u>thy A</u> , (λ <u>ind⁻</u>)	mutant <u>thy A</u> de GY 2200 par sélection à la triméthoprime
MK 4	<u>thy A</u> , <u>str A</u>	mutant <u>str A</u> de MK 1 par sélection sur streptomycine
MK 5	<u>lac Z</u>	mutant spontané <u>lac⁻</u> de Hfr H
<hr/>		
Hfr K 10		Hfr Cavalli, PO 2A ; Bachmann (1972) $\xrightarrow{\lambda \text{his}^+ \text{arg}^+ \text{thy}^+ \text{leu}^+ \text{lac}^+}$
MK 6	<u>thy A</u>	mutant <u>thy A</u> de Hfr K 10 par sélection à la triméthoprime
MK 7	BU ^R *	souche Hfr K 10 rendue résistante au 5 BU
MK 8	(λ)	Hfr K 10 lysogène pour λ
MK 9	<u>str A</u>	mutant <u>str A</u> de Hfr K 10 par sélection sur streptomycine
MK 10	<u>str A</u> , (λ)	MK 9 lysogène pour λ
MK 11	<u>str A</u> , (λ <u>ind⁻</u>)	MK 9 lysogène pour λ <u>ind⁻</u>
MK 12	<u>rec A</u> , <u>str A</u> , (λ)	lysogénisation pour λ du recombinant <u>thy⁺ rec A</u>

* Phénotype 5 Bromouracil résistant (67)



4) Souches bactériennes réceptrices

<u>Souches</u>	<u>Marqueurs génétiques utilisés</u>	<u>Origine</u>
MK 20	<u>thr leu arg</u> Δ <u>lac str A</u> λ^R	clone issu de la souche 2000 X 17 K F. Jacob
MK 13	<u>thy A</u>	mutant <u>thy A</u> de MK 20 par sélection à la triméthoprine
MK 14	BU ^R *	souche MK 20 rendue résistante au 5 BU
MK 15	<u>rec A</u>	recombinant <u>thy</u> ⁺ <u>rec A</u> issu du croisement MK 13 X KL 1699 (B. Low)
MK 16	λ^S (λ <u>ind</u> ⁻)	souche MK 20 rendue λ^S et lysogène pour λ <u>ind</u> ⁻
MK 17	λ^S (λ)	souche MK 20 rendue λ^S et lysogène pour λ
PA 200	<u>gal str A</u>	F. Jacob
MK 18	BU ^R *	ségrégant F ⁻ de la souche MK 18/F- <u>lac</u> ⁺ résistante au 5 BU
VL 232	λ^R	KY 859 rendue λ^R par sélection sur λ vir
GY 2164	<u>str A</u> λ^R	J. George
ABF 1	<u>thr leu pro ade his arg lac Y str A</u>	ségrégant F ⁻ de la souche AB 23451/F- <u>lac</u> ⁺ F. Jacob
ABF 2	<u>thr leu pro ade his lacY str A</u>	recombinant <u>arg</u> ⁺ de ABF 1 par transduction ; donneur C 600
ABF 3	(λ <u>ind</u> ⁻)	ABF 1 lysogène pour λ <u>ind</u> ⁻
MK 19	<u>thr leu arg str A</u> λ^R	recombinant <u>lac</u> ⁺ de MK 20 par transduction ; donneur Hfr K 10

* Phénotype 5 Bromouracil résistant (67)



II - Milieux employés

1) Milieux de culture

a) milieu synthétique de Lennox (ML)

chlorure d'ammonium	5 g
nitrate d'ammonium	1 g
sulfate de sodium anhydre	2 g
phosphate bipotassique	9 g
phosphate monopotassique	3 g
sulfate de magnésium	0,1 g
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

Autoclaver 20 min à 120°C

Le milieu synthétique est complété par une source de carbone et les facteurs de croissance exigés par les différentes souches, dans les concentrations suivantes :

vitamine B ₁	2 µg/ml
thymine	2 µg/ml
acides aminés	40 µg/ml
glucose	1%

Nous avons toujours travaillé en présence de 0,2% d'hydrolysate de caséine, "casaminoacids Difco", qui augmente le taux d'appariement des bactéries donatrices avec les bactéries réceptrices et en conséquence l'efficacité de la conjugaison. (voir chapitre suivant)

b) milieu complexe : milieu de Luria (121)

Ce milieu a été employé sous forme gélosée à 15 g par litre d'agar "Difco", pour le dénombrement des cellules bactériennes. Il a également été utilisé sous forme liquide dans certaines expériences après avoir été complété par du glucose 1% et du "casaminoacids" 0,2%.

2) Milieu de sélection des recombinants

a) milieu synthétique M 63

$\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{K}$	13,6 g
$\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$	2 g
$\text{SO}_4 \text{Mg}, 7 \text{H}_2 \text{O}$	0,2 g
$\text{SO}_4 \text{Fe}, 7 \text{H}_2 \text{O}$	0,0005 g
$\text{H}_2 \text{O}$ q.s.p.	1000 ml

Ajuster à pH 7 avec NaOH.

Autoclaver 20 min à 120°C.

Ce milieu est solidifié par addition de 15 g par litre d'agar Difco et réparti dans des boîtes de Pétri pour la sélection des recombinants.

Suivants les sélections désirées, des acides aminés ont été ajoutés à une concentration de 40 µg/ml, une source de carbone à 1%, et 250 µg/ml de streptomycine pour contre sélectionner les bactéries donatrices sensibles à l'antibiotique.

b) milieu de Chapman Lactosé TTC (chlorure de 2-3-5-triphenyl-tetrazolium)

C'est un milieu riche produit par l'Institut Pasteur de Paris, où les cellules bactériennes lac^- donnent des colonies rouges et les cellules lac^+ des colonies jaunes.

Il est complété par 250 µg/ml de streptomycine pour contre sélectionner les bactéries donatrices sensibles à l'antibiotique. Il a été utilisé pour le dénombrement des zygotes lac^+ . (voir chapitre suivant)

c) milieu de dilution

La solution tamponnée employée au cours de nos dilutions est composée de KCl 11%, ajustée à pH 7 par addition de 2,5 ml d'un mélange de $\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{K}$ 4% et $\text{PO}_4 \text{HK}_2$ 36%.

La solution est autoclavée 20 min à 120°C.

d) la gélose molle

Cette gélose contient 7,5 g d'agar Difco par litre et est répartie à raison de 3,5 ml par tube.

Fondue, elle sert à couler, sur les boîtes de sélection des recombinants, les dilutions de suspensions de bactéries croisées.

3) Antibiotiques

- La streptomycine a été employée à la concentration de 250 µg/ml dans les milieux de sélection des recombinants pour contre sélectionner les bactéries donatrices sensibles à l'antibiotique.

Elle a également été utilisée au cours du processus de conjugaison pour stopper la formation des couples conjugants. (voir chapitre suivant)

- Le chloramphénicol a été utilisé à la concentration de 10 µg/ml dans une technique de synchronisation de la réplication mise au point au cours du travail. (voir chapitre suivant)

III - Techniques et méthodes

1) Techniques de base concernant la génétique et la physiologie des bactéries et des phages

Les techniques que nous avons utilisées dans ce travail sont des techniques classiques déjà décrites. (130)

a) techniques concernant les phages

- préparation d'un "stock" de phages ; purification par ultracentrifugation en gradient de densité ; dosage du "stock".
- lysogénisation des bactéries ; résistance aux phages ; guérison d'un prophage résident ; mise en évidence par la technique de "cross streak".
- induction du prophage chez les bactéries lysogènes ; mesure des phages libres dans une culture bactérienne.
- transduction généralisée par le phage P1

b) techniques concernant les bactéries

- croissance et dénombrement des bactéries.
- test de sensibilité ou d'inductibilité d'une souche bactérienne par le rayonnement ultraviolet.
- obtention de mutants.
- sélection de souches donatrices et réceptrices efficaces en conjugaison par la technique de réplique au velours.
- analyse génétique des recombinants bactériens.
- étude de l'action de différents antibiotiques. L'application à la conjugaison a été décrite au cours du travail.

2) Croisements bactériens

Les principes de base ont été décrits par Jacob et Wollman. (104) (138)

La mise au point de conditions qui augmentent l'efficacité de la conjugaison est décrite dans le chapitre suivant.

Cinétique d'apparition de recombinants :

Pour toute cinétique, on prélève 0,5 ml du mélange de croisement que l'on dilue dans 4,5 ml d'une solution tampon KCl. Le croisement est interrompu par agitation de la dilution au vortex pendant 90 secondes.

0,1 ml de la dilution appropriée est introduit dans un tube de 3,5 ml de gélose molle préalablement fondue. On coule sur les boîtes contenant le milieu de sélection. On incube à l'étuve à 37°C pendant 48 heures.

Les colonies de recombinants apparues sont comptées et leur fréquence est calculée, par rapport au nombre de bactéries donatrices présentes au temps zéro du croisement et exprimée pour 100 bactéries donatrices.

$$\text{fréquence de recombinaison} = \frac{\text{nombre de recombinants}}{100 \text{ bactéries donatrices initiales}}$$

3) mesure du transfert de DNA pendant la conjugaison

a) Expression constitutive du gène lac^+ transféré dans la bactérie réceptrice

Le transfert de DNA est mesuré par la quantité de β galactosidase synthétisée pendant un temps donné dans le zygote issu d'un croisement entre une bactérie donatrice $i^+ Z^+$ et une bactérie réceptrice $i^- Z^-$. Nous avons modifié la technique proposée par Pardee, Jacob et Monod. (153) suivant le protocole décrit au chapitre suivant.

b) induction zygotique

La souche donatrice est lysogène pour λind^- . La souche réceptrice non lysogène est $\lambda^R \text{str A}$. La souche indicatrice est une souche Hfr str A.

On mesure le transfert du prophage λind^- par le nombre de plages de lyse correspondant aux bactéries réceptrices chez lesquelles le phage λind^- est entré en phase végétative.

La technique utilisée a été décrite par Jacob et Wollman (100) (101). Les dilutions du mélange de croisement sont coulées en présence de la souche indicatrice sur un milieu gélosé Luria contenant 250 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine.

4) Mesure de la synthèse protéique

Elle peut être mesurée de deux manières :

- par la synthèse de β galactosidase chez une bactérie lac^+ après induction par une solution d'Isopropyl- β -d-thiogalactopyranoside (10^{-3}M). (I.P.T.G.)
- par l'incorporation d'arginine ^{14}C chez une bactérie exigeante en 40 $\mu\text{g/ml}$ d'arginine. Le marquage est effectué par une quantité d'arginine ^{14}C correspondant à deux micro-Curies par millilitre de culture.

5) Mesure de la synthèse de DNA

La synthèse de DNA est mesurée par l'incorporation de Thymine ^3H chez une bactérie thy A faiblement exigeante en Thymine (2 $\mu\text{g/ml}$)

Le marquage est effectué par une quantité de Thymine ^3H correspondant à quatre micro-Curies par millilitre de culture.

6) Mesure de la radioactivité

a) détermination de la radioactivité acido-insoluble.

Des fractions de 0,1 ml sont prélevées à des temps déterminés, introduites chacune dans 5 ml d'acide trichloracétique à 5 p 100 à la température de 0°C, et laissées une nuit à + 4°C. On procède ensuite à leur filtration sur filtre d'acétate de cellulose de 0,45 μ (appareil Millipore) et on rince les ~~tubes~~^{filtres} par 15 à 20 ml d'acide trichloracétique à 5 p 100 froid. Les filtres sont alors parfaitement séchés sous une lampe à infra-rouge pendant une heure.

Chaque filtre est placé dans une fiole de comptage contenant 10 ml de liquide scintillateur composé de 5 g de PPO (2,5 diphényloxazole) pour un litre de toluène.

Les fioles sont comptées dans un compteur à scintillation (Beckman ou Intertechnique).

Les résultats sont exprimés en nombre de coups par minute.

b) détermination de la radioactivité acido-soluble

1 ml de culture radioactive est mélangé avec un volume égal d'acide Trichloracétique à 10% glacé. Le mélange est laissé au minimum deux heures dans la glace et centrifugé ensuite à 10 000 g pendant 10 min.

On ajoute 0,5 ml du surnageant dans une fiole contenant 10 ml du mélange scintillant suivant :

Naphtalène	50 g/l
PPO	7 g/l
POPOP	0,05 g/l
1,4 dioxane	1 litre

On passe la fiole dans le compteur à scintillation et on mesure le nombre de coups par minute produits par l'échantillon.

PPO	:	2,5 diphényloxazole
POPOP	:	1,4-di-2-(5-phenyl oxazolyl) -benzène

MISE AU POINT DE TECHNIQUES ET AMELIORATION
DES CONDITIONS EXPERIMENTALES CLASSIQUEMENT UTILISEES

A - Recherche des conditions optimales de la conjugaison

L'étude de la physiologie, des rôles et des états des cellules bactériennes donatrices et réceptrices pendant et après conjugaison nous a fait rechercher des conditions qui favorisent l'appariement et le transfert de DNA entre les cellules de sexe opposé.

I - Amélioration de l'efficacité de la conjugaison par la présence de "casaminoacids"

Nous avons observé que l'addition d'hydrolysate de caséine "casaminoacids" dans un milieu synthétique contenant déjà les facteurs de croissance, augmente l'efficacité de la conjugaison en multipliant par 3 à 4 le pourcentage de recombinaison.

(t₁)

1) Détermination du niveau d'action du "casaminoacids"

Les cinétiques d'addition du "casaminoacids" avant ou pendant le déroulement de la conjugaison montrent qu'il agit essentiellement au niveau de l'appariement des cellules sans affecter le transfert de DNA.

(t₁)

Le "casaminoacids" favorise l'appariement des cellules en activant préférentiellement les structures d'appariement des bactéries donatrices sans toucher à celles des bactéries réceptrices.

(t_{2 a} et t_{2 b})

Le "casaminoacids" déphosphaté perd son pouvoir stimulateur et le retrouve après l'addition des ions phosphates. La présence des ions phosphates, en absence de "casaminoacids" n'a aucun effet.

(t₃)

2) Interprétation des résultats

La présence de "casaminoacids" stimule essentiellement la capacité d'appariement des bactéries donatrices sans activer celle des bactéries réceptrices ni affecter le transfert de DNA. L'augmentation du taux de recombinaison semble donc être due à l'augmentation du nombre de couples

Tableau 1

Effet sur le taux de recombinaison de la présence du
"casaminoacids" dans les milieux de culture et de
conjugaison

ML = milieu de Lennox complet

CA = "casaminoacids"

Les bactéries Hfr H et F⁻ MK 20 sont cultivées et croisées en ML sans CA ou cultivées et croisées en ML avec CA. La fréquence de recombinaison des gènes thr⁺ leu⁺ est mesurée après 35 min de croisement .

	culture		croisement 35 min	% Recombinants	
	F ⁻	Hfr		<u>thr</u> ⁺	<u>leu</u> ⁺
CA	-	-	-	11,2	
CA	+	+	+	44,5	



Tableau 2

Effet sur le taux de recombinaison de la présence du
"casaminoacids" dans les cultures précédant le croisement

a - croisement effectué en présence de "casaminoacids"

ML = milieu de Lennox complet

CA = "casaminoacids"

Les bactéries Hfr H et F⁻ MK20 sont cultivées en ML avec ou sans CA et croisées en ML CA. La fréquence de recombinaison des gènes thr⁺ leu⁺ est mesurée après 35 min de croisement

	<u>culture</u>		<u>croisement 35 min</u>	<u>% Recombinants</u>	
	F ⁻	Hfr		<u>thr</u> ⁺	<u>leu</u> ⁺
CA	+	+	+	46,7	
CA	+	-	+	23	
CA	-	+	+	40,2	

Tableau 2

Effet sur le taux de recombinaison de la présence du
"casaminoacids" dans les cultures précédant le croisement

b - croisement effectué en absence de "casaminoacids"

ML = milieu de Lennox complet

CA = "casaminoacids"

Les bactéries Hfr H et F⁻ MK 20 sont cultivées en ML avec ou sans CA. Au temps zéro du croisement elles sont resuspendues par filtration en ML sans CA. La fréquence de recombinaison des gènes thr⁺ leu⁺ est mesurée après 35 min de croisement.

	<u>culture</u>		<u>Croisement 35 min</u>	<u>% Recombinants</u>	
	F ⁻	Hfr		<u>thr</u> ⁺	<u>leu</u> ⁺
CA	-	-	-	10	
CA	-	+	-	13	
CA	+	-	-	10,4	
CA	+	+	-	14	



Tableau 3

Rôle du phosphate contenu dans le "casaminoacids"

ML = milieu de Lennox complet

CA = "casaminoacids"

P = ions phosphates

CA-P : Les bactéries Hfr H et F⁻ MK 20 sont cultivées et croisées en ML additionné de CA, déphosphaté par la mixture magnésienne (NH₄Cl + MgCl₂ en présence de NaOH) ou par le CaCl₂

(CA-P) + P Les bactéries Hfr H et F⁻ MK 20 sont cultivées et croisées en ML additionné de CA déphosphaté auquel on a restitué une quantité équivalente d'ions phosphates, sous la forme du mélange (PO₄ H Na₂ + PO₄ H₂ Na)

	<u>culture</u>		<u>croisement 35 min</u>	<u>% Recombinants</u>	
	F ⁻	Hfr		<u>thr</u> ⁺	<u>leu</u> ⁺
CA-P	+	+	+	24,7	
(CA-P) + P	+	+	+	47,6	

Tableau 4

Détermination de l'étape de conjugaison sensible à la présence de casamino acids

ML = milieu de Lennox complet

CA = "casaminoacids"

Les bactéries donatrices Hfr H et réceptrices MK 20 sont cultivées en MLCA.

Au temps zéro du croisement, elles sont suspendues après filtration en ML sans CA ou ML avec CA et mélangées.

Après 10 min d'appariement, la suspension bactérienne est diluée au 1/1000ème en ML CA ou ML sans CA.

On mesure la fréquence de recombinaison des gènes thr⁺ leu⁺ après 35 min de croisement.

	Culture F ⁻	Culture Hfr	Appariement		Transfert		% recombinants	
			10 min		25 min		<u>thr</u> ⁺	<u>leu</u> ⁺
CA	+	+	+	+	+	+	40,4	
CA	+	+	+	-	-	-	42,6	
CA	+	+	-	-	-	-	14	
CA	+	+	-	+	+	+	14,6	

conjugants et à leur solidité.

Il a été montré par ailleurs qu'un effet similaire au "casaminoacids" peut être obtenu avec un mélange de tous les acides aminés si on les complète avec des ions phosphatés.

Il semble donc qu'un ou plusieurs acides aminés agissent en présence de l'ion phosphate sur l'efficacité du contact membranaire entraînant un nombre et une solidité accrues des couples tout au long de la conjugaison.

II - Conditions de croissance qui augmentent l'efficacité de la conjugaison

1) Mode de croissance des bactéries donatrices

Curtiss (43) a montré que les F pili des bactéries donatrices ^{qui} assurent l'appariement avec les bactéries réceptrices, se développent mieux en anaérobiose.

Nous avons choisi un mode de croissance aérobie suivi d'une semi-anaérobiose.

Les bactéries donatrices sont préalablement cultivées en aérobie au bain-marie agité à 37° jusqu'à la phase exponentielle de croissance. Elles sont ensuite transférées dans un tube sous une hauteur de liquide d'environ 7 cm et incubées une heure au bain-marie statique à 37° pour développer l'anaérobiose.

2) Mode de croissance des bactéries réceptrices

Les cellules bactériennes réceptrices sont cultivées en forte agitation au bain-marie à 37° pour activer l'aération.

Lorsqu'elles ont atteint la phase exponentielle de croissance, elles sont diluées ou suspendues dans un milieu neuf par filtration et remises en culture fortement agitée à 37° pendant la période d'anaérobiose de la bactérie donatrice.

3) Protocole général de la conjugaison

Les cellules bactériennes donatrices et réceptrices sont prélevées en phase exponentielle de croissance (entre 2 et $4 \cdot 10^8$ bactéries par ml) et mélangées dans la proportion de une bactérie donatrice pour quatre bactéries réceptrices.

L'appariement des cellules est effectué à 37° au bain-marie statique pendant 10 à 15 min.

L'ensemble des cellules appariées est ensuite agité très faiblement à 37° pour favoriser l'oxygénation des cellules pendant le transfert de DNA.

Remarques :

Le titrage des phages libérés par induction zygotique et dénombrement des recombinants ont été décrits dans le chapitre matériel et méthodes. La mesure de l'induction zygotique, de la β galactosidase et le dénombrement des zygotes sont décrits dans ce chapitre.

III - Conclusions

La présence de "casaminoacids" et les conditions utilisées donnent un taux de recombinaison élevé qui peut atteindre 50% pour un gène transféré en tête du chromosome ce qui correspond à une efficacité de transfert d'environ 100%.

(P 1

Ceci implique que dans nos conditions expérimentales toutes les bactéries donatrices peuvent croiser lorsqu'elles sont mises en présence d'un excès de bactéries réceptrices.

Ceci est vérifié par des taux d'induction zygotique qui avoisinent 95% lorsque la bactérie donatrice utilisée est lysogène pour le prophage λ .

B - Rôle de la streptomycine ajoutée pendant le déroulement de la conjugaison

I - Introduction

La suspension des bactéries croisées ne constitue pas un système homogène.

Un excès de bactéries réceptrices par rapport aux bactéries donatrices est en général utilisé car l'expérience montre que le taux de conjugaison est supérieur dans ces conditions.

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que la majorité des bactéries donatrices s'apparie dès la mise en contact avec des bactéries réceptrices en excès. Après cette période d'appariement, il reste cependant des bactéries donatrices non appariées qui peuvent croiser tardivement avec

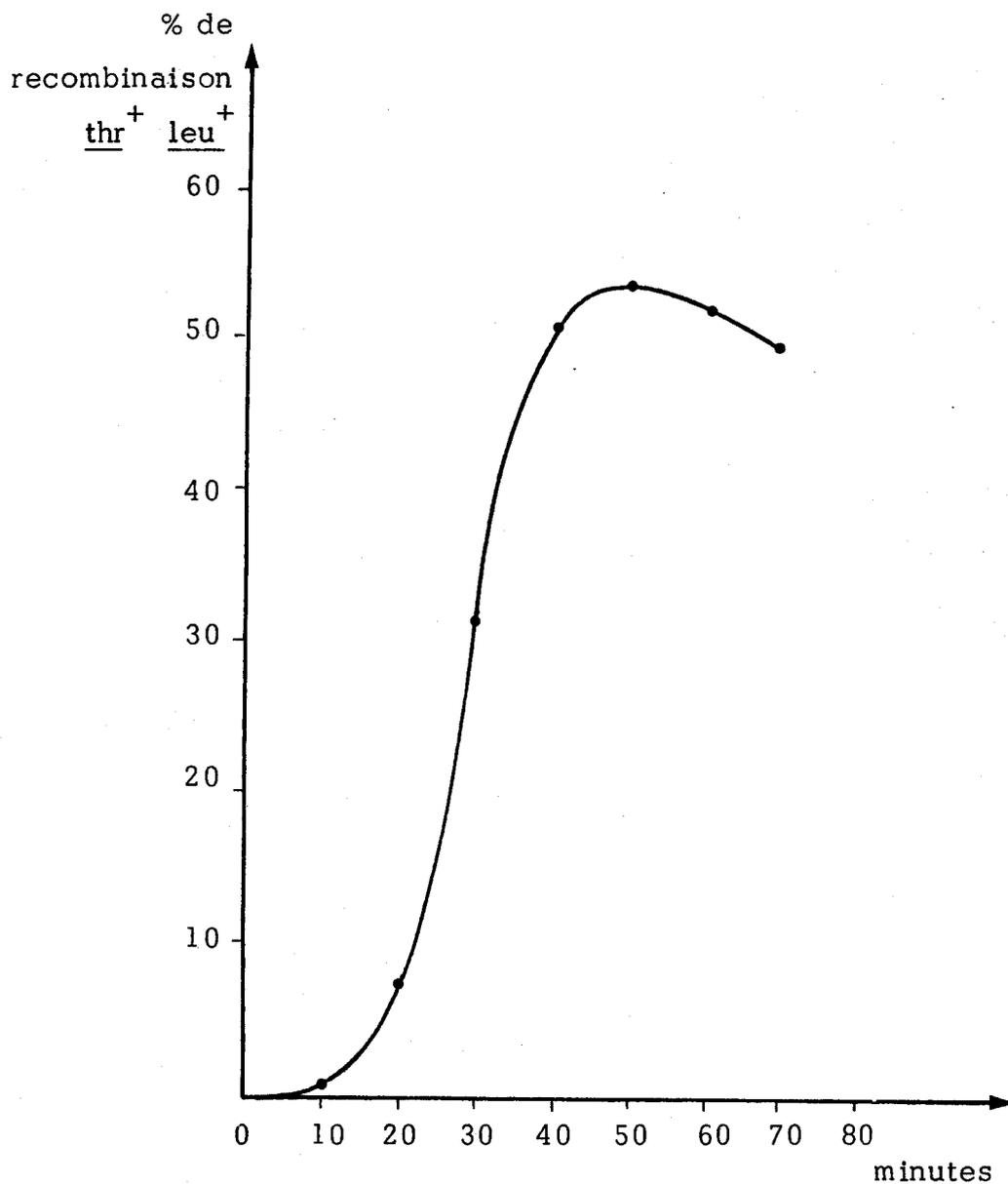


Figure 1 : Fréquence élevée de recombinaison des gènes $thr^+ leu^+$
obtenue dans nos conditions expérimentales
croisement Hfr MK 1 X MK 20



les bactéries réceptrices en excès, et des cellules isolées qui proviennent de croisements interrompus spontanément au cours de l'incubation du mélange de conjugaison.

Pour étudier plus spécifiquement les couples en conjugaison, il faut donc éviter l'interférence des cellules non appariées et empêcher les conjugaisons successives qui font évoluer le système.

Le procédé classique, utilisé dans les laboratoires, est la dilution au 1/1000^{ème} du mélange de conjugaison après appariement des cellules. Ce procédé ne modifie pas le transfert de DNA en cours mais empêche les nouvelles conjugaisons par éloignement des cellules. (80)

Le procédé de dilution présente l'inconvénient de donner une concentration trop faible en cellules ou des volumes trop importants lors des études de marquage par les isotopes radioactifs. Il provoque en outre un temps de latence dans la croissance des cellules et la synthèse de certains enzymes comme la β galactosidase et une légère induction du prophage chez les bactéries lysogènes. De plus, l'activité métabolique des bactéries donatrices non conjugantes n'est pas inhibée.

Hayes (83) a montré qu'une suspension de bactéries croisées en présence de streptomycine ne donnait naissance à des recombinants que dans la combinaison bactéries donatrices sensibles à l'antibiotique et bactéries réceptrices résistantes. Avec la même combinaison de cellules nous avons mis au point un procédé équivalent à celui de la dilution en ajoutant de la streptomycine dans la suspension des bactéries croisées après appariement des cellules. En effet, la streptomycine étant un inhibiteur de la synthèse protéique, nous avons pensé qu'elle pouvait bloquer la synthèse des F pili et empêcher de ce fait la formation ultérieure des couples sans agir sur les couples déjà existants ni inhiber les transferts de DNA en cours.

II - La streptomycine n'inhibe pas le transfert de DNA

Nous avons montré que l'introduction de streptomycine dans la suspension bactérienne après appariement des bactéries donatrices et réceptrices, n'inhibe pas ni ne modifie le transfert de DNA entre les cellules appariées.

expérience 1

On remarque une cinétique normale de transfert de différents gènes répartis sur le chromosome et en particulier des gènes distaux sans modification des temps d'entrée dans la bactérie réceptrice.

(42)

expérience 2

Le même nombre de recombinants pour les gènes distaux arg⁺ est obtenu avec des échantillons de croisement traités ou non par la streptomycine. Pour les gènes proximaux thr⁺ leu⁺, le nombre plus élevé obtenu avec l'échantillon de croisement non traité est sans doute dû aux croisements successifs qui se produisent en absence de streptomycine.

(45)

III - La streptomycine bloque l'appariement des bactéries donatrices et réceptricesexpérience 1

Pour montrer que la streptomycine inhibe la formation des couples, nous avons comparé son action sur la formation des couples à 37°C et à 30°C, le transfert de DNA étant toujours réalisé à 37°C.

(46)

L'efficacité d'appariement est beaucoup plus grande à 37°C qu'à 30°C température à laquelle la croissance des F pili est plus faible (127) (143). L'appariement de l'ensemble des bactéries donatrices aux bactéries réceptrices devrait être terminé après un temps beaucoup plus court à 37°C qu'à 30°C et la période d'effet de la streptomycine sur la formation des couples devrait donc être également beaucoup plus courte à 37°C qu'à 30°C.

Le taux d'appariement est mesuré par le taux de transfert qui est fonction du nombre de couples conjugants. Les résultats obtenus pour deux échantillons de croisement dans lesquels la streptomycine a été ajoutée au temps zéro et à 10 min sont comparés avec ceux obtenus pour un échantillon de croisement non traité.

- Appariement des cellules à 37°C

Le taux de transfert est diminué de 30% quand la streptomycine est ajoutée juste après le contact des cellules, mais n'est plus affecté

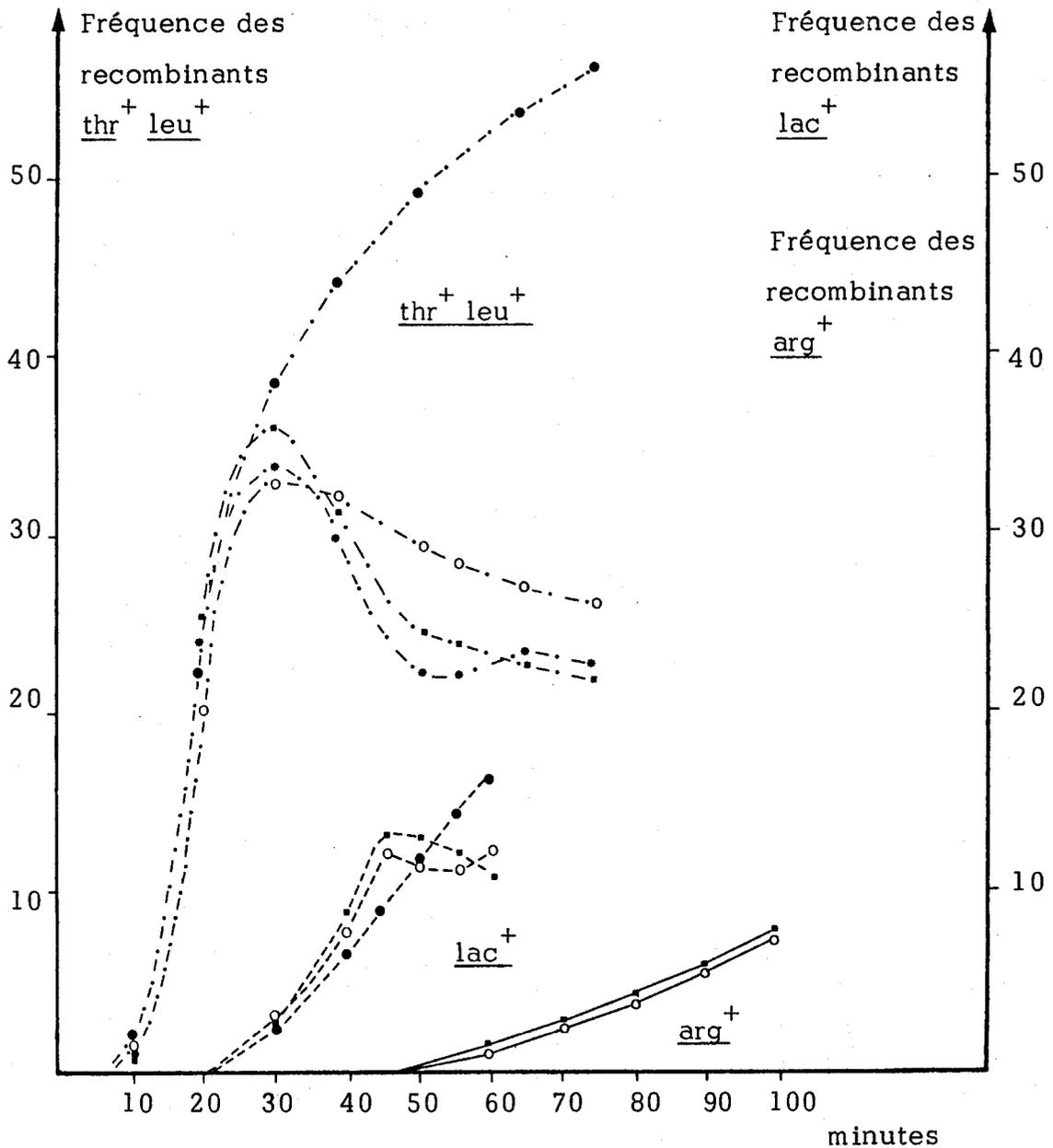


Figure 2 : La présence de streptomycine lors de conjugaison ne modifie pas le transfert de DNA

Cinétique d'apparition des recombinants $\underline{thr}^+ \underline{leu}^+$, \underline{lac}^+ et \underline{arg}^+ dans 3 échantillons de croisement Hfr H X MK 20

- — — échantillon normal
- — — échantillon mis en présence de streptomycine à 10 min
- — — échantillon dilué au 1/1000^{ème} à 10 min
- *— — — échantillon dilué au 1/1000^{ème} à 10 min en présence de streptomycine



Tableau 5

Aucune inhibition du transfert des marqueurs tardifs
en présence de streptomycine

Dénombrement des recombinants formés dans
2 échantillons du croisement Hfr H X MK 20
incubés pendant une heure l'un sans
streptomycine, l'autre en présence de
streptomycine ajouté à 10 mn du début du
croisement.

Nombre de recombinants	Croisement sans streptomycine	Croisement mis en présence de streptomycine à 10 mn
<u>thr</u> ⁺ <u>leu</u> ⁺	410. 10 ⁵	312. 10 ⁵
<u>arg</u> ⁺	464. 10 ⁴	454. 10 ⁴



Tableau 6

Blocage de la formation des couples conjugants par
la streptomycine

3 échantillons du croisement Hfr K 10 X MK 20 ont été incubés 10 mn à 30° puis à 37° et exposés à la streptomycine, l'un immédiatement, l'autre 10 min après et le 3ème 30 min plus tard.

3 autres échantillons du même croisement ont été incubés constamment à 37°c et exposés aux mêmes temps à la streptomycine.

Le taux de transfert a été déterminé par la quantité de β galactosidase produite dans les zygotes.

Appariement à 37° et addition de streptomycine à	β galactosidase produite	Appariement à 32° et addition de streptomycine à	β galactosidase produite
0 mn	6	0 mn	1,10
10 mn	8,88	10 mn	1,52
30 mn	8,58	30 mn	2,95



quand l'addition est faite à 10 min du croisement où l'appariement est totalement terminé.

- appariement des cellules à 30°C

Le taux de transfert est diminué de 60% quand la streptomycine est ajoutée au temps zéro du croisement et reste inférieur de 50% quand l'addition est faite à 10 min.

La durée pendant laquelle se fait sentir l'effet de la streptomycine dépend de la vitesse d'appariement des bactéries. Après 10 min de contact à 37°C, l'appariement des cellules est total alors qu'il nécessite un temps beaucoup plus long à 30°C.

expérience 2

La dilution au 1/1000 d'une suspension de bactéries donatrices et réceptrices empêche la formation des couples par éloignement des cellules (80).

L'inhibition de la formation des couples par la streptomycine a été comparée à ce procédé.

(figure 2 et figure 4).

Nous avons suivi les cinétiques d'apparition de recombinants dans trois échantillons de croisement traités de la façon suivante :

- l'un est dilué au 1/1000 à 10 min
- le deuxième est additionné de streptomycine à 10 min
- le troisième est dilué au 1/100 en présence de streptomycine à 10 min

Les cinétiques d'apparition de recombinants sont identiques pour les 3 échantillons de croisement, aussi bien pour les gènes proximaux que distaux.

IV - La streptomycine empêche la conjugaison des bactéries donatrices issues de la séparation de couples conjuguants.

expérience 1

L'efficacité de séparation des couples en présence de streptomycine est déterminée par l'absence de transfert d'un gène distal à l'interruption du chromosome transféré. (tableau 7).

Tableau 7

Absence de transfert de DNA après séparation des couples
conjugants en présence de streptomycine

3 échantillons du croisement Hfr H X MK 20
ont été incubés 60 mn à 37°C et traités de
la façon suivante :

un échantillon a été exposé à la streptomycine
à 55 mn, l'autre à 10 mn, le 3ème à 10 mn mais
a été soumis à 15 mn au traitement du vortex
pendant 3 mn.

Le taux de transfert a été mesuré par la
 β galactosidase induite dans les zygotes.

croisement de 60 mn avec addition de streptomycine :			
	à 60 mn	à 10 mn	à 10 mn et agitation au vortex à 15 mn
β galactosidase produite	8,54	8,01	0,26

Les couples sont séparés mécaniquement en présence de streptomycine lors d'une conjugaison avant le passage du gène lac⁺. Le transfert du gène lac⁺ n'est plus observé dans la bactérie réceptrice au cours d'une incubation ultérieure de la suspension bactérienne.

expérience 2

L'absence de reconjugaison des bactéries donatrices est pratiquement totale après séparation des couples en présence de streptomycine.

(f 4

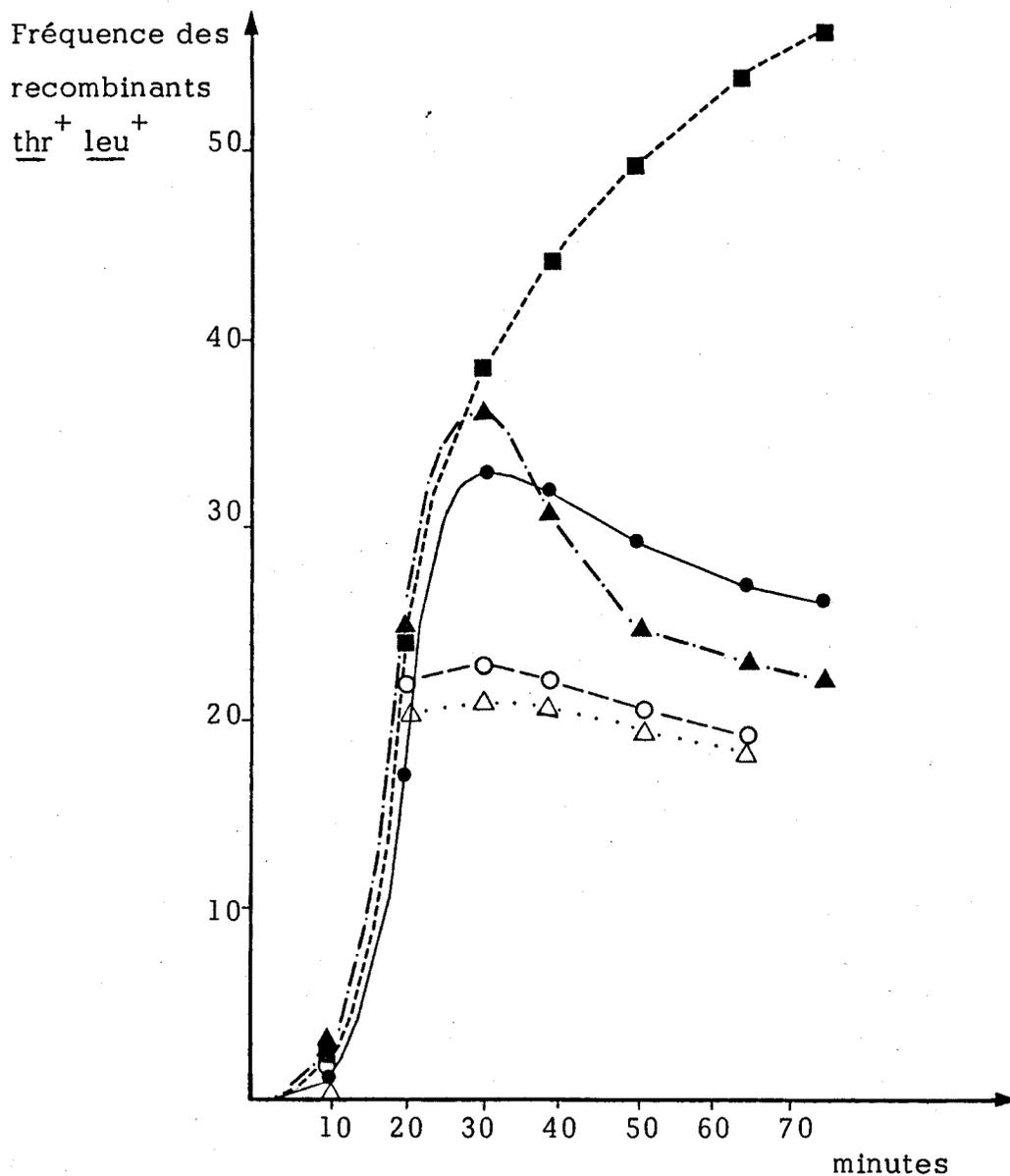
En ~~conjugant~~^{comparant} aux résultats obtenus après séparation des couples dans un échantillon de croisement dilué au 1/1000, on constate que les courbes cinétiques d'apparition de recombinants présentent dans les 2 cas un plateau qui indique l'absence de reconjugaison.

V - Intérêt de la présence de streptomycine pendant le déroulement de la conjugaison

L'addition de streptomycine pendant le déroulement de la conjugaison permet d'"isoler" les couples conjuguants parmi d'autres cellules. La présence de l'antibiotique évite l'interférence des bactéries Str^S non appariées et les conjugaisons successives sans modifier le transfert de DNA entre les cellules appariées.

La présence de streptomycine après séparation des couples, permet également d'étudier spécifiquement la physiologie des bactéries donatrices ou réceptrices exconjugantes en tuant le partenaire sensible à l'antibiotique dans les combinaisons bactéries donatrices Str^S/bactéries réceptrices strA et bactéries donatrices strA/bactéries réceptrices Str^S.

Figure 4 : Absence de conjugaison après agitation au vortex d'un échantillon de croisement contenant de la streptomycine



Cinétique d'apparition des recombinants $\underline{thr}^+ \underline{leu}^+$ dans 3 échantillons de croisement Hfr H X MK 20.

- - échantillon non traité
- - échantillon mis en présence de streptomycine à 10 min
- ▲— - échantillon dilué au 1/1000ème à 10 min

A 20 min ont été agités au vortex pendant 3 min :

- 1 aliquot de l'échantillon dilué au 1/1000 ème
- △— 1 aliquot de l'échantillon contenant la streptomycine



C - Mesure du transfert de DNA pendant la conjugaison

I - Induction zygotique de la β galactosidase

a) protocole du croisement

Le transfert de DNA est mesuré par la quantité de β galactosidase synthétisée pendant un temps donné dans le zygote issu d'un croisement entre une bactérie donatrice $i^+ Z^+$ et une bactérie réceptrice $i^- Z^-$. La technique proposée par Pardee, Jacob et Monod (1953) a été modifiée suivant le protocole décrit afin de la rendre plus sensible.

Les bactéries donatrices et réceptrices sont cultivées en milieu synthétique de Lennox complété par les facteurs de croissance, du "casaminoacids" (0,2%) et du glucose (1%) suivant les modalités décrites en début de chapitre. Elles sont mélangées dans les proportions de 1 ml de bactéries donatrices pour 4 ml de bactéries réceptrices. La streptomycine (250 μ g/ml) est introduite à 10 min dans la suspension bactérienne pour éviter la formation ultérieure de couples conjugants.

Dans ces conditions on n'observe pas de synthèse de β galactosidase chez la bactérie donatrice. Le croisement est interrompu au temps voulu par une agitation de 3 mn au "vortex" et incubé ensuite 30 mn à 37°C dans un bain-marie agité pour laisser exprimer le gène lactose transféré.

b) dosage de la β galactosidase

La suspension de 5 ml de bactéries ^{en croisement} est additionnée de chloramphénicol (200 μ g/ml), refroidie dans la glace, et centrifugée. Le culot bactérien est suspendu dans 1,5 ml de tampon phosphate 0,125 M, et incubé à 37°C en présence de deux gouttes de Toluène pour permeabiliser les bactéries.

La réaction colorée ^{commence par} ~~démarre avec~~ l'addition de 0,5 ml d'une solution d'O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (5 μ g/ml). La réaction est arrêtée par addition de 1 ml d'une solution de $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ 0,25 M et mise à 0°C.

Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation et le surnageant coloré traité par deux gouttes d'une solution de Lauryl Sulfate à 30%.

Ce procédé évite l'interférence des débris cellulaires à 420 nm et la correction des mesures obtenues par la détermination de l'absorption des débris cellulaires à 550 nm.

La densité optique est mesurée à 420 nm dans un spectrophotomètre Zeiss.

Les résultats sont donnés en densité optique à 420 nm/heure/ml de tampon de dosage.

II - Dénombrement des zygotes sur milieu de Chapman lactosé T.T.C. (chlorure de 2-3-5-triphenyltetrazolium)

C'est un milieu riche produit par l'Institut Pasteur de Paris sur lequel les bactéries lac^- apparaissent sous forme de colonies rouges et les bactéries lac^+ sous forme de colonies jaunes.

Il est additionné de 250 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine pour contre sélectionner les bactéries donatrices sensibles à l'antibiotique.

Aucune diffusion des colorants ne se produit. On peut facilement dénombrer des colonies sectoriées telles qu'une colonie lac^+ de 0,1 mm au sein d'une colonie lac^- de 1mm. Une étude systématique a montré que ce type de colonie mixte n'apparaît pas sur milieu de sélection synthétique classique sous forme d'une colonie de recombinants. On peut donc dénombrer sur ce milieu des zygotes qui ont reçu le gène lac^+ mais qui ne donneront pas ensuite un recombinant. On trouve régulièrement deux fois plus de zygotes lac^+ sur ce milieu que de recombinants lac^+ sur un milieu synthétique classique.

Ce milieu est donc particulièrement approprié pour suivre l'apparition de transconjugants (sexductants) lac^+ et zygotes lac^+ .

Remarque 1

Pour dénombrer les transconjugants zygotes sur boîte de Chapman lactosé TTC, nous avons étalé par fraction 1 ml d'une dilution appropriée du croisement sur plusieurs boîtes pour obtenir plus de précision dans le dénombrement des colonies.

Remarque 2

Nous avons reconstitué un milieu identique contenant du galactose

à la place du lactose pour sélectionner de la même manière les sexductants gal⁺ et les zygotes gal⁺.

D - Synchronisation de la réplication bactérienne par le chloramphénicol

I - Intérêt de la technique

Différents moyens de synchronisation sont en général utilisés :

- la synchronisation de la réplication semi-conservative

Elle est obtenue en inhibant la synthèse protéique par carence en acides aminés (128) ce qui empêche le démarrage de nouveaux cycles de réplication tout en laissant se terminer les cycles en cours.

- la synchronisation de la division cellulaire

Elle peut être obtenue :

* avec la méthode précédente si la période de carence en acides aminés est suivie d'une période de carence en thymine après restitution des acides aminés. (122)

* par des moyens physiques, tels que filtration ou gradient de saccharose (125) (132), qui permettent la sélection directe, des bactéries de même taille.

Les techniques de synchronisation ont souvent été décrites pour E. coli B ou E. coli C et n'ont pas toujours donné des résultats satisfaisants chez E. coli K 12.

La carence en acides aminés perturbe souvent le métabolisme bactérien. Les bactéries réceptrices qui ont été carencées n'ont plus la capacité de conjuguer immédiatement après la restitution des acides aminés. Les techniques par filtration ou gradient de saccharose donnent un nombre insuffisant de bactéries pour qu'il soit possible de les appliquer au système de conjugaison. Nous avons donc été amené à mettre au point une nouvelle technique de synchronisation.

Les résultats étant en faveur d'un état de compétence lié au cycle de réplication de la bactérie réceptrice, nous avons synchronisé la réplication en bloquant la synthèse protéique par un antibiotique, le chloramphénicol.

Le chloramphénicol a été choisi pour ses propriétés bactériostatiques et l'absence d'effets secondaires après son élimination, lorsqu'il est utilisé à la concentration de 10 μg pour 2 à 410^8 bactéries par millilitre.

II - Détermination de la synchronisation de la réplication après action du chloramphénicol

Expérience 1

Nous avons suivi l'incorporation d'arginine ^{14}C en présence et en absence de 10 $\mu\text{g/ml}$ de chloramphénicol dans 2 échantillons de culture préalablement marqués par de l'arginine ^{14}C .

Nous avons tout d'abord montré que la concentration de 10 μg de chloramphénicol par ml était suffisante pour bloquer immédiatement la synthèse protéique. Dans ces conditions, l'incorporation d'arginine ^{14}C cesse immédiatement dans l'échantillon de culture qui a reçu le chloramphénicol.

(f 5

Des résultats analogues sont obtenus lorsque la synthèse protéique est mesurée par la synthèse de β galactosidase.

Expérience 2

Nous avons fait agir le chloramphénicol sur les bactéries MK 13 préalablement marquées à la thymine ^3H et continué l'incorporation de thymine ^3H en présence de l'antibiotique.

La radioactivité initiale, mesurée sur un aliquot de culture au temps zéro de l'addition de chloramphénicol, est égale à 9 200 C. P. M.

L'arrêt de la réplication est obtenu progressivement après 40 à 50 mn d'action du chloramphénicol. La radioactivité mesurée après cette période sur un aliquot de culture est égale à 12 400 C. P. M.

La quantité d'ADN synthétisée équivaut à $12\,400 - 9\,200 = 3\,200$ C.P.M. qui représentent 35% de la quantité initiale (9.200 C.P.M.) Il existe donc pendant la période d'action du chloramphénicol, une synthèse résiduelle de DNA de 35 pour cent qui doit correspondre à la terminaison de tous les cycles de réplication.

(f 6

C.P.M. X 10³

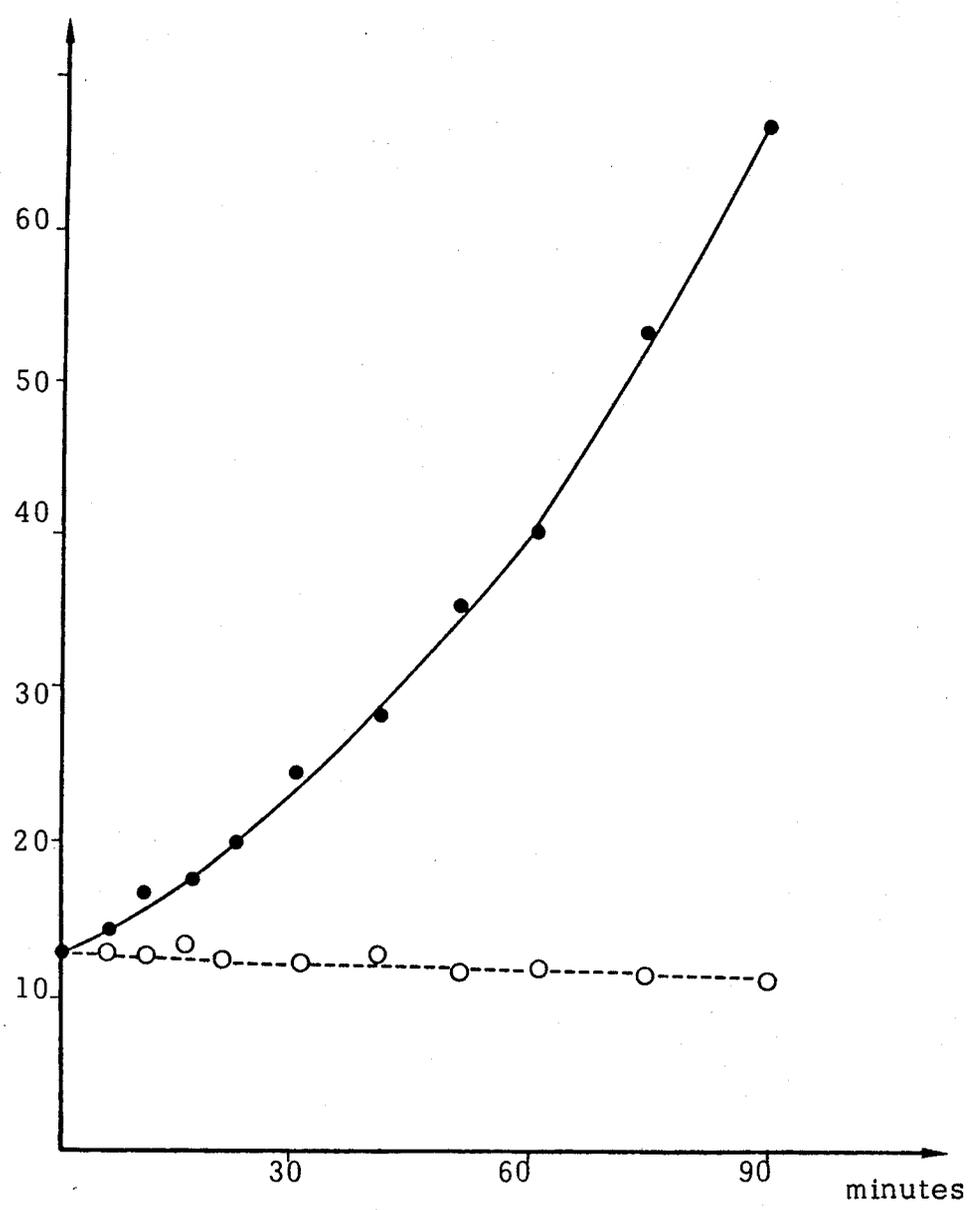


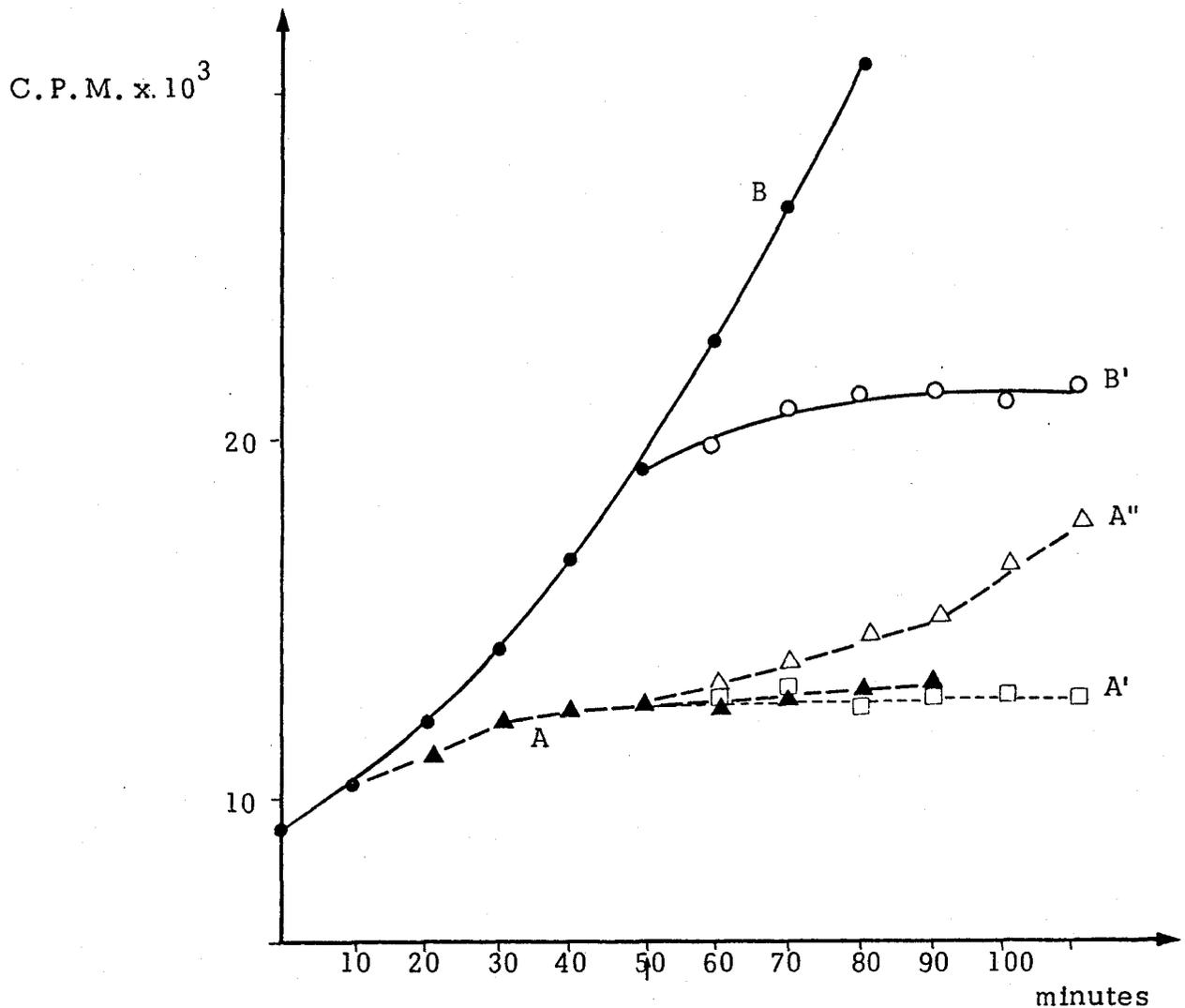
Figure 5 : Blocage immédiat de l'incorporation d'arginine ¹⁴C par 10 µg/ml de chloramphénicol

L'incorporation d'arginine ¹⁴C en milieu de Lennox contenant 2 µCi/ml d'arginine ¹⁴C a été mesurée dans 2 échantillons de culture de bactéries MK 20 préalablement marquées à l'arginine ¹⁴C.

- échantillon qui n'a pas reçu de chloramphénicol
- échantillon qui a reçu 10 µg/ml de chloramphénicol au temps zéro



Figure 6 : Terminaison des cycles de réplication en présence de chloramphénicol



Les bactéries MK 13 sont marquées au préalable par de la thymine tritiée pendant 3 générations.

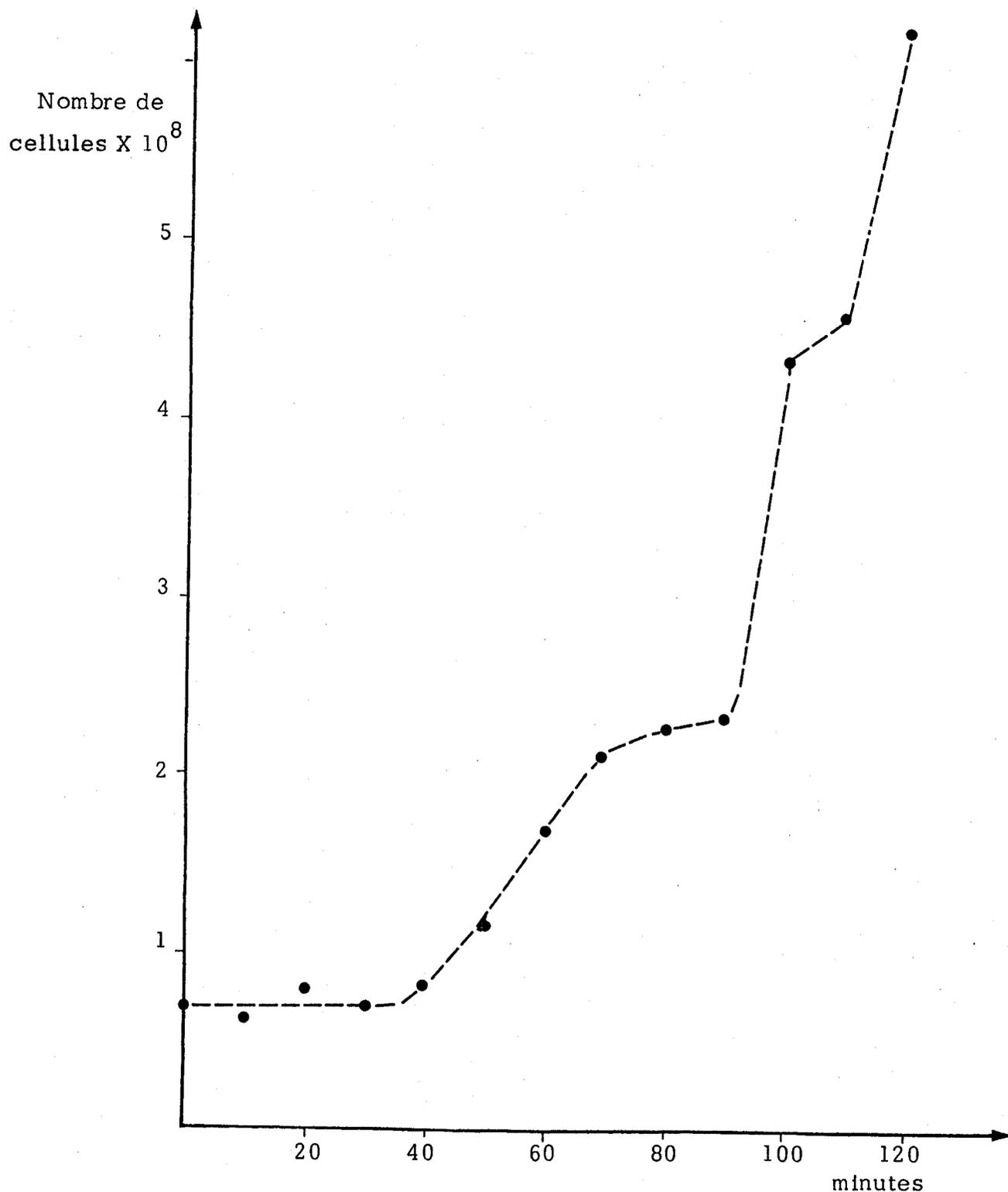
- Au temps zéro de l'expérience, le marquage de 2 échantillons A (▲) et B (●) de ces bactéries a été poursuivi, l'échantillon A (▲) ayant reçu 10 µg/ml de chloramphénicol au temps zéro.

- A 50 mn, on a prélevé dans les échantillons A et B des sous échantillons A' A'' et B' et continué le marquage.

Dans A' (□) et A'' (△) on a éliminé le chloramphénicol. Dans A' (□) et B' (○) on a ajouté 250 µg/ml de streptomycine.

- On a indiqué en ordonnée la radioactivité du matériel TCA insoluble des fractions prélevées aux temps indiqués en abscisse.

Figure 7 : Synchronisation des bactéries par traitement au chloramphénicol
suivi d'une carence en thymine



Les bactéries MK 13 cultivées en milieu de Lennox complet ont été traitées 40 mn par 40 µg/ml de chloramphénicol. Après 2 filtrations successives, les bactéries ont été suspendues en absence de chloramphénicol et de thymine pendant 1 heure. La cinétique de division cellulaire a été suivie après restitution de la thymine en dénombrant les bactéries sur boîtes gélosées Luria.

Ceci est en accord avec la théorie qui prévoit 33% et les expériences de carence en acides aminés de Lark (114) et Maabøe (122) qui donnent 40%.

Expérience 3

Pour démontrer que tous les chromosomes sont au point zéro de la réplication après action du chloramphénicol, nous avons éliminé l'antibiotique par filtration et suivi le démarrage de la réplication par incorporation de thymine ^3H en présence ou en absence de synthèse protéique.

Si tous les chromosomes sont au point zéro de la réplication, la réplication devrait démarrer en même temps chez toutes les bactéries si on ne bloque pas de nouveau la synthèse protéique. Par contre aucun démarrage de la réplication ne devrait se produire en absence de synthèse protéique.

Si après action du chloramphénicol les chromosomes ne sont pas bloqués au point zéro, une synthèse résiduelle de DNA correspondant aux fins de cycles de réplication devrait être observée en absence de synthèse protéique.

Dans ce but, nous avons montré au préalable que l'inhibition de la synthèse protéique par la streptomycine dans un échantillon de culture non traité par le chloramphénicol, bloque également le démarrage des cycles de réplication ~~tout~~ en laissant se terminer les cycles de réplication en cours.

L'arrêt de la réplication est observée après 40 à 50 mn d'action de streptomycine, période pendant laquelle est synthétisée une quantité de DNA de 34% correspondant ~~à la~~ terminaison des cycles de réplication.

Si l'on fait agir la streptomycine après élimination du chloramphénicol, aucun démarrage de la réplication n'est observée, alors que la réplication reprend dans ces conditions en absence de streptomycine.

(J 6

Tous les cycles de réplication sont donc terminés en présence de chloramphénicol. Après élimination de l'antibiotique, la réplication

est synchronisée et démarre au même moment chez toutes les bactéries.

Expérience 4

La synchronisation de la division cellulaire ne peut être observée dans ces conditions puisqu'il y a eu blocage de la synthèse protéique. Par contre si l'on restaure la synthèse protéique après le traitement par le chloramphénicol (40 μg par ml pendant 40 mn) tout en maintenant la réplication au stade zéro par une période de carence en thymine de 1M , on observe une synchronisation de la division cellulaire après restitution de la thymine (figure : 7 page) comme dans les méthodes classiques où l'on couple carence en acides aminés et carence en thymine (122). Ceci est un argument supplémentaire qui montre bien que la réplication est synchronisée après action du chloramphénicol.

III - Protocole utilisé

Pour déterminer les relations entre état de compétence et cycle de réplication du DNA chez les bactéries réceptrices, nous avons choisi de synchroniser seulement la réplication.

Nous avons fait agir le chloramphénicol pendant 50 mn à la concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sur une culture de bactéries réceptrices en phase exponentielle de croissance (2 à 4 10^8 bactéries/ml).

Après élimination du chloramphénicol par deux filtrations successives et lavage des bactéries, la reprise de la réplication et de la croissance bactérienne s'effectue sans délai. La courbe de croissance n'a pas le profil théorique des courbes de synchronisation. Deux divisions successives sont cependant observées dans la majorité des cas, l'une au démarrage de la croissance, l'autre 40 mn après.

(f 15

Une étude au microscope optique a confirmé qu'il y avait une majorité de petites bactéries qui semblent s'être divisées à ces deux périodes. On a pu également observer un grossissement progressif des bactéries dans la période intermédiaire. Ceci indique que la population doit être synchronisée dans son ensemble.

E - Mise au point d'une technique de sensibilisation du DNA à 313 nm par incorporation de 5-bromo-2'-desoxyuridine (BUdR)

I - Principe de la technique

La substitution de la thymine par l'analogue 5 bromouracile rend le DNA sensible à l'inactivation par la lumière visible proche (313 nm).

Le DNA normal contenant de la thymine ne l'est pas (166) (73) (153) (176)

de 2 ug/ml) Nous avons mis au point un système de travail basé sur l'incorporation de BUdR par les cellules bactériennes rendant le DNA sensible à 313 nm.

Un tel système permet de suivre la réplication du DNA mis en présence de BUdR ou le transfert d'un brin de DNA préalablement marqué au BUdR et son devenir dans le zygote puisqu'il est une cible spécifique du rayonnement de 313 nm.

II - Système d'irradiation

Nous avons choisi une lampe Astralux AS 300 de 250 watts qui émet un spectre large de longueurs d'onde allant de l'ultraviolet au visible englobant celle de 313 nm.

Nous avons sélectionné la région de longueur d'onde 313 nm par un ensemble de filtres chimiques qui éliminent les autres longueurs d'onde par absorption.

Nous avons pris une solution de thymine pour absorber les rayonnements de l'ultraviolet et une solution de bichromate de potassium pour absorber les rayonnements du visible.

Les solutions sont placées respectivement dans des coupelles de verre superposées qui coiffent le récipient contenant la suspension bactérienne à irradier.

La durée de l'irradiation a été déterminée pour obtenir une survie de 95 à 100% des bactéries qui n'ont pas incorporé du BUdR et une survie de 0,1% des bactéries cultivées en présence de BUdR.

Les résultats sont donnés en pourcentage de survie par rapport à un aliquot témoin non irradié.

LES CYCLES DE COMPETENCE A LA CONJUGAISON
CHEZ LES BACTERIES RECEPTRICES

I - Etat de compétence pour la conjugaison des bactéries réceptrices. (111)

1) Introduction

Nous avons vu dans la partie bibliographique qu'il est difficile de définir le rôle exact des bactéries réceptrices pendant le déroulement du transfert génétique.

Les études concernant l'implication de la réplication végétative dans le processus de transfert de DNA chez les bactéries réceptrices ont donné des résultats contradictoires suivant les moyens utilisés pour bloquer la réplication du DNA et suivant les techniques de mesure du transfert génétique.

Le fait que des zygotes se forment dans des croisements où les bactéries réceptrices ont la réplication bloquée a été interprété comme une absence de participation de la bactérie réceptrice au déroulement du transfert de DNA (65, 16, 17, 176). Il est cependant possible que le stade où se trouve bloquée la réplication soit seul suffisant et même nécessaire à la conjugaison de la bactérie réceptrice.

Nous avons considéré l'alternative suivante :

- 1 - La capacité de conjuguer de la bactérie réceptrice n'existe qu'à une période déterminée du cycle cellulaire.
- 2 - La capacité de conjuguer de la bactérie réceptrice existe tout au long du cycle cellulaire.

Nous avons appelé état de compétence la capacité de conjuguer de la bactérie réceptrice et stade de compétence la période délimitée du cycle cellulaire pendant laquelle se développe l'état de compétence de la bactérie réceptrice.

Dans l'hypothèse d'un stade unique de compétence, une fraction seulement des bactéries réceptrices d'une population en phase exponentielle de croissance devrait pouvoir conjuguer à chaque instant.

Des bactéries réceptrices exconjugantes ne devraient pas pouvoir conjuguer immédiatement une deuxième fois.

Les bactéries réceptrices compétentes devraient être au même stade de croissance, et donner donc naissance, à des zygotes qui se divisent de façon synchronisé.

Dans la deuxième hypothèse, toutes les bactéries réceptrices d'une population en phase exponentielle de croissance devraient pouvoir conjuguer à chaque instant qu'elles aient conjuguer ou non auparavant. Les zygotes issus de ces bactéries réceptrices devraient se multiplier de façon exponentielle.

Dans une première partie, les expériences ont été effectuées avec des bactéries réceptrices non synchronisées dans le but de vérifier les propositions énoncées et de mettre en évidence l'existence d'un stade de compétence. Celles de la deuxième partie ont été effectuées avec des bactéries réceptrices synchronisées dans le but de déterminer l'étape du cycle cellulaire au cours de laquelle la bactérie réceptrice passe par un état de compétence pour la conjugaison.

Le transfert de DNA a été mesuré par l'apparition de zygotes, des recombinants, et l'induction zygotique du prophage λ ou de la β galactosidase selon les techniques décrites dans les deux chapitres précédents.

2) Taux de transfert obtenu dans des croisements où les rapports bactéries donatrices/bactéries réceptrices sont différents

Dans l'hypothèse où la bactérie réceptrice est compétente tout au long du cycle cellulaire, elle devrait pouvoir conjuguer à tout moment de sa croissance. Toutes les bactéries réceptrices d'une population en phase exponentielle de croissance devraient donc conjuguer à chaque instant. Le nombre de zygotes formés ne devrait dépendre que de la quantité des bactéries donatrices mises en présence des bactéries réceptrices.

Dans l'hypothèse où la compétence de la bactérie réceptrice est liée à un stade déterminé de la croissance, seule la fraction de population des bactéries réceptrices à ce stade pourra conjuguer à chaque instant. Cette fraction étant proportionnelle au nombre de bactéries réceptrices de

la population, le nombre de zygotes formés serait ici fonction du nombre de bactéries réceptrices mises en présence des bactéries donatrices.

a) Expérience réalisée

Nous avons effectué des croisements où la quantité de bactéries donatrices varie par rapport aux bactéries réceptrices

Nous avons mesuré le nombre de zygotes formés par l'induction zygotique de la β galactosidase et déterminé s'il dépend du nombre de bactéries donatrices ou réceptrices présentes dans le croisement.

La comparaison de croisements, où à la même quantité de bactéries réceptrices ont été ajoutées la moitié, la même quantité ou 5 fois plus de bactéries donatrices montre que la ^{quantité de} β galactosidase synthétisée est identique dans les trois croisements.

La comparaison des croisements où les proportions des bactéries donatrices et réceptrices sont inverses montre que la ^{quantité de} β galactosidase synthétisée augmente nettement quand 5 fois plus de bactéries réceptrices sont croisées avec les bactéries donatrices.

(8

Ceci indique que le nombre de zygotes formés est fonction de la quantité de bactéries réceptrices mises en présence des bactéries donatrices et non pas de l'inverse.

Nous avons porté sur un graphique les taux de transfert en fonction des rapports bactéries donatrices/bactéries réceptrices des croisements correspondants. L'efficacité de transfert augmente rapidement avec le nombre de bactéries réceptrices ;

le maximum d'efficacité est atteint pour le rapport 1 bactérie donatrice/10 bactéries réceptrices.

(8

b) Interprétation des résultats

Les bactéries donatrices en excès ne saturent jamais les bactéries réceptrices bien que dans nos conditions expérimentales

Tableau 8

La quantité de β galactosidase produite dans un croisement entre bactéries donatrices et réceptrices dépend de la proportion des deux types de bactéries

	β galactosidase produite		
	0,5 bactérie donatrice	1 bactérie donatrice	5 bactéries donatrices
1 bactérie réceptrice	3,04	3	2,85
5 bactéries réceptrices	10,2		

5 croisements Hfr H X MK 20 de 10 mn poursuivis 30 mn en présence de streptomycine sont réalisés avec les proportions suivantes de bactéries :

- d'une part à un nombre déterminé de bactéries réceptrices, on a ajouté la moitié, le même nombre ou 5 fois plus de bactéries donatrices

- d'autre part, à un nombre déterminé de bactéries donatrices on a ajouté le même nombre ou 5 fois plus de bactéries réceptrices

On a déterminé la quantité de β galactosidase produite dans chaque croisement.



toutes les bactéries donatrices d'une population en phase exponentielle de croissance aient la capacité de conjuguer comme nous l'avons montré précédemment. Cela suggère que dans une population de bactéries réceptrices en croissance une fraction seulement peut conjuguer à tout instant.

Les résultats sont donc compatibles avec la deuxième proposition selon laquelle la compétence de la bactérie réceptrice est liée à un stade déterminé de la croissance.

Nous avons appelé les bactéries réceptrices de cette fraction : bactéries compétentes et le stade de croissance correspondant : stade de compétence. Dans nos conditions expérimentales la fraction de bactéries réceptrices compétentes est de l'ordre de 10 % (figure 8).

Les taux de transfert très bas que nous avons obtenus lors du croisement des bactéries réceptrices avec un surnombre de bactéries donatrices pouvaient être dûs au phénomène de zygose létale (171, 174). Nous avons donc cherché à caractériser ce phénomène dans nos conditions expérimentales.

3) Etude du phénomène de zygose létale pouvant modifier le sens de certains de nos résultats

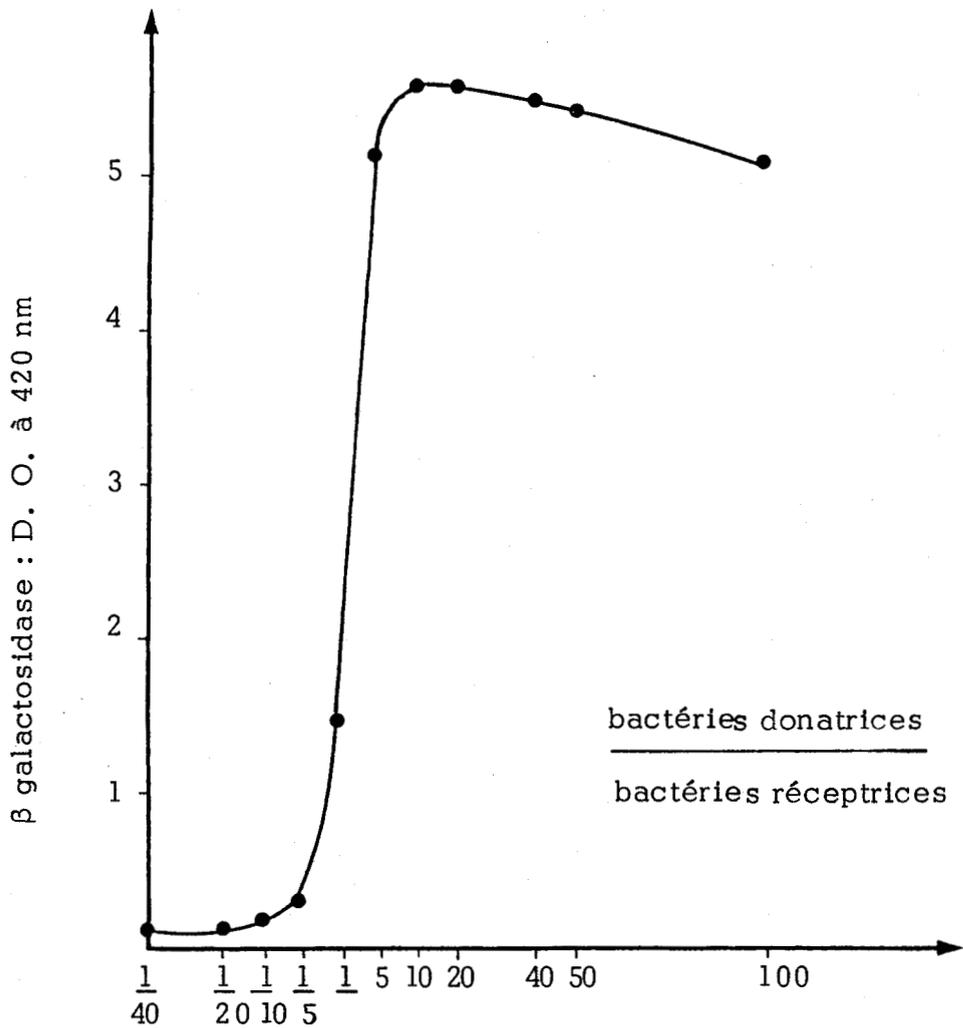
a) détermination de la période d'apparition de ce phénomène dans nos conditions expérimentales

Il a été décrit que le nombre de cellules F^- viables décroît quand elles sont croisées avec un excès de cellules Hfr (172) (74). L'apparition des recombinants est également diminuée. Ce phénomène qui dépend du contact des cellules a été appelé : zygose létale (5). Des variations physiologiques concomitantes sont observées, telles que l'inhibition de la synthèse de DNA, inhibition de l'induction de la β galactosidase, modification du transport des galactosides à travers la membrane (173).

Les faibles taux de transfert que nous avons obtenus dans les croisements où les bactéries donatrices étaient en excès par rapport aux bactéries réceptrices pouvaient être dûs à ce phénomène. Nous avons donc vérifié ce point.

Nous avons mis en évidence la zygose létale chez les bactéries réceptrices lac^+ croisées avec 30 fois plus de bactéries Hfr lac^- par

Figure 8 : Taux de transfert obtenus dans des croisements où le rapport bactéries donatrices/bactéries réceptrices varie



- croisement Hfr K 10 X MK 20 de 10 mn, poursuivi 10 min après addition de streptomycine avant d'être agité 3 mn au vortex
- le rapport $\frac{\text{bactéries donatrices}}{\text{bactéries réceptrices}}$ varie à chaque croisement
- le taux de transfert est mesuré par la quantité de β galactosidase produite dans le zygote et exprimée en densité optique à 420 nm par heure de dosage et par ml de tampon de dosage
- chaque point de la courbe correspond à la moyenne des résultats de trois croisements

la perte de capacité de synthétiser la β galactosidase après induction par l'I. P. T. G. Nous avons effectué des "pulses" d'induction de β galactosidase à des moments différents du croisement où la même quantité de bactéries réceptrices lac⁺ est mise en présence de 30 fois plus de bactéries réceptrices lac⁻.

Les taux de β galactosidase obtenus sont comparables jusqu'au temps 50 mn où la zygose létale apparaît chez les bactéries réceptrices croisées avec un excès de bactéries donatrices Hfr. (tableau 9).

La durée des croisements que nous avons effectués dans nos expériences entre bactéries réceptrices et un excès de bactéries donatrices (fig. 8 page) étant de 20 min, les résultats obtenus ne sont donc pas dus au phénomène de zygose létale.

b) tentative d'explication du phénomène de zygose létale chez les bactéries réceptrices conjugantes

Par la même occasion nous avons essayé d'analyser le phénomène de zygose létale. Gross (74), Skurray et Reeves (173) semblent en faveur d'une lyse par l'extérieur due aux appariements multiples de bactéries Hfr sur la même bactérie réceptrice.

Cette interprétation semble peu compatible avec notre hypothèse de stade de compétence qui implique qu'une fraction seulement de bactéries F⁻ peut conjuguer au moment du mélange avec des bactéries Hfr.

Nous avons donc cherché à savoir si le phénomène s'installe dès l'introduction des bactéries donatrices Hfr, ou après appariement progressif des bactéries donatrices en excès avec les bactéries réceptrices qui deviennent tour à tour compétentes. Ceci serait compatible avec le fait que nous n'observons le phénomène qu'à 50 min. De plus, nous avons voulu savoir si la zygose létale dépend strictement du nombre d'appariements ou de la quantité de DNA transféré en rapport avec le nombre d'appariements.

Nous avons effectué une cinétique d'addition de Streptomycine dans le croisement pour "fixer" à chaque temps un nombre déterminé

Tableau 9

Taux d'induction de β galactosidase chez une bactérie réceptrice croisée avec trente fois plus de bactéries Hfr

	Temps des Prélèvements			
	50 min	60 min	70 min	80 min
croisement ----- D. O. 420	196	171	149	125
témoin ----- D. O. 420	199	260	315	385

Les bactéries Hfr MK 5 ont été croisées avec les bactéries F⁻ MK 19 dans le rapport 30 Hfr/1 F⁻ en milieu Luria-"casaminoacids" 0,2%

Témoin : le mélange $\frac{30 \text{ F}^- \text{ MK 20}}{1 \text{ F}^- \text{ MK 19}}$

Des aliquots de 1ml ont été prélevés suivant les temps du tableau et induits 30 mn par 0,05 ml d'une solution d'IPTG 10^{-2} M.



de couples qui transfèrent une quantité croissante de DNA.

Dans un deuxième échantillon de croisement, nous avons interrompu aux mêmes temps le transfert de DNA par agitation au vortex, pour connaître l'effet du même nombre d'appariements sans le transfert d'une quantité importante de DNA.

Nous avons effectué des "pulses" d'induction de β galactosidase par l'I.P.T.G. en fonction du temps de conjugaison.

(A 10

On observe que le phénomène n'apparaît pas d'un bloc au temps zéro mais s'installe progressivement en fonction du nombre croissant de couples qui se forment.

Le phénomène semble dépendre beaucoup plus de la quantité de DNA transféré que strictement du nombre de couples. On voit en particulier, à 55 min, que la zygose létale existe pour le nombre de couples présents qui transfèrent le DNA. Par contre si pour le même nombre de couples à 55 min, on bloque le transfert du DNA, on constate que le taux d'induction de β galactosidase s'élève à nouveau ~~et~~ donc que la sygose létale ne s'installe pas.

Ceci montre bien que le phénomène de zygose létale dépend plus de la quantité de DNA transféré que strictement du nombre d'appariements et ne peut donc être interprété par un processus de lyse par l'extérieur semblable à celui observé avec une forte multiplicité de phages.

Ceci est en accord avec le fait observé par les mêmes auteurs (172) que des bactéries donatrices F^+ ou F' n'induisent pas dans les mêmes conditions de zygose létale chez les bactéries réceptrices alors que le nombre d'appariements est semblable à celui des bactéries Hfr.

Il est possible que la quantité de DNA transféré dans les bactéries réceptrices soit beaucoup trop grande pour le système de recombinaison. Ceci pourrait être en accord avec l'hypothèse d'un système de recombinaison inductible. L'accroissement de la quantité de DNA transféré serait beaucoup plus rapide que la vitesse d'induction

Tableau 10

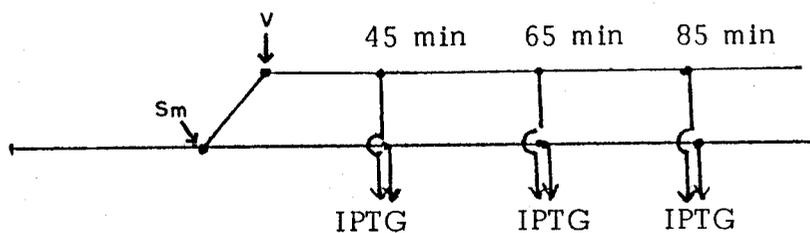
Taux d'induction de β galactosidase chez une bactéries réceptrice croisée avec trente fois plus de bactéries Hfr : effets d'une cinétique d'addition de streptomycine et de séparation des couples

	Temps des Prélèvements		
	45 min	65 min	85 min
	D. O. 420	D. O. 420	D. O. 420
X^t sans Sm	204	160	116
Témoin	184	290	411
X^t Sm 15	242	464	551
X^t Sm 15 V 15	255	388	586
X^t Sm 35	216	211	238
X^t Sm 35 V 35	232	234	328
X^t Sm 55		192	128
X^t Sm 55 V 55		188	242

Le protocole de base est celui décrit au tableau 9.

L'addition de streptomycine (X^t Sm) et l'interruption des croisements (V) ont été effectués suivant les temps du tableau. Les échantillons ainsi traités ont été laissés en incubation à 37°C.

Des aliquots ont été prélevés à 45, 65 et 85 mn et induits 30 min par l'IPTG.



du système de recombinaison. L'existence prolongée des extrémités libres de DNA non recombinaison entrainerait à la longue la mort de la cellule.

4) Les bactéries réceptrices d'une population en phase exponentielle de croissance passent tour à tour par le stade de compétence

Les bactéries réceptrices compétentes au moment où on les mélange avec les bactéries donatrices devraient s'apparier immédiatement. Au cours du temps, les bactéries donatrices restées libres devraient s'apparier progressivement aux bactéries réceptrices qui passent tour à tour par le stade de compétence.

a) expérience

Nous avons étudié l'évolution du nombre de couples conjuguants en fonction du temps dans un croisement de rapports mâle/femelle = $\frac{1}{1}$.

La formation progressive des couples conjuguants a été suivie par une cinétique d'addition de la streptomycine qui stoppe la formation ultérieure des couples sans toucher aux couples présents.

On observe bien dans ces conditions que les transferts du gène lactose croissent en fonction du temps.

(11)

b) interprétation

Dans une population bactérienne, les différentes bactéries réceptrices en croissance passent tour à tour par le stade de compétence ce qui explique qu'à tout instant il existe le même pourcentage de bactéries compétentes pour la conjugaison.

Ceci implique qu'une bactérie réceptrice qui vient de conjuguer ne peut plus reconjuguier immédiatement une deuxième fois. Ceci va être vérifié dans l'expérience qui suit.

5) Capacité de conjugaison des bactéries réceptrices issues d'un croisement

a) un zygote ne sert plus immédiatement de bactérie réceptrice

Deux croisements ont été effectués (12)

Tableau 11

Passage des bactéries réceptrices par
un stade de compétence

Minutes auxquelles la streptomycine a été ajoutée	β galactosidase produite
7	5,04
15	6,12
25	8,88
35	13,20

A 5 échantillons du croisement 1 Hfr H X 1 MK 20
on a ajouté de la streptomycine à différents temps
pour "fixer" le nombre de couples présents.

Le taux de transfert a été mesuré par la quantité de
 β galactosidase produite lors d'un croisement de 60 mn.



* premier croisement

L'allele sauvage du gène lactose est transféré dans une bactérie réceptrice possédant une délétion de la région correspondante. Des zygotes lac⁺ sont obtenus.

* deuxième croisement

C'est l'allele muté du gène lactose qui est transféré. Aucun zygote lac⁺ n'est obtenu

Les couples sont ensuite séparés mécaniquement dans les deux croisements avant l'addition d'une bactérie donatrice Hfr K 10 qui injecte l'allele sauvage du gène lactose en tête du chromosome.

(t 12

L'analyse des résultats montre que la deuxième bactérie donatrice ne conjugue pas avec les zygotes formés au cours du 1er croisement mais seulement avec les bactéries réceptrices qui n'avaient pas conjugué la première fois. En effet, l'augmentation ^{du nombre} de recombinants lac⁺ obtenus dans le premier croisement correspond approximativement au nombre de recombinants lac⁺ obtenus dans le deuxième croisement.

De plus la fréquence de recombinaison obtenue dans le 2ème croisement, après introduction de la bactérie Hfr K 10, est la moitié de celle obtenue dans le croisement témoin.

Ce résultat peut signifier que la bactérie Hfr K 10 a 2 fois moins de chance de pouvoir croiser avec les zygotes et bactéries réceptrices du 2ème croisement qu'avec des bactéries réceptrices qui n'ont pas conjugué.

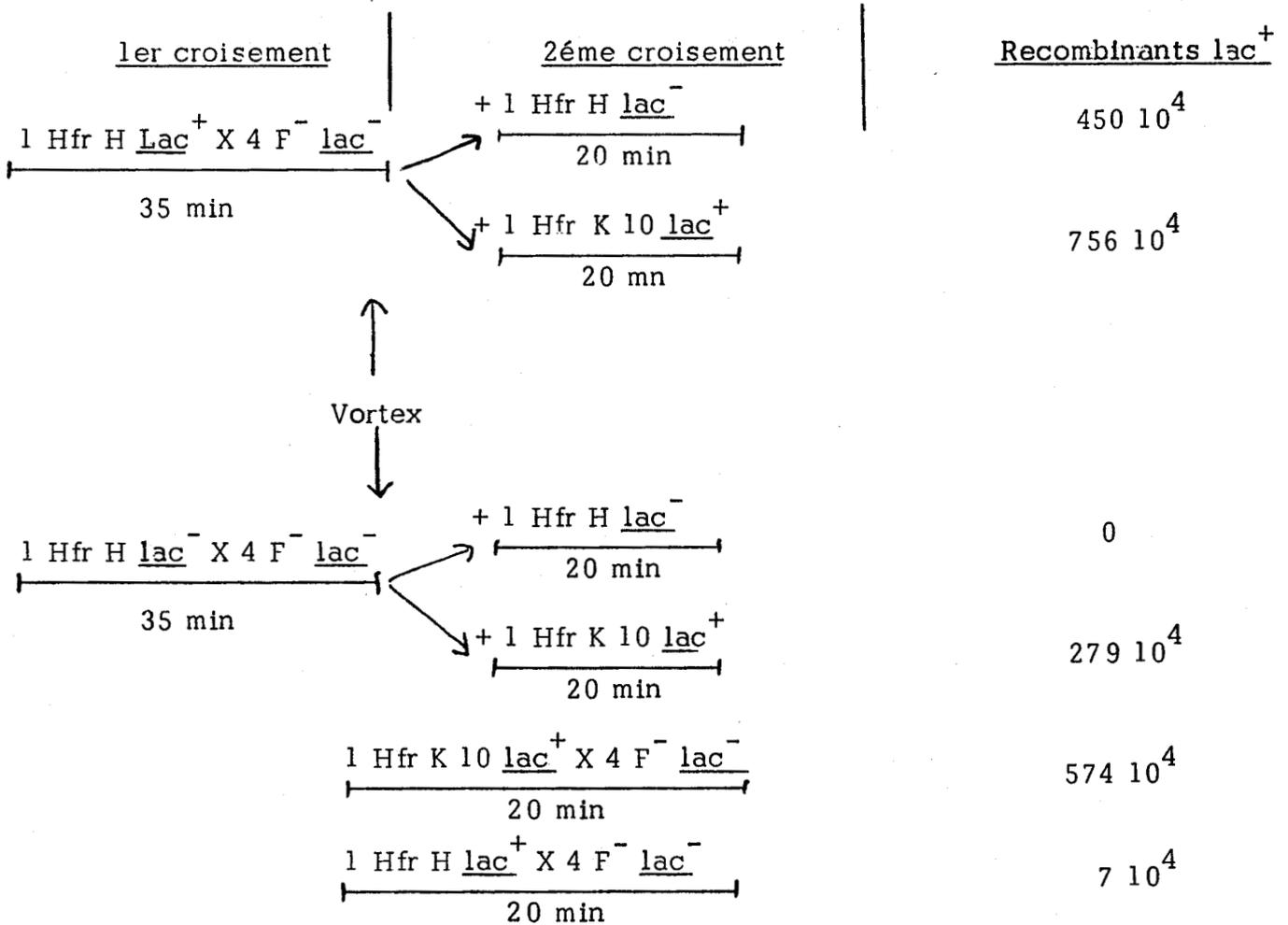
Les zygotes ne semblent donc pas servir de bactéries réceptrices lors d'un nouveau croisement. Passé le stade de croissance où elle est compétente la bactérie réceptrice n'est plus compétente pour la conjugaison.

Nous allons préciser cette notion par les expériences qui suivent.

b) analyse génétique des recombinants obtenus lors de deux conjugaisons successives

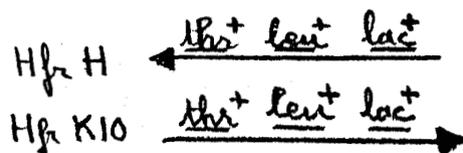
Tableau 12

Un zygote ne peut plus servir immédiatement de bactérie réceptrice



A 35 mn on a séparé les couples des 2 croisements
Hfr H X MK 20 et MK 5 X MK 20 par agitation de 3 min au vortex.

A 2 échantillons de chaque croisement, on a ensuite ajouté respectivement les bactéries Hfr MK 5, et Hfr K 10 et laissé incubé 20 mn avant de titrer les recombinauts lac⁺ formés.



* Expérience préliminaire

Si l'on sépare des couples conjugants après le transfert des gènes thréonine et leucine à une bactérie possédant les alleles négatifs et qu'on laisse la suspension bactérienne en incubation, on observe une nouvelle cinétique d'apparition des recombinants thr^+ , leu^+ qui se surajoute à la cinétique obtenue avant l'interruption du croisement.

(f 9

Il est possible que le double transfert d'un gène donné dans la même bactérie réceptrice double l'efficacité de recombinaison de ce gène.

En dehors de cette possibilité on peut penser que les bactéries donatrices séparées ne transfèrent le DNA qu'aux bactéries réceptrices qui n'avaient pas conjugué la première fois et qui sont devenues compétentes.

* Interprétation des résultats par analyse génétique des recombinants obtenus

Pour éliminer la possibilité évoquée plus haut d'une augmentation du taux de recombinaison due à un double transfert, nous avons refait l'expérience en suivant l'entrée successive de deux marqueurs génétiques thréonine-leucine et lactose séparés par 9 min sur la carte génétique d'E. coli K 12.

La séparation des couples a été provoquée après le transfert des gènes thréonine-leucine et avant la pénétration du gène lactose.

Les résultats sont comparés à ceux d'un croisement non interrompu.

(t 13

On observe après interruption du croisement :

- une cinétique normale d'apparition des recombinants lac^+ qui indique une deuxième conjugaison
- une augmentation du taux des recombinants thr^+ leu^+ qui semble

correspondre à une nouvelle cinétique d'apparition des recombinants $\underline{thr}^+ \underline{leu}^+$ s'ajoutant aux 7,9% formés avant l'interruption du croisement. On retrouve en effet par l'analyse génétique des recombinants $\underline{thr}^+ \underline{leu}^+$ présents au temps 80 mn, que 8% sont restés \underline{lac}^- . Ceci exclut une augmentation de recombinaison due au double transfert des gènes $\underline{thr}^+ \underline{leu}^+$ à la même bactérie réceptrice puisque dans ce cas, les 7,9% de recombinants $\underline{thr}^+ \underline{leu}^+$ formés avant l'interruption du croisement seraient devenus \underline{lac}^+ lors du 2ème croisement.

Il apparaît donc qu'une bactérie réceptrice compétente lors d'une première conjugaison ne l'est plus pour une nouvelle conjugaison et ne conjugue jamais immédiatement une deuxième fois. Les bactéries donatrices ne peuvent donc reconjuguer qu'avec de nouvelles bactéries réceptrices devenues compétentes. Ceci est donc bien en faveur d'une période de compétence bien délimitée dans le cycle cellulaire.

6) Division synchronisée des zygotes qui proviennent de bactéries réceptrices ayant conjugué avec des bactéries donatrices (111)

Si le stade de compétence se situe à une période bien définie du cycle cellulaire, les zygotes résultant de bactéries réceptrices conjugantes doivent tous être dans le même état de croissance et donc se diviser de façon synchronisée.

a) croissance synchronisée des sexductants issus de croisements entre bactéries réceptrices et bactéries donatrices F- \underline{lac}^+

Les premières expériences ont été réalisées avec des bactéries donatrices F- \underline{lac}^+ qui injectent le gène lactose à très haute fréquence. La croissance des sexductants formés est ensuite suivie après séparation des couples conjugants en présence de streptomycine qui tue les bactéries donatrices F- \underline{lac}^+ les empêchant de réinjecter leur DNA et dilution de la suspension bactérienne qui diminue fortement le transfert épidémique du F- \underline{lac}^+ .

- protocole

Les bactéries 200 PS F- \underline{lac}^+ et MK 20 sont croisées 10 mn dans le rapport 1 bactérie donatrice pour 4 bactéries réceptrices.

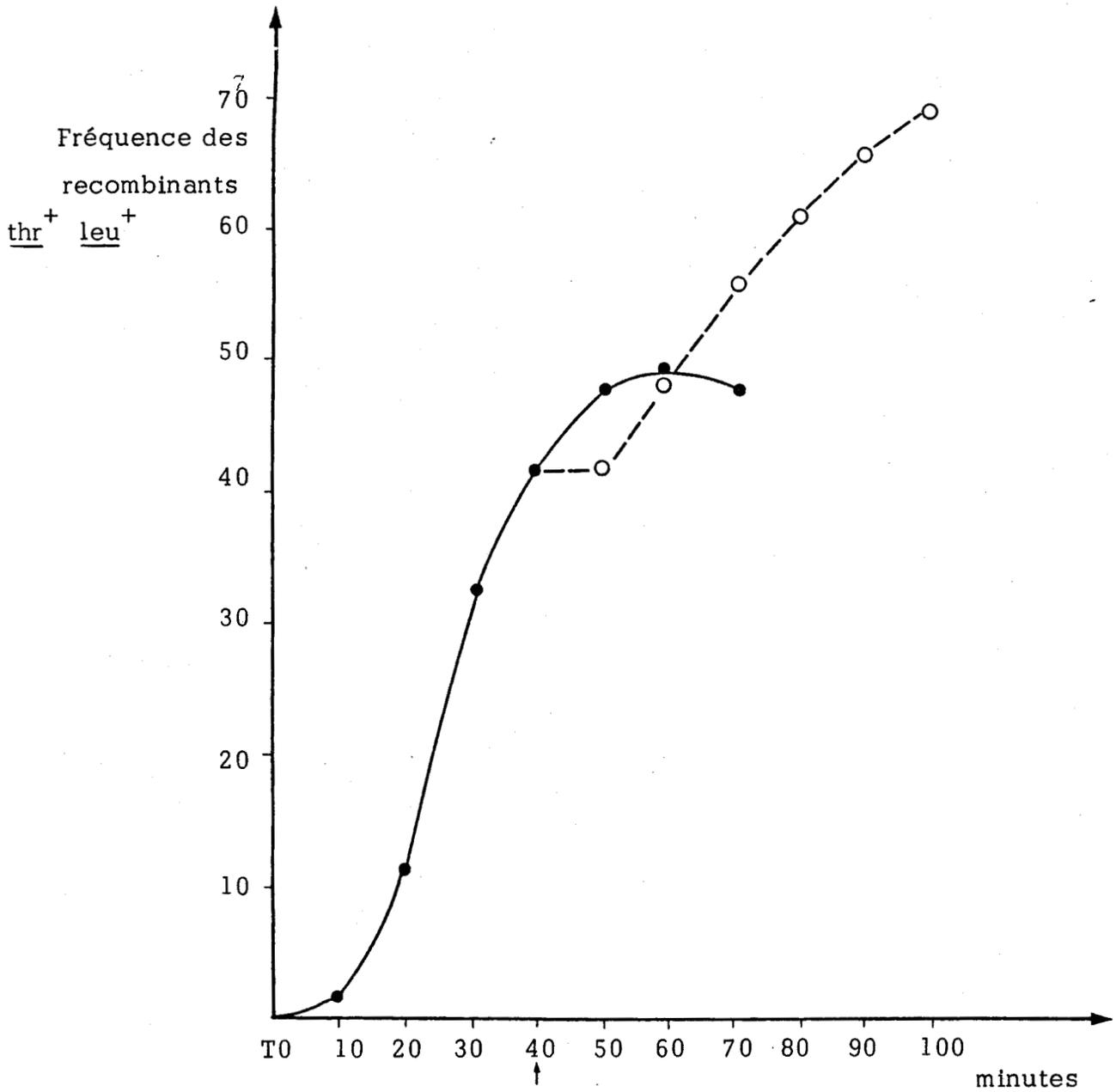


Figure 9 : Cinétique d'apparition des recombinants $\text{thr}^+ \text{leu}^+$ après interruption de la conjugaison

—●— cinétique d'apparition des recombinants $\text{thr}^+ \text{leu}^+$ dans le croisement 1 Hfr H X 4 F⁻ MK 20

--○-- cinétique d'apparition des recombinants $\text{thr}^+ \text{leu}^+$ dans le même croisement agité 3 min au vortex à 40 min et laissé incubé à 37°C



Analyse génétique des recombinants obtenus lors de 2 conjugaisons successives

Temps en min	Fréquence de Recombinaison (%)							
	Croisement agité au vortex à 80 mn				Croisement agité au vortex à 20 mn puis à 80 mn			
	thr ⁺ leu ⁺	lac ⁺	% thr ⁺ leu ⁺ restés lac ⁻	doubles recombinants	thr ⁺ leu ⁺	lac ⁺	% thr ⁺ leu ⁺ restés lac ⁻	doubles recombinants
20	8,2	0,06	99	0,07	7,9	0,05	99	0,05
40	42	8	86	5,9	17,2	0,08	99	0,06
60	49,5	12,1	77	11,1	56	8,7	88	6,6
80	48	11,8	78	10,5	73	12	86	10,3

- un échantillon du croisement Hfr H X MK 20 a été laissé incubé 80 mn. L'autre échantillon a été agité pendant 3 mn au vortex à 20 mn, avant le passage des gènes lac⁺ et laissé incubé jusque 80 mn. La fréquence de recombinaison des gènes thr⁺ leu⁺ et lac⁺ a été mesurée en fonction du temps.

- Après 48 heures, on a déterminé la présence du caractère lac⁺ chez les recombinants thr⁺ leu⁺ obtenus.



Le croisement est ensuite exposé 5 min à la streptomycine avant d'être agité 3 min au vortex, dilué au 1/6ème et incubé à 37°C au bain-marie fortement agité qui représente le temps zéro de la cinétique de croissance des sexductants lac⁺ formés.

- Résultats -

Les bactéries réceptrices qui conjuguent avec les bactéries donatrices F-lac⁺ sont toutes au même stade de croissance puisque les sexductants lac⁺ qui en dérivent se divisent de façon synchronisée. Les bactéries réceptrices qui n'ont pas conjugué, gardent leur mode de croissance exponentielle. (figure 10).

b) Mesure du transfert épidémique du F-lac⁺ dans nos conditions expérimentales.

Nous avons vérifié que les transferts secondaires du F-lac⁺ par les sexductants formés restent à un taux faible et ne peuvent donc pas être à l'origine des doublements du nombre de sexductants observés sur la courbe.

Le transfert épidémique a été mesuré par le transfert du F-lac⁺ des sexductants formés à des bactéries réceptrices ABF 2, ajoutées après la séparation des couples du premier croisement en présence de streptomycine. La suspension bactérienne est ensuite diluée au 1/6ème et agitée au bain-marie à 37°C. Nous avons doublé le nombre des sexductants lac⁺ issus de la bactérie réceptrice ABF 2 pour tenir compte des croisements de la bactérie réceptrice MK 20 avec les sexductants lac⁺.

1.10^5 sexductants lac⁺ issus des bactéries réceptrices ABF 2 ont été dénombrés à 40 min. Ceci donne une estimation de 2×1.10^5 transferts secondaires des F-lac⁺ pour l'ensemble de la population ; 2×4.10^5 à 60 min et $2 \times 5.5.10^6$ à 120 min ce qui est nettement inférieur aux nombre de sexductants formés lors du croisement de 15 min.

Au niveau de 10^5 bactéries par ml on ne trouve pas de sexductants lac⁺ provenant du croisement de la bactérie réceptrice ABF 2 avec la bactérie donatrice 200 PS F-lac⁺ tuée par la streptomycine.

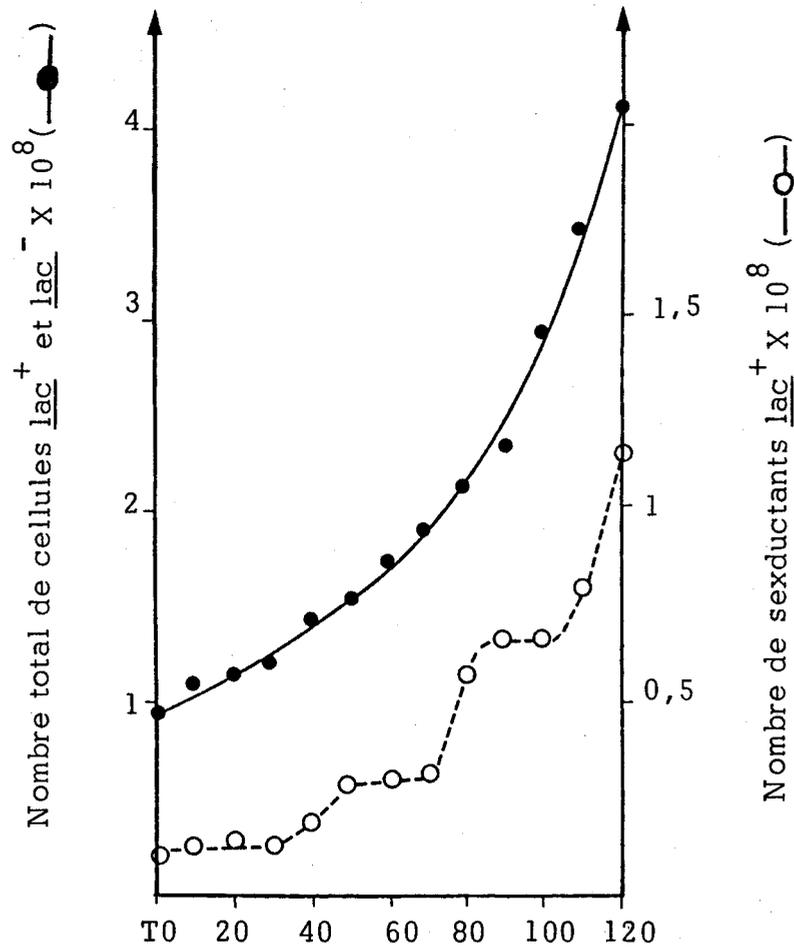


Figure 10 : Croissance synchronisée des sexductants provenant des bactéries réceptrices ayant conjugué avec des bactéries donatrices F- lac^+

Croisement (1) 200 PS F- lac^+ X (4) F $^-$ MK 20 de 10 min, poursuivi 5 min après addition de streptomycine avant d'être soumis 3 min à l'agitation mécanique puis dilué au 1/6ème et fortement agité au bain marie à 37°C au temps zéro de l'expérience.

Des aliquots de 0,5 ml ont été prélevés toutes les 10 min, dilués et étalés à raison de 1 ml sur plusieurs boîtes de Chapman T.T.C lactosé à 2%.

Les colonies lac^+ et lac^- ont été dénombrés sur la même boîte.

c) croissance synchronisée des sexductants issus de croisements entre bactéries réceptrices et bactéries donatrices F-gal⁺

Des résultats identiques sont obtenus avec une bactérie donatrice F-gal⁺ possédant un épisome d'origine différente. La culture des bactéries et les croisements ont été effectués dans cette expérience en milieu riche de Luria en présence de glucose 1% et de "casaminoacids" 0,2%.

(f 11

Les résultats obtenus sont reproductibles et indépendants des bactéries donatrices F' et réceptrices utilisées. Les paliers de division des courbes de croissance synchronisée des sexductants formés, correspondent bien aux temps de génération des bactéries réceptrices.

Le temps de génération en milieu de Lennox de la bactérie réceptrice croisée avec la bactérie donatrice F-lac⁺ est de 50 mn. Le premier palier de division de la courbe de croissance synchronisée des sexductants lac⁺ est situé à 50 mn. Le temps de génération en milieu riche de Luria de la bactérie réceptrice croisée avec la bactérie donatrice F-gal⁺ est de 50 mn. Le premier palier de division de la courbe de croissance synchronisée des sexductants gal⁺ est situé à 45 mn.

d) croissance synchronisée des zygotes provenant des bactéries réceptrices ayant conjugué avec les bactéries donatrices Hfr.

Des résultats analogues sont obtenus avec des bactéries donatrices Hfr. La croissance des zygotes lac⁺ formés est suivie après séparation des couples conjugants en présence de streptomycine.

(f 12 et 13

La reproductibilité n'est pas aussi parfaite. Les fluctuations peuvent être dues au transfert plus étalé dans le temps du gène lactose comparé au transfert pratiquement instantané du même gène par les cellules F-lac⁺.

Les phénomènes de recombinaison qui existent dans ce cas peuvent également influencer sur la reprise de croissance autonome des zygotes

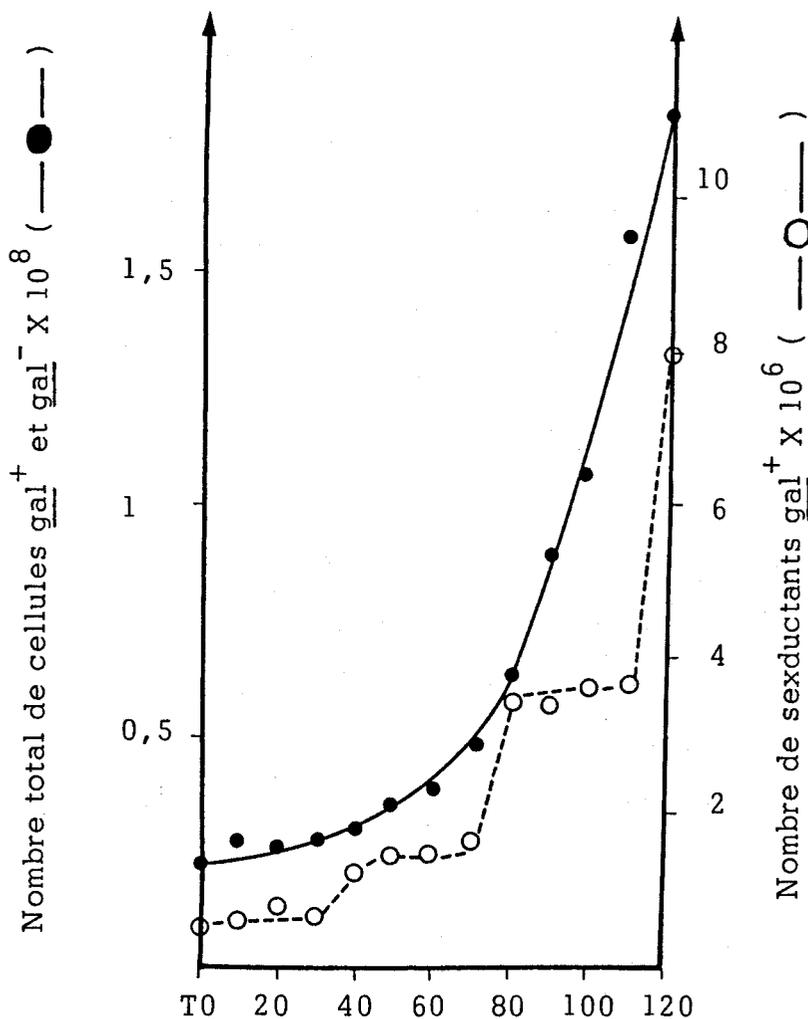


Figure 11 : Croissance synchronisée des sexductants provenant des bactéries réceptrices ayant conjugué avec des bactéries donatrices F-gal⁺

Croisement W 3101 F-gal⁺ PA 200 effectué suivant le protocole de la figure 10

La culture des bactéries et les croisements ont été effectués dans le milieu complexe de Luria en présence de glucose 1% et de "casaminoacids" 0,2%

Les boîtes de Chapman TTC contiennent du galactose à 2%.

Croissance synchronisée des zygotes provenant des bactéries réceptrices
ayant conjugué avec des bactéries donatrices Hfr

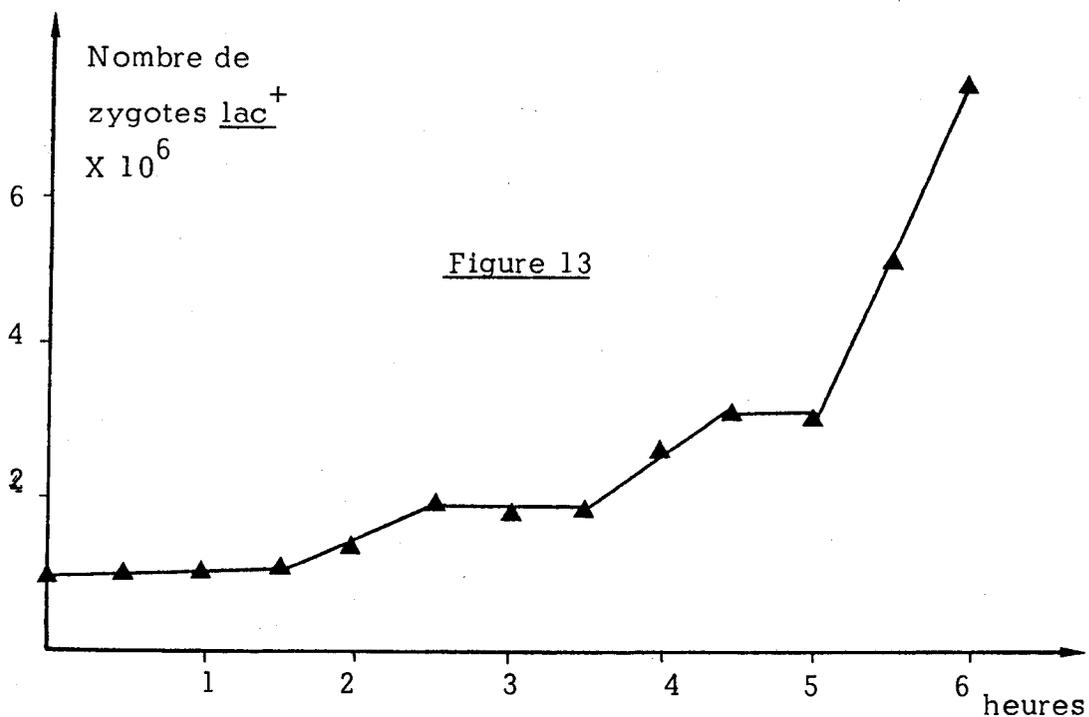
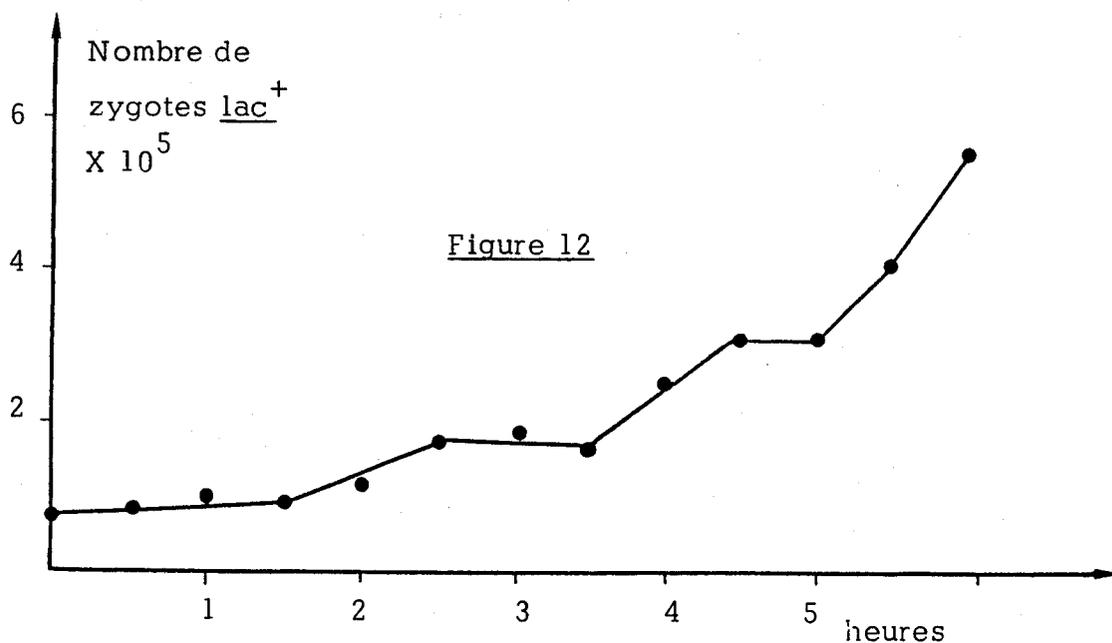


Figure 12 Croisement Hfr K 10 X MK 20 de 10 mn, poursuivi 5 mn après addition de streptomycine avant d'être agité mécaniquement pendant 3 mn puis dilué au 1/4 qui est le temps zéro de l'expérience et laissé incubé fortement agité à 37°C

Figure 13 Croisement Hfr H X MK 20 de 10 mn, poursuivi 25 mn après addition de streptomycine et traité comme le croisement ci-dessus

Les prélèvements sont effectués toutes les 30 mn. Le reste du protocole est identique à celui de la figure : 10

formés.

Le phénomène de croissance synchronisée des zygotes formés reste vrai quels que soient l'origine et le sens d'injection des bactéries donatrices Hfr croisées avec les bactéries réceptrices.

(f 12 et 13

e) comparaison des modes de croissance synchronisée des sexductants et zygotes issus de la même bactérie réceptrice croisée avec des bactéries donatrices F'ou Hfr

La première division du sexductant formé survient après un temps de latence correspondant au temps de réplication.

Ceci peut indiquer que les bactéries réceptrices qui conjuguent sont au stade zéro de la réplication végétative. L'état de compétence des bactéries réceptrices pourrait donc être lié au stade zéro de la réplication végétative.

La première division du zygote formé survient par contre 60 mn plus tard que celle du sexductant. Cet accroissement de durée du palier sans division peut correspondre à l'achèvement des phénomènes d'intégration du DNA transféré. C'est ce que nous avons essayé de montrer dans l'expérience qui suit.

f) détermination de la période de recombinaison génétique à l'aide des propriétés de sensibilisation à la radiation 313 nm du 5-bromo 2' desoxyuridine (BUdR)

- Expérience

Nous avons étudié la durée du phénomène d'intégration du DNA transféré en utilisant les propriétés de sensibilisation à la radiation 313 nm du BUdR selon la technique décrite au chapitre précédent.

Nous avons croisé une bactérie donatrice Hfr dont le DNA a été préalablement répliqué en présence de BUdR avec une bactérie réceptrice résistante au BUdR.

La bactérie réceptrice reçoit lors de la conjugaison un brin de DNA-BUdR qu'elle réplique avec des précurseurs thymine.

Des aliquots sont prélevés à différents moments du croisement et irradiés à la radiation 313 nm.

* Interprétation des résultats

On peut considérer que l'intégration de l'allèle répliqué en thymine donne un DNA recombiné insensible à la radiation 313 nm et donc des recombinants viables après irradiation.

La courbe de désensibilisation des recombinants obtenus sera le reflet de l'intégration du gène correspondant transféré.

On suit de cette façon l'intégration des marqueurs génétiques précoces thréonine-leucine et tardifs arginine.

(f 14

On voit que la désensibilisation est progressive en fonction du temps et qu'après 60 min, l'intégration des gènes transférés précocement est achevée. On remarque à la même période, que les gènes transférés tardivement ne sont pas encore intégrés puisqu'ils restent sensibles à la radiation 313 nm.

(f 14

Comme l'on suit l'intégration de tous les gènes thréonine-leucine transférés on peut dire que le phénomène global de recombinaison dure environ 60 min.

Il faut signaler cependant, que si l'on interrompt le croisement, la recombinaison des gènes semblent se faire plus rapidement.

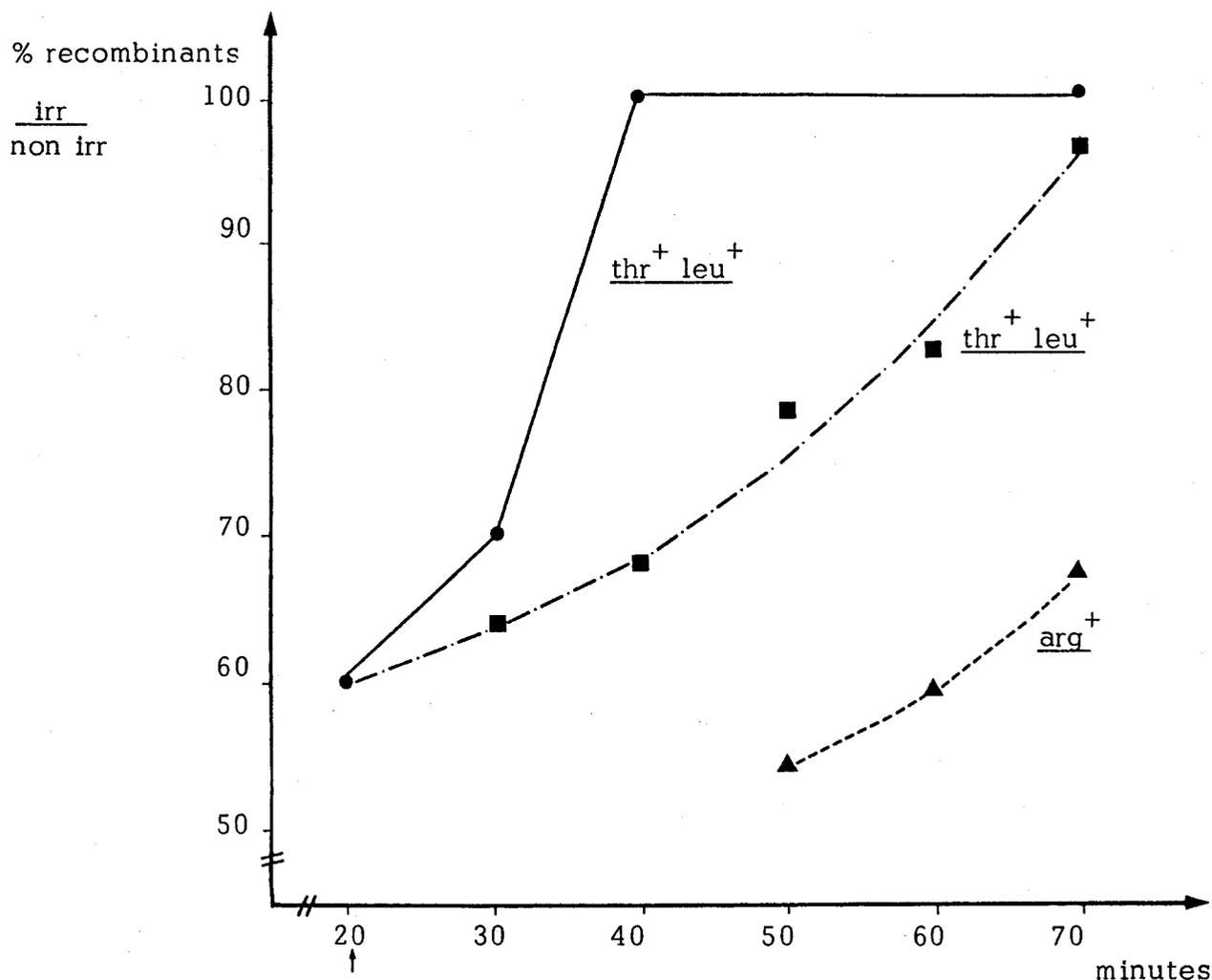
(f 14

On peut supposer que l'intégration du DNA est impossible tant que le transfert à la bactérie réceptrice n'est pas terminé. On peut ainsi interpréter la recombinaison que l'on observe pendant le déroulement du transfert de DNA, comme celle qui se produit chez les bactéries réceptrices séparées prématurément des bactéries donatrices.

* la recombinaison est-elle inductible ?

On peut supposer également que la séparation des couples

Figure 14 : Durée des phénomènes de recombinaison qui se déroulent chez les zygotes



Les bactéries Hfr MK 1 ont été cultivées pendant 2 H en milieu Lennox complet contenant 2 $\mu\text{g/ml}$ de BudR, changées de milieu par filtration et croisées avec les bactéries réceptrices MK 14 dans le milieu de Lennox complet contenant 2 $\mu\text{g/ml}$ de thymine.

Des aliquots du croisement ont été prélevés aux temps indiqués en abscisse et irradiés à 313 nm. Le % de recombinants $\text{thr}^+ \text{leu}^+$ (—■—) et arg^+ (—▲—) de l'aliquot irradié par rapport à l'aliquot non irradié a été indiqué en ordonnée.

Même expérience avec un échantillon du croisement agité mécaniquement pendant 3 mn après 20 mn de croisement. Recombinants $\text{thr}^+ \text{leu}^+$ (—●—).

peut être considéré pour la bactérie réceptrice comme un signal de recombinaison.

Les extrémités libres de DNA qui apparaissent après séparation des couples pourraient servir de signal ou d'effecteur de signal de recombinaison.

Cette idée est à rapprocher d'une étude en cours qui a mis en évidence l'induction d'un système de réparation du DNA pendant la conjugaison chez E. coli K 12.

Bien que les résultats soient préliminaires, ils montrent que le système de réparation est également induit dans les bactéries donatrices et réceptrices, au moment de la rupture des couples conjugants. L'observation dans ces conditions d'une induction du prophage lambda qui est dépendante du gène rec A⁺ et de l'allèle ind⁺ du gène cI de lambda, fait penser qu'il s'agit du système S. O. S. décrit par Devoret, George, Radman et Witkin (50) (69) (152) (196).

Le système de recombinaison et le système de réparation étant tous deux dépendants du gène rec A⁺ il est possible que le système de recombinaison soit inductible dans les mêmes conditions que le système S. O. S.

La formation transitoire des extrémités libres de DNA transféré dans le zygote servirait de signal d'induction de la protéine rec A qui interviendrait ensuite dans les deux systèmes.

7) Conclusion

Nous avons montré que dans une population exponentielle de croissance seul un pourcentage constant de bactéries réceptrices peut conjuguer à tout instant.

Les bactéries réceptrices de cette population en croissance passent tour à tour par un stade de compétence au cours de leur cycle cellulaire.

Il apparaît donc que la bactérie réceptrice devient compétente à un stade bien déterminé de sa croissance. Passé ce stade, la bactérie

réceptrice n'est plus compétente pour la conjugaison, et ne peut donc jamais conjuguer immédiatement une deuxième fois.

Le fait que les bactéries réceptrices qui conjuguent donnent naissance à des zygotes qui se divisent de façon synchronisée alors que celles qui n'ont pas conjugué gardent le mode de croissance exponentielle confirme que l'état de compétence apparaît à un moment bien déterminé du cycle cellulaire de la bactérie réceptrice.

L'analyse du profil des courbes de synchronisation montre que dans le cas des sexductants, la durée du premier palier correspond au temps de réplication de la bactérie réceptrice.

Si l'on explique dans le cas des zygotes l'accroissement du palier par la durée des phénomènes de recombinaison qui se manifestent pendant cette période, on peut supposer que dans les deux cas les bactéries réceptrices qui conjuguent sont celles qui se trouvent au stade zéro de la réplication.

Chez les sexductants la réplication ne semble commencer qu'après la séparation des couples conjugants. Chez les zygotes, elle ne semble se produire qu'après les phénomènes de recombinaison. Il est donc possible que pendant le déroulement du transfert de DNA, la réplication de la bactérie réceptrice reste au stade zéro et qu'elle ne démarre qu'après la terminaison de la conjugaison.

Il semble donc que l'état de compétence des bactéries réceptrices ne se développe qu'une fois par cycle cellulaire entre la terminaison et le commencement d'un cycle de réplication végétative et que la réplication reste bloquée au stade zéro tant que le transfert n'est pas terminé.

Nous allons préciser dans les expériences qui suivent la période du cycle cellulaire des bactéries réceptrices où apparaît l'état de compétence à la conjugaison en croisant des bactéries donatrices avec des bactéries réceptrices chez lesquelles la réplication a été synchronisée.

II - Détermination de la période du cycle cellulaire où apparaît l'état de compétence des bactéries réceptrices

1) Introduction

Nous avons vu que dans une population bactérienne en phase exponentielle de croissance, le pourcentage de bactéries compétentes est constant en fonction du temps.

Les croisements de bactéries donatrices avec des bactéries réceptrices en phase exponentielle de croissance prélevées à différents moments de leur culture devraient donner des taux de transfert de DNA et de recombinaison constants.

Le stade de compétence étant bien défini dans le cycle cellulaire, les bactéries réceptrices d'une population synchronisée devraient toutes passer en même temps par ce stade. Le pourcentage de bactéries compétentes deviendrait maximum à ce moment là et théoriquement égal à cent pour cent. On devrait donc observer le passage par un maximum du taux de transfert et de recombinaison mesuré dans des croisements entre bactéries donatrices et bactéries réceptrices synchronisées à différents stades de leur croissance.

Nous allons donc essayer de montrer que le taux de transfert et de recombinaison passe par un maximum lorsque les bactéries réceptrices synchronisées sont croisées à différents stades de leur croissance avec des bactéries donatrices alors qu'il reste constant dans le cas de bactéries réceptrices non synchronisées.

La position du maximum par rapport au stade de croissance des bactéries réceptrices synchronisées déterminera exactement la période du cycle cellulaire où apparaît l'état de compétence.

2) Détermination du taux de transfert obtenu avec des bactéries réceptrices synchronisées par le chloramphénicol et croisées à différents moments de leur croissance avec des bactéries donatrices

Les bactéries réceptrices ont été traitées par le chloramphénicol selon la technique proposée au chapitre précédent. La répllication étant préférentiellement synchronisée dans ces conditions, la courbe de croissance obtenue après élimination de l'antibiotique, n'a pas le profil théorique

des courbes de synchronisation.

On observe cependant deux divisions successives : l'une au démarrage de la croissance, l'autre à 60 min.

(§ 15

A différents stades de leur croissance, des bactéries réceptrices synchronisées ont été croisées pendant des durées constantes avec des bactéries donatrices.

Le transfert de DNA a été mesuré par l'induction constitutive du gène lac^+ ^{l'induction} zygotique du prophage λ et le taux de recombinaison.

On observe de façon régulière deux maxima du taux de transfert situés au niveau des périodes de division.

(§ 15 et § 16

Ceci reste vrai, quels que soient l'origine et le sens d'injection du chromosome de la bactérie Hfr utilisée. Le processus de transfert ne semble donc pas requérir d'homologie entre la partie proximale transférée et la région correspondante du chromosome qui selon Curtiss (44) se répliquerait dans la bactérie réceptrice pour tracter le DNA transféré.

Il faut signaler que l'on obtient parfois une courbe de croissance qui débute par un palier, la première division se situant alors à 40 min.

(§ 17

Il semble probable que les bactéries ont commencé leur cycle de croissance pendant la période de filtration, ce qui ne permet plus d'observer la première division et avance la seconde.

Dans ce cas, un seul maximum du taux de transfert est observé au niveau de la période de division de la bactérie réceptrice située à 40 mn.

(§ 17

Ces expériences confirment que le stade de compétence se situe bien dans la période qui s'étend entre la fin de répllication et l'initiation d'un nouveau cycle de répllication.

Il est possible que la pénétration du brin de DNA transféré ne puisse se faire que dans une bactérie réceptrice se trouvant dans la période sans répllication et que ce brin de DNA soit ensuite répliqué en même

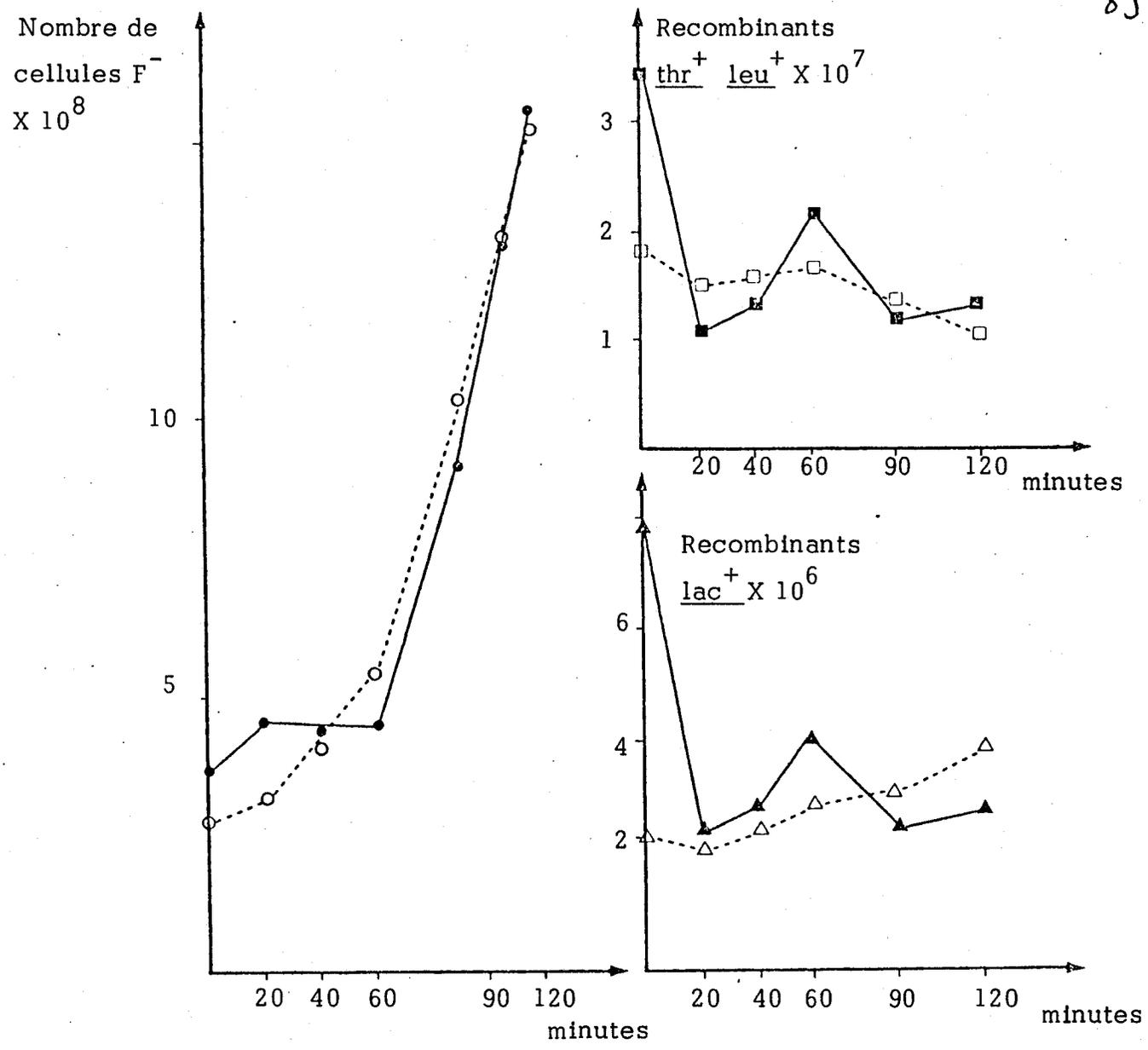


Figure 15 : Taux de recombinaison chez les bactéries réceptrices synchronisées et croisées à différents stades de leur croissance avec des bactéries Hfr.

Des bactéries MK 20, chez lesquelles la réplication a été synchronisée sous l'action du chloramphénicol, ont été dénombrées et croisées pendant 25 min avec des bactéries Hfr aux temps indiqués en abscisse. 250 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine ont été ajoutés à 10 min du début du croisement.

- courbe de croissance des bactéries MK 20 traitées par le chloramphénicol.
- recombinants $thr^+ leu^+$; croisement 1 Hfr H x 2 MK 20.
- ▲— recombinants lac^+ ; croisement 1 Hfr K 10 x 2 MK 20.

Expérience réalisée avec des bactéries MK 20 non traitées par le chloramphénicol

- courbe de croissance des bactéries MK 20 non traitées.
- recombinants $thr^+ leu^+$; croisement 1 Hfr H x 1 MK 20.
- △— recombinants lac^+ ; croisement 1 Hfr K 10 x 1 MK 20



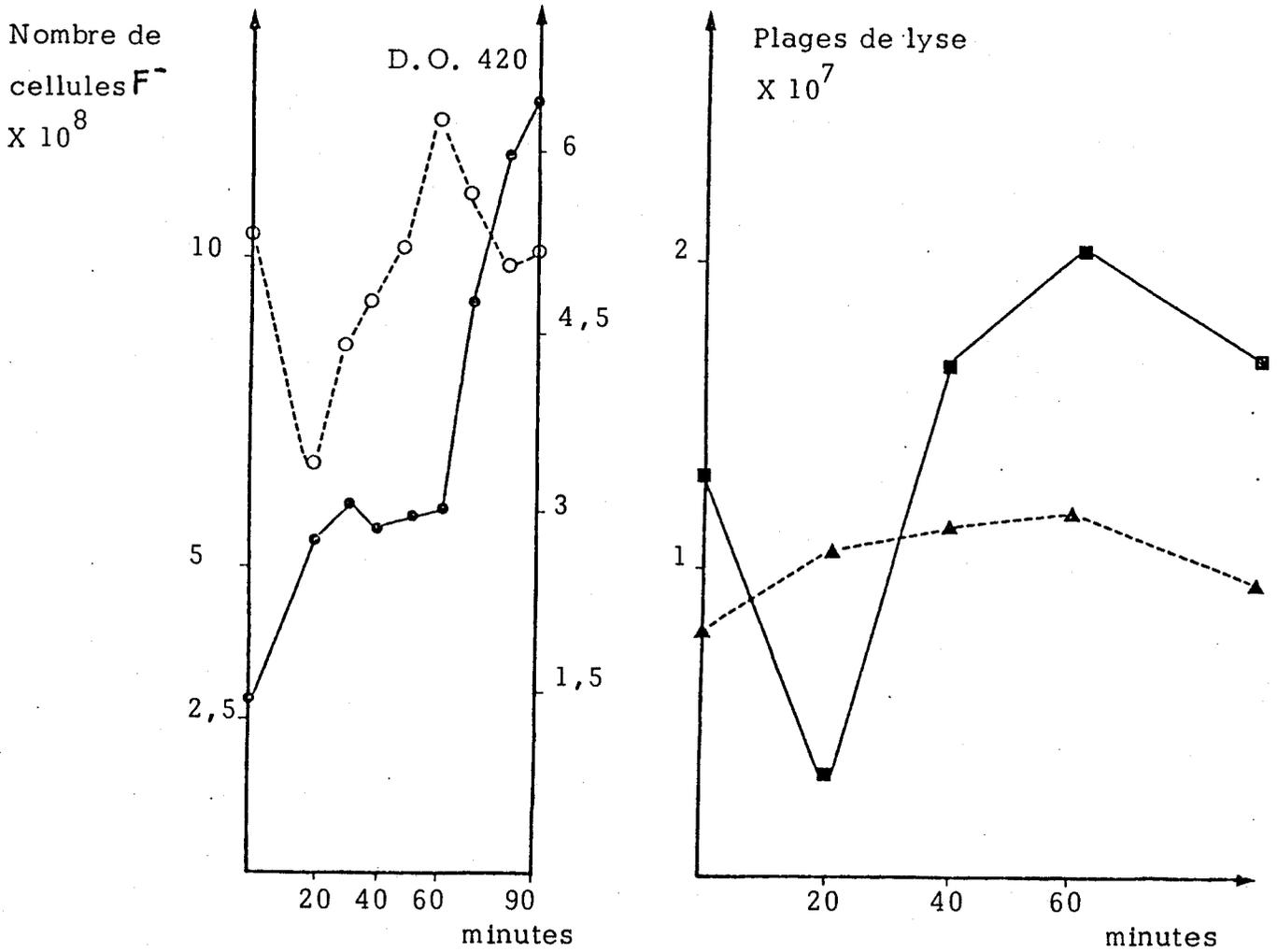


Figure 16 : Taux de transfert chez les bactéries réceptrices synchronisées et croisées à différents stades de leur croissance avec des bactéries Hfr.

Même expérience que figure 15.

- courbe de croissance des bactéries MK 20 traitées par le chloramphénicol.
- quantité de β galactosidase produite dans des croisements de 20 mn, entre bactéries Hfr K10 et bactéries MK 20 ayant été traitées par le chloramphénicol (1 Hfr/1 F^-).

induction zygotique du prophage λ ind⁻ obtenus dans des croisements de 55 min entre bactéries GY 2200 et :

- bactéries MK 20 ayant été traitées par le chloramphénicol (1 Hfr/1 F^-)
- ▲— bactéries MK 20 non traitées par le chloramphénicol (1 Hfr/1 F^-).



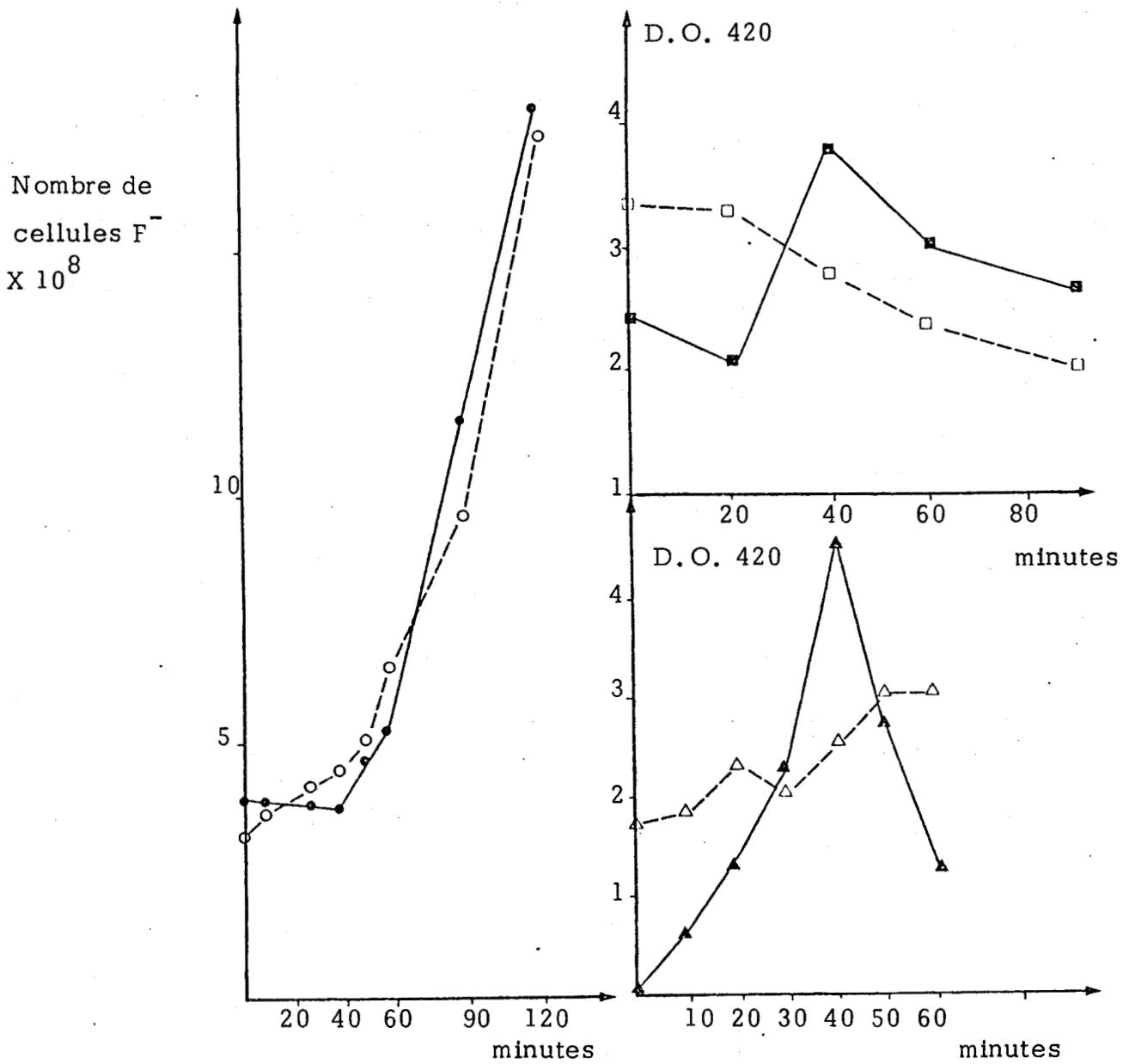


Figure 17 : Taux de transfert chez les bactéries réceptrices synchronisées et croisées à différents stades de leur croissance avec des bactéries Hfr.

Même expérience que figure 15. Le transfert a été mesuré par la quantité de β galactosidase produite dans les croisements.

Courbe de croissance des bactéries réceptrices MK 20.

- issues d'un traitement au chloramphenicol.
- non traitées par le chloramphenicol.
- Bactéries Hfr K10 croisées pendant 25 min. avec :
 - Bactéries MK20 traitées par le chloramphenicol) 1 Hfr/4 F⁻
 - Bactéries MK20 non traitées)
- Bactéries Hfr H croisées pendant 35 min. avec :
 - ▲— Bactéries MK 20 traitées par le chloramphenicol) 1 Hfr/2 F⁻
 - △— Bactéries MK 20 non traitées.)

temps que le chromosome de la bactérie réceptrice.

3) Effet de la carence en Thymine sur la capacité de conjugaison ultérieure des bactéries réceptrices

a) Propriétés du système

Des propriétés nouvelles sont observées après restitution de la thymine aux bactéries carencées. La synthèse de DNA reprend à un taux accéléré lorsque la thymine est restituée (10).

La division cellulaire et la synthèse de DNA apparaissent par la suite toutes deux synchronisées.⁽¹⁰⁾ Deux points en réplication existent dans la bactérie après restitution de la thymine, l'ancienne fourche qui avait été bloquée et la nouvelle prématurément mise en route.

L'un des deux points en croissance s'arrête ensuite puisqu'après une génération la réplication devient normale. (156)

b) Intérêt du système

Au départ, les bactéries commencent toutes en même temps un cycle de réplication mais la particularité vient du fait qu'une autre fourche de réplication existe sur le chromosome.

Une génération après, les bactéries commencent toutes en même temps un cycle de réplication normal.

Il était intéressant de savoir si l'état de compétence peut se développer indifféremment aux deux périodes de début de réplication et surtout au cours de la première où il existe une autre fourche de réplication en élongation sur le chromosome.

c) Etat de compétence des bactéries réceptrices ayant été carencées en thymine

Nous avons utilisé des bactéries thy A ayant une faible exigence en thymine (2 µg par ml).

Nous avons montré que la carence en thymine est effective après 30 à 40 min. Passée cette période, une légère létalité apparaît chez les bactéries carencées.

(f 18)

Nous avons choisi une période de carence de 55 mn.

La courbe de croissance des bactéries qui ont été carencées en thymine est comparable à la courbe témoin des bactéries non carencées.

(f 18

Nous avons vérifié par incorporation de thymine ^3H qu'après 55 mn de carence en thymine, des mises en route prématurées de cycles de réplication apparaissent dans nos conditions expérimentales au moment de la restitution de la thymine. La courbe cinétique d'incorporation de thymine ^3H est bien de pente double par rapport à celle du témoin non carencé.

(f 19

On observe sur la courbe un changement de pente qui se produit entre 40 et 45 mn suivant l'addition de thymine. La cinétique d'incorporation de thymine ^3H qui suit cette période est normale. On peut donc situer entre 40 et 45 mn la reprise de la réplication normale.

On retrouve bien dans notre système les propriétés décrites dans la bibliographie ci-dessus. (10)(156)

Des aliquots de bactéries réceptrices sont prélevés après la restitution de la thymine et croisés avec un léger excès de bactéries donatrices.

On observe un seul maximum du taux de transfert situé 40 mn après la restitution de la thymine (f 20 à 23), juste au début du changement de pente de la courbe cinétique d'incorporation décrite plus haut.

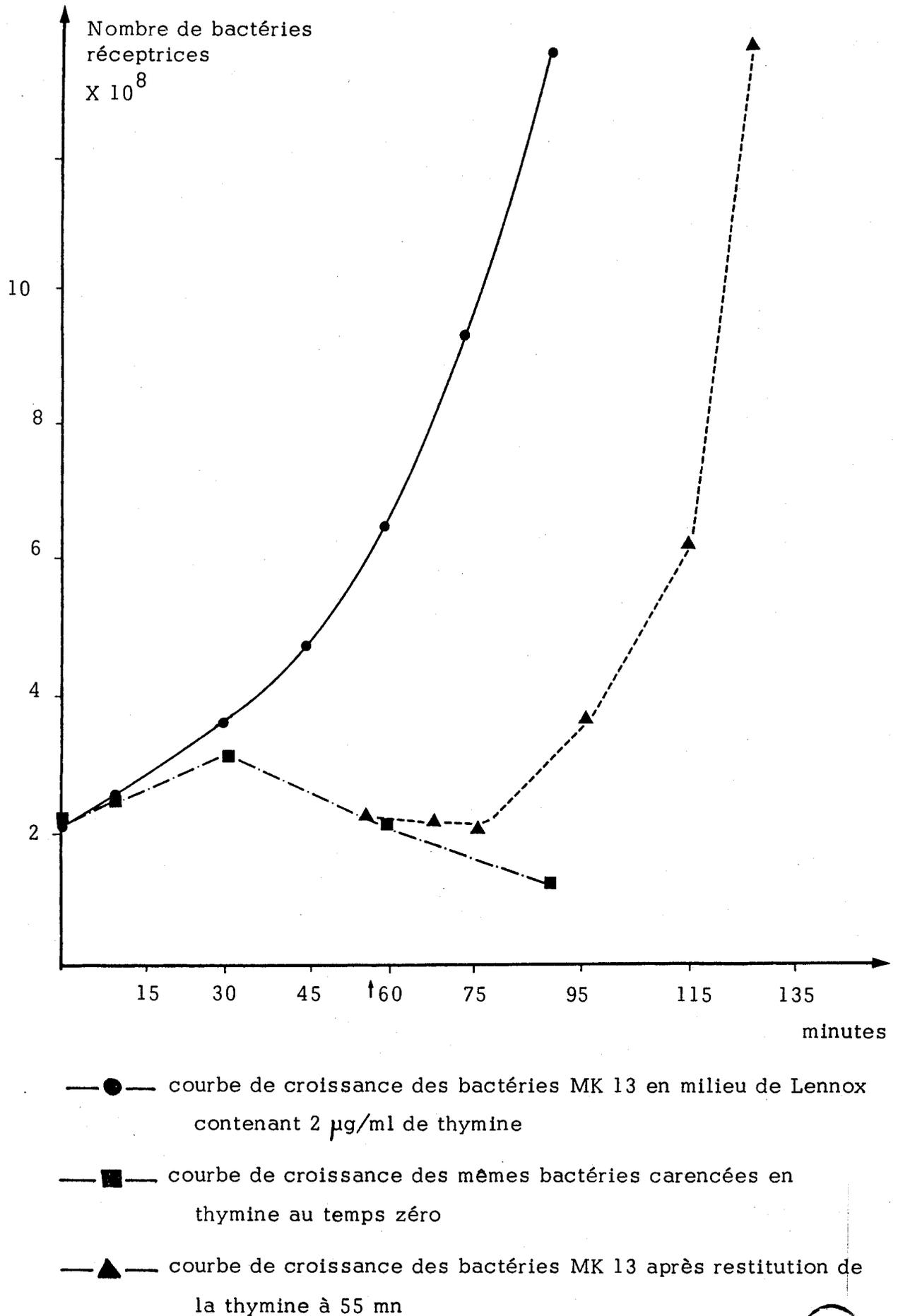
(f 19

On peut donc supposer que l'état de compétence des bactéries réceptrices ayant été carencées en thymine apparaît à la période qui précède la reprise de la réplication normale.

d) compétence des bactéries réceptrices qui vont reprendre un cycle normal de réplication après avoir été carencées en thymine

Nous avons confirmé que les bactéries réceptrices prélevées

Figure 18 : Croissance des bactéries après une carence en thymine de 55 mn



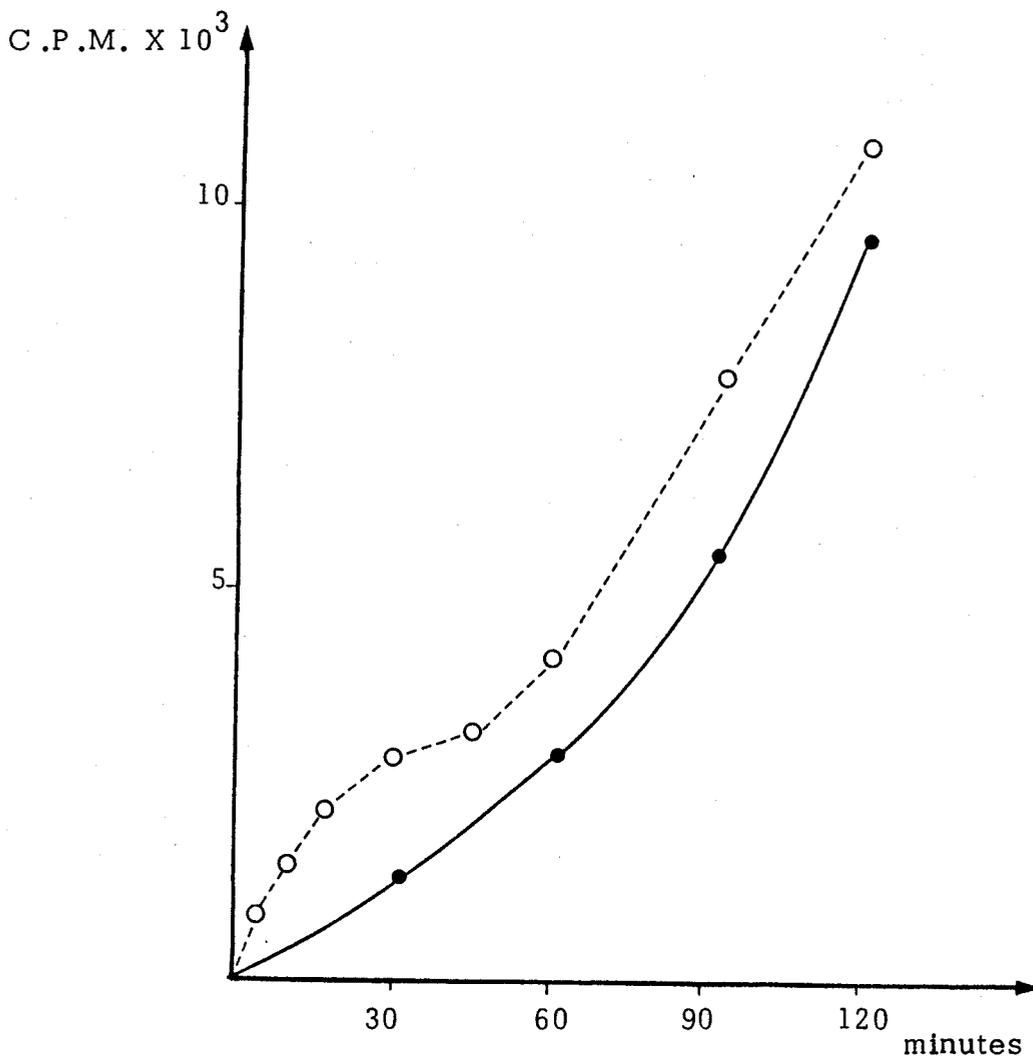


Figure 19 : Cinétique d'incorporation de thymine ³H chez des bactéries ayant été carencées 55 mn en thymine

Après 55 mn de carence, la thymine est restituée aux bactéries MK 13 en même temps que 4 μ Cl de thymine tritiée /ml

- cinétique d'incorporation de thymine tritiée après carence en thymine
- cinétique témoin d'incorporation de thymine tritiée



Taux de transfert chez les bactéries réceptrices synchronisées et croisées à différents stades de leur croissance avec des bactéries Hfr.

Figure 20

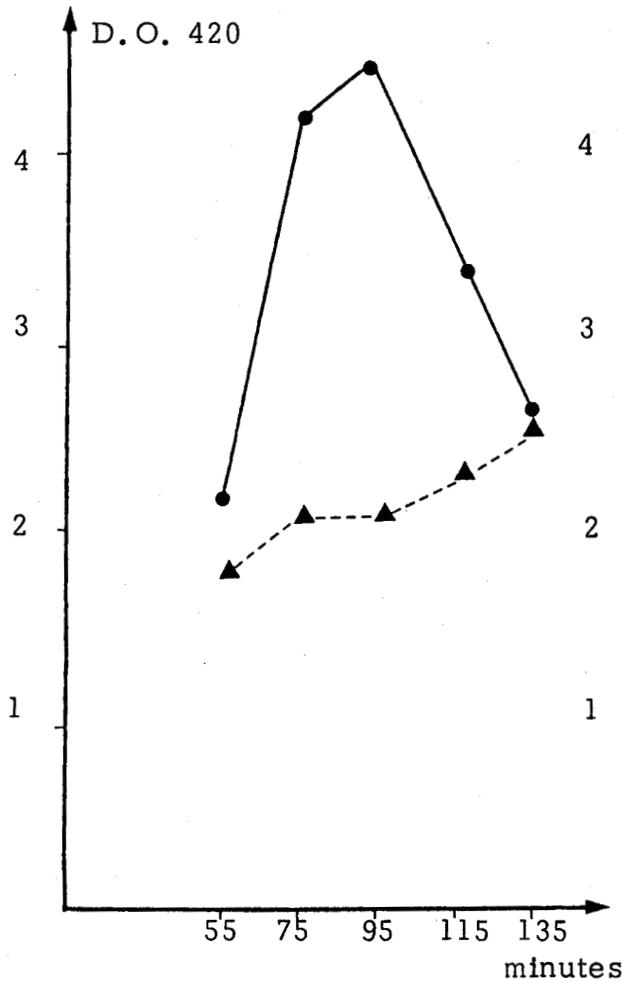


Figure 21

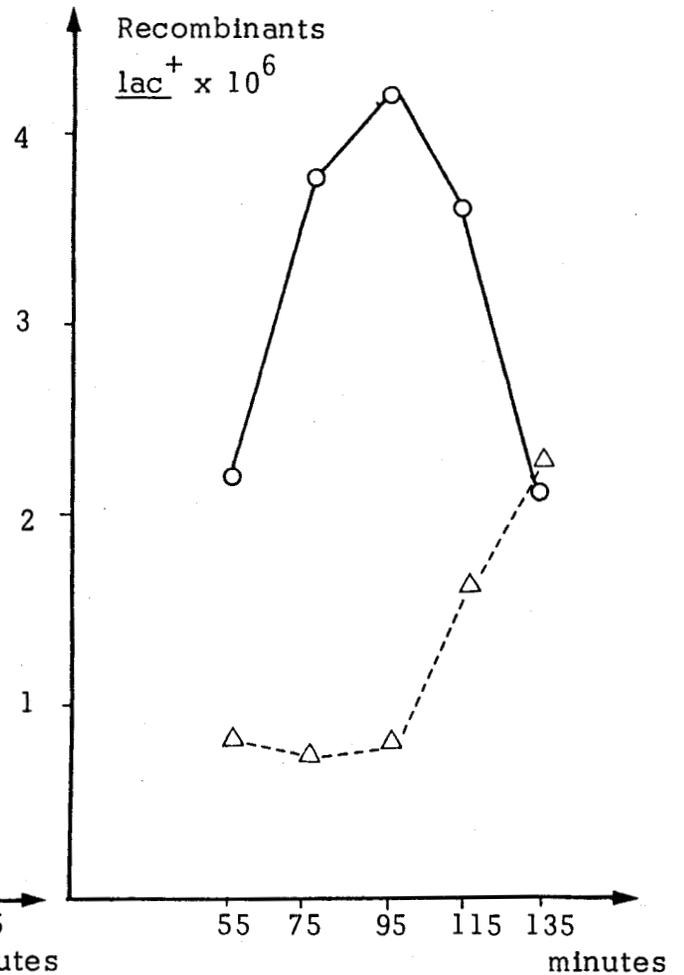


Figure 20 : Quantité de β galactosidase produite pendant 20 min du croisement 3 Hfr K 10 x 1 MK 13.

Figure 21 : Nombre de recombinants lac^+ formés pendant 25 min du croisement 3 Hfr K 10 x 1 MK 13.

—●— } Bactéries MK 13 carencées 55 min en thymine, remise en culture
—○— } dans un milieu contenant de la thymine, prélevées et croisées
avec des bactéries Hfr aux temps indiqués en abscisse.

—▲— } Bactéries MK 13 en phase exponentielle de croissance.
—△— }

Taux de transfert chez les bactéries réceptrices synchronisées et croisées à différents stades de leur croissance avec des bactéries Hfr.

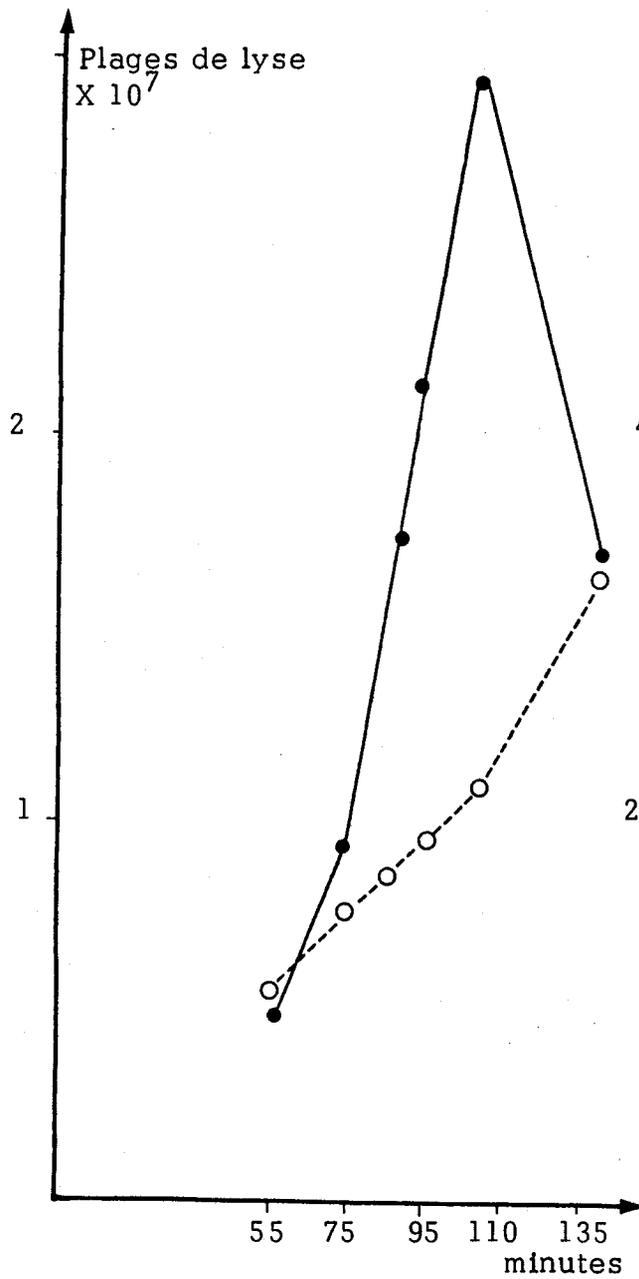


Figure 22

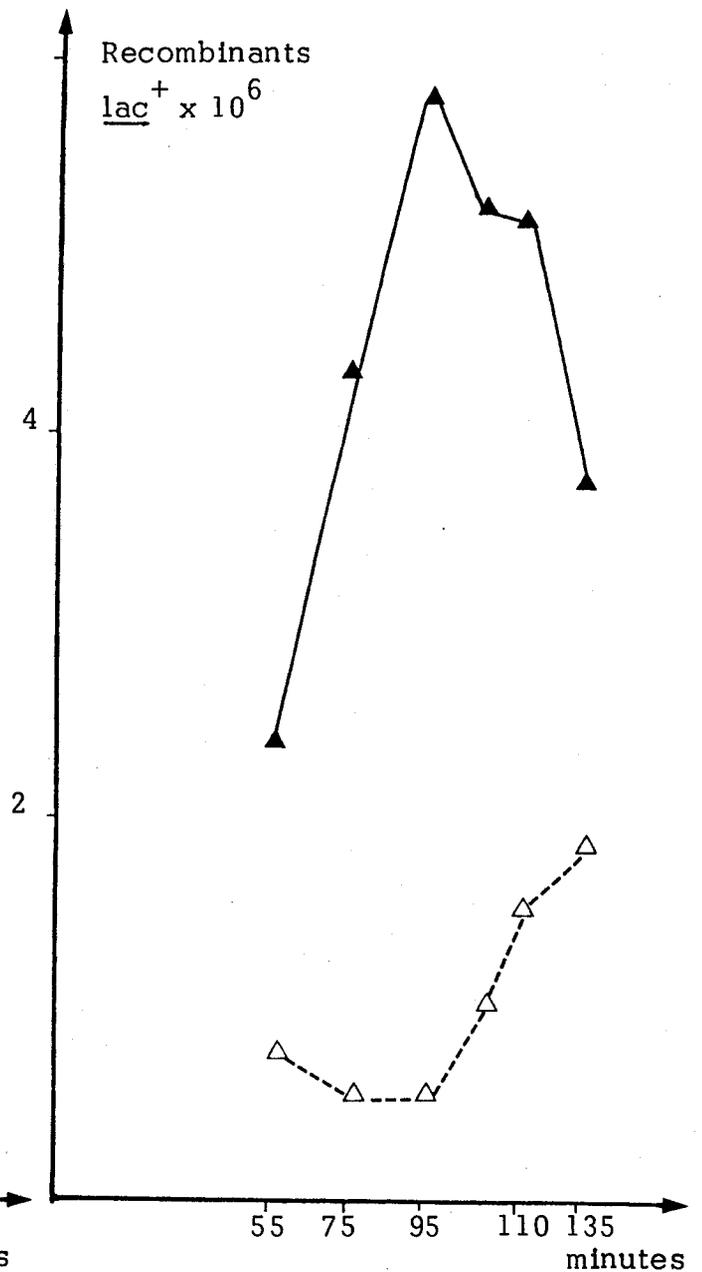


Figure 23

Figure 22 : Transfert mesuré par l'induction zygotique du prophage λ ind⁻ après 55 min du croisement 2 GY2200 \times 1 MK13.

Figure 23 : Transfert mesuré par le nombre de recombinants lac^+ formés pendant 35 min du croisement 5 Hfr H \times 1 MK13.

- } Bactéries MK13 ayant été carencées en thymine (même protocole que figures 20 - 21).
- } Bactéries MK 13 en phase exponentielle de croissance.



40 min après la restitution de la thymine, donc juste avant la reprise normale de la réplication sont bien toutes compétentes.

Elles ont été croisées avec un nombre croissant de bactéries donatrices. Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec des bactéries réceptrices en phase exponentielle de croissance croisées avec les mêmes bactéries donatrices.

On s'attend à ce qu'il faille beaucoup plus de bactéries donatrices pour saturer les bactéries réceptrices compétentes que pour saturer celles qui sont en croissance exponentielle.

C'est ce qu'on observe :

- peu de différence dans les taux de transfert quand les bactéries donatrices sont minoritaires.
- une différence qui croît rapidement lorsque les bactéries donatrices sont en excès.

(f 24

Tous les résultats obtenus sont indépendants de l'origine et du sens d'injection de la bactérie Hfr utilisée.

(f 20 à 23

4) Stade zéro de la réplication chez les bactéries réceptrices croisées avec des bactéries donatrices

Nous avons fait une expérience complémentaire pour vérifier que le brin de DNA pénètre chez les bactéries réceptrices qui sont au stade d'arrêt de la réplication.

Nous nous sommes basé sur la relation qui semble exister entre l'immunité à la mort par carence en thymine et le stade d'arrêt de la réplication. (122).

Si la localisation du stade de compétence à la période d'arrêt de la réplication est exacte, les zygotes formés dans des croisements où les bactéries réceptrices sont carencées en thymine devraient être immunes à la mort par carence en thymine.

Un croisement est réalisé en absence de thymine entre bactéries donatrices et bactéries réceptrices carencées au préalable une heure en

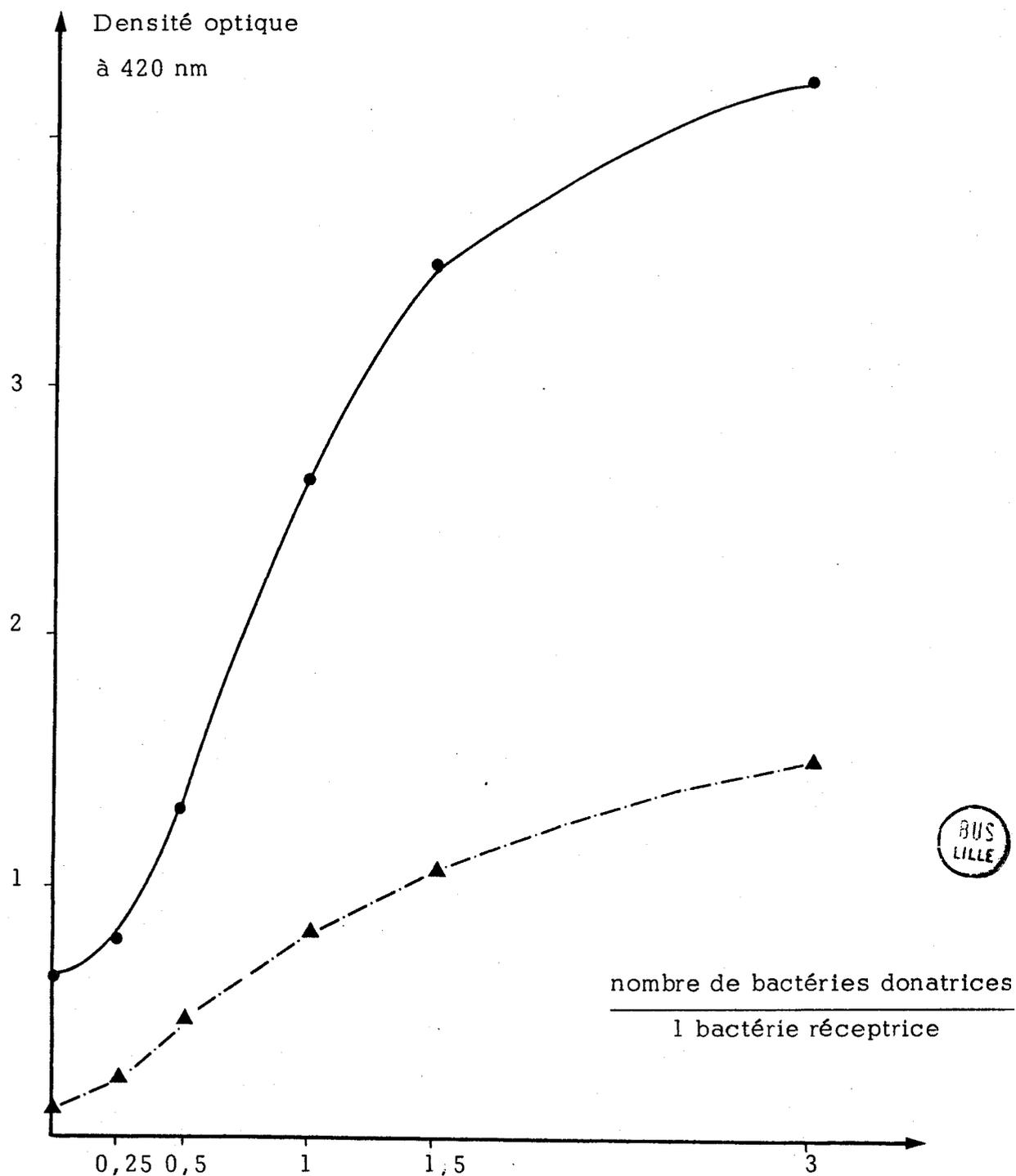


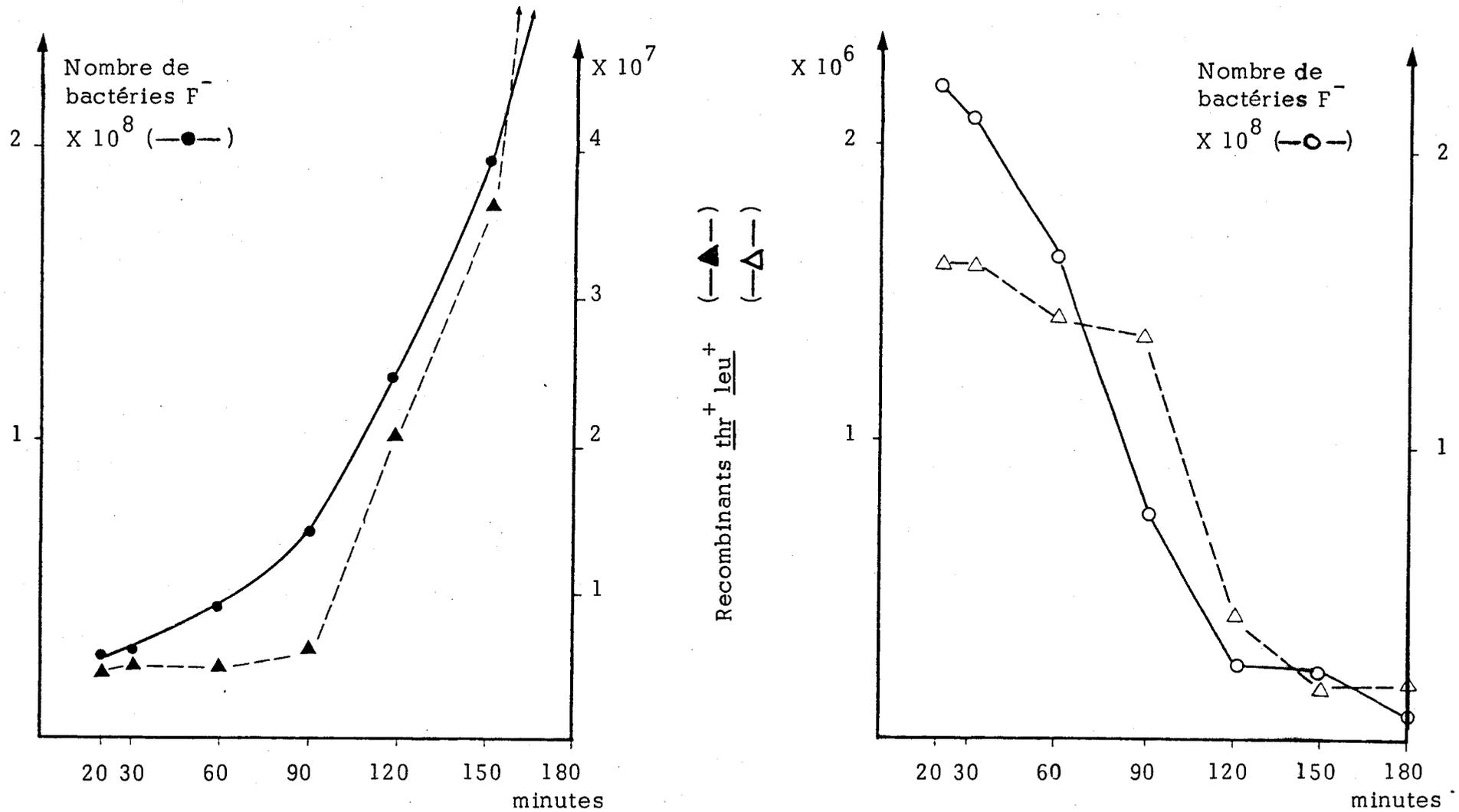
Figure 24 : Augmentation de la fraction de bactéries compétentes après 55 mn de carence en thymine et 40 mn de culture avec thymine

Une quantité fixe de bactéries MK 13 au stade de compétence (40 mn après restitution de la thymine) a été croisée avec un nombre croissant de bactéries Hfr.

Le taux de transfert a été mesuré par la β galactosidase produite dans le zygote

- ● — croisement des bactéries réceptrices compétentes
- ▲ — croisement des bactéries réceptrices en phase exponentielle de croissance

Figure 25 : Immunité à la mort par carence en thymine des zygotes



Le croisement Hfr H X MK 13 est agité mécaniquement à 20 mn du début du croisement et dilué au 1/500^{ème} dans un milieu neuf. Le dénombrement des recombinants thr⁺ leu⁺ et des bactéries réceptrices est effectué au cours de l'incubation qui suit.

Même protocole mais les bactéries réceptrices ont été carencées en thymine 1 heure avant la conjugaison et croisées en absence de thymine avec des bactéries donatrices. Le dénombrement des cellules a été effectué sur boîte contenant de la thymine.



thymine. Après transfert des marqueurs génétiques utilisés, le croisement est interrompu par agitation au vortex en présence de streptomycine et l'incubation poursuivie à 37°C. La croissance des zygotes formés et des bactéries réceptrices qui n'ont pas conjugué est déterminée par dénombrement des cellules viables.

(f 25

La survie des zygotes est observée pendant la période qui suit la séparation des couples conjugants. Les bactéries réceptrices qui n'ont pas conjugué, sont touchées par la mort par carence en thymine. On remarque que celle-ci n'atteint les zygotes qu'environ 60 min après la pénétration des marqueurs génétiques. Ceci est en accord avec l'interprétation donnée au palier sans division observé sur la courbe de croissance synchronisée des zygotes issus des bactéries réceptrices ayant conjugué avec des bactéries donatrices Hfr (figure 12 page).

Les résultats confirment la localisation du stade de compétence au niveau de la période d'arrêt de la réplication entre la terminaison et la mise en route d'un cycle de réplication.

5) Conclusion :

Au moment de la carence en thymine des bactéries ont une partie du chromosome répliqué qui se présente sous la forme de deux doubles chaînes en arrière de la fourche de réplication.

A la restitution de la thymine, il se produit une mise en route prématurée de la réplication qui n'interfère pas avec la fourche existante.

Aucun état de compétence pour la conjugaison n'a été mis en évidence pendant cette période.

Pritchard et Lark (156) ont montré que la mise en route prématurée de la réplication était asymétrique et qu'une seule des deux structures bifilaires était répliquée.

Cette mise en route particulière de la réplication pourrait expliquer l'absence d'un état de compétence durant cette période. Cependant, une autre explication nous semble plus en accord avec l'ensemble des résultats que nous avons obtenus. L'état de compétence ne se développerait pendant

la période qui précède le démarrage de la réplication que chez les bactéries réceptrices qui ont terminé la réplication du chromosome.

En effet, les résultats obtenus avec des bactéries réceptrices synchronisées par l'action du chloramphénicol sont en faveur d'un état de compétence situé dans la période où le chromosome est complètement répliqué avant l'initiation d'un nouveau cycle de réplication.

L'absence de compétence pendant la période de mise en route prématurée de la réplication après carence en thymine, serait expliqué par le fait qu'il n'existe pas dans ce cas de période où le chromosome est complètement répliqué. Une fourche de réplication existe au moment de la mise en route prématurée de la réplication après restitution de la thymine chez les bactéries carencées.

Par contre le cycle de réplication qui reprend une génération après la restitution de la thymine est précédé d'une période de terminaison de la réplication où se développe l'état de compétence.

Ceci est en faveur d'un état de compétence lié au processus actif de l'initiation et élimine l'hypothèse d'un composant membranaire, activé par le contact de cellules de sexe opposé qui déclencherait parallèlement la réplication végétative chez la bactérie réceptrice et la réplication de transfert chez la bactérie donatrice.

L'état de compétence semble donc se développer pendant la période de repos de la réplication où le chromosome a cessé de se répliquer, avant la mise en route du cycle de réplication suivant.

INTERACTION ENTRE REPLICONS BACTERIENS ET EPISOMIQUES
CHEZ LES BACTERIES DONATRICES APRES ACTIVATION DU REPLICON F

I - Introduction

Nous avons vu qu'il existe dans le cycle cellulaire de la bactérie réceptrice un stade de compétence situé entre la terminaison d'un cycle de réplication végétative et l'initiation d'un nouveau cycle.

Nous avons considéré l'alternative suivante :

- l'état de compétence ne concerne strictement que le pouvoir récepteur de la bactérie réceptrice. Le transfert du DNA est déclenché chez la bactérie donatrice indépendamment de l'état de la bactérie réceptrice mais il n'aboutit qu'en présence d'une bactérie compétente.

- l'état de compétence est lié à la transmission d'un signal de conjugaison qui indique à la bactérie donatrice qu'elle peut déclencher le transfert de DNA. Ce signal de conjugaison peut correspondre à des structures membranaires spécifiques de la bactérie réceptrice ou à la diffusion d'un produit à travers les membranes en contact.

Le transfert semble pouvoir être déclenché quel que soit le stade de réplication de la bactérie donatrice puisque nous avons montré précédemment que toutes les bactéries donatrices d'une population en phase exponentielle de croissance sont capables de conjuguer si elles sont en présence d'un nombre égal de bactéries réceptrices compétentes.

La réplication semi-conservative est bidirectionnelle et du type Θ (91). La réplication associée au transfert chez une bactérie Hfr est unidirectionnelle et du type σ (70, 145). Elle se déroule dans le sens des aiguilles d'une montre ou dans le sens inverse suivant le sens d'injection de la bactérie Hfr utilisée.

Aucun travail n'a pu établir de relation entre réplication semi-conservative, réplication de transfert et processus de transfert.

Si l'on considère les 2 types de réplication qui se déroulent pendant le transfert de DNA, on peut prévoir la rencontre des fourches réplcatives semi-conservatives et de transfert et, en conséquence, le

blocage de la réplication semi-conservative et du processus de transfert.

Fulton (68) a mis cependant en évidence le transfert complet du chromosome bactérien chez E.coli K 12, par analyse génétique des recombinants formés lors de croisements de longue durée. Ce résultat pourrait être expliqué par l'absence d'interférence entre les fourches répliquatives et le processus de transfert.

Cette interprétation suppose que la réplication végétative est maintenue au stade zéro pendant le déroulement du transfert de DNA, éliminant de ce fait les fourches de réplication qui interféreraient avec le processus de transfert. Il est possible que la bactérie donatrice adapte par le mécanisme de régulation les cycles de réplication végétative au phénomène de conjugaison, afin d'aboutir à un transfert coordonné du matériel génétique.

Deux éventualités sont à considérer :

- s'il n'y a pas de régulation, le blocage de la réplication végétative doit se produire par interférence des fourches répliquatives.

- s'il existe une régulation, elle doit supprimer l'interférence des fourches répliquatives donc bloquer la réplication au stade zéro.

Dans les 2 cas l'arrêt de la réplication végétative devrait être observé pendant le déroulement du transfert de DNA. Dans le premier cas l'arrêt se ferait à n'importe quel stade de la réplication végétative au hasard des collisions entre les fourches répliquatives ; dans le second l'arrêt se ferait au stade zéro, le démarrage de nouveaux cycles de réplication étant inhibé.

Nous avons montré dans ce paragraphe, l'existence d'un signal de conjugaison, l'effet du transfert de DNA sur le déroulement de la réplication végétative chez la bactérie donatrice et déterminé l'interaction entre réplicon bactérien et réplicon épisomique. A l'aide de nos résultats, nous avons pu interpréter des travaux effectués dans d'autres laboratoires et restés inexplicés. Ces travaux avaient mis en évidence deux répliquations simultanées chez les bactéries donatrices Hfr synchronisées, l'une déclenchée à l'origine de réplication bactérienne, l'autre à l'origine de réplication du facteur F.

II - Transmission d'un signal de conjugaison entre bactéries réceptrices et donatrices. (113)

A) Transfert de DNA à partir de l'origine de transfert

Nous avons étudié les effets d'un nouveau contact cellulaire sur la mobilisation du chromosome après interruption du processus de transfert par séparation mécanique des couples en conjugaison. Afin de connaître le point du chromosome à partir duquel reprend le nouveau transfert de DNA, nous avons mesuré les temps d'entrée des marqueurs génétiques après interruption des croisements et comparé à ceux obtenus lors de croisements non interrompus.

Pour séparer les bactéries donatrices des bactéries réceptrices, la suspension a été soumise durant 3 min à l'agitation mécanique.

Dans le but de ne mettre en évidence que le nouveau transfert de DNA, nous avons ajouté une 2ème bactérie réceptrice au 1er croisement, immédiatement après son interruption. Nous avons contresélectionné les zygotes formés lors du premier croisement et dénombré uniquement les zygotes issus de la 2ème bactérie réceptrice.

- Résultats obtenus -

Nous avons au préalable évalué l'efficacité de séparation des couples conjugants. Nous avons mesuré après interruption du croisement l'apparition des marqueurs génétiques qui n'étaient pas encore transférés au moment de l'interruption.

Le rapport du nombre de recombinants, obtenus après interruption du croisement, au nombre de recombinants formés dans le croisement non interrompu, mesurera la proportion de couples qui ont résisté à l'agitation mécanique (tableau 14).

Le pourcentage indique que la plupart des bactéries Hfr ont été séparées des bactéries réceptrices et sont donc susceptibles de reconjuguer une nouvelle fois. Nous avons ensuite interrompu les croisements à 15 et 35 min du début des croisements et mesuré le temps d'entrée des marqueurs génétiques au cours du nouveau transfert de DNA.

Quel que soit le moment de l'interruption, la séquence de gènes qui passe lors du nouveau croisement est identique à celle du croisement non interrompu mais retardée de la période qui précède l'interruption.

Tableau 14

Pourcentage de couples ayant résisté à 3 min d'agitation au vortex

	Recombinants <u>his</u> ⁺ à 60 min	Recombinants <u>ade</u> ⁺ à 35 min
Croisement non interrompu	$1,17 \cdot 10^4$	$5,6 \cdot 10^5$
Croisement interrompu par séparation des couples avant le passage des gènes correspondants	$0,9 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^3$
Pourcentage de couples non séparés	0,7 p 100	0,4 p 100

Dénombrement des recombinants ade⁺ ou his⁺ à 35 et 60 min du début du croisement Hfr H x ABF 1 non interrompu ou interrompu avant le passage des gènes ade⁺ ou his⁺ par séparation des couples 25 min avant le dénombrement des recombinants. Chaque colonne correspond à une expérience différente.



Quand l'arrêt du croisement est effectué à 15 min, les gènes passent tous avec 15 min de retard : quand il est produit à 35 min, l'apparition des différents recombinants est retardée de 35 min. (figures 26 et 27

Les courbes cinétiques de transfert sont donc superposables si l'on déduit la période de 15 ou 35 min qui précède l'interruption de la première conjugaison.

Ces résultats montrent qu'un nouveau cycle de transfert est immédiatement induit à partir de l'origine caractéristique du chromosome.

Un léger accroissement du retard se produit pour les marqueurs génétiques éloignés. Afin d'éviter l'interférence possible de l'étape de recombinaison, nous avons suivi directement l'entrée du chromosome dans les bactéries réceptrices par l'induction zygotique du prophage λ et l'induction de la β -galactosidase. (figures 27 et 28, page).

Quand la séparation des couples est faite à 15 min (gènes thréonine-leucine en cours de transfert, figure 27, page) donc avant le passage du prophage λ (figure 27, page) et du gène lac^+ (figure 28, page), l'induction du prophage transféré aux bactéries réceptrices ou celle de la β -galactosidase, se fait avec un retard de 15 min.

Les courbes cinétiques de transfert sont superposables si l'on déduit la période qui précède l'interruption. (figures 27 et 28

Ces dernières expériences mettent en évidence avec précision un décalage des temps d'entrée correspondant exactement à la période qui précède l'agitation mécanique de la suspension des bactéries conjugantes. Ceci indique une reprise immédiate de la conjugaison après interruption et un nouveau transfert du chromosome à partir de l'origine de transfert caractéristique de la bactérie donatrice Hfr.

B) Le transfert de DNA reprend à partir du point d'arrêt.

Si un transfert de DNA en cours de déroulement est arrêté sans

séparation de couples, par refroidissement rapide de la suspension de bactéries conjugantes, le transfert de DNA reprend immédiatement après élévation de la température à 37°C mais à partir du point où il était arrêté (tableau 15).

Si dans les mêmes conditions, les couples sont séparés par agitation *mécanique* avant l'élévation de température, le transfert reprend à 37°C de nouveau à partir de l'origine spécifique de la bactérie donatrice Hfr utilisée.

(t 16

1) Interprétation des résultats

Après détachement des bactéries réceptrices les bactéries Hfr exconjugantes peuvent s'apparier et conjuguer immédiatement une deuxième fois.

* Dans ces conditions, le transfert ne reprend jamais au point où il a été bloqué, mais toujours à partir de l'origine caractéristique de transfert. Un nouveau cycle de transfert est donc chaque fois déclenché. Ce n'est pas le chromosome interrompu qui passe dans ces conditions puisqu'aucun temps de latence nécessaire à la reconstitution de son origine caractéristique n'est observé ; l'induction du second transfert se produit en effet immédiatement après l'interruption.

* Le nouveau cycle de transfert commence donc à partir de l'origine caractéristique d'une autre copie de DNA. Dans le cas où l'arrêt de transfert a été provoqué sans séparation de couple, le transfert peut reprendre sans nouveau contact cellulaire à partir du point où il a été bloqué.

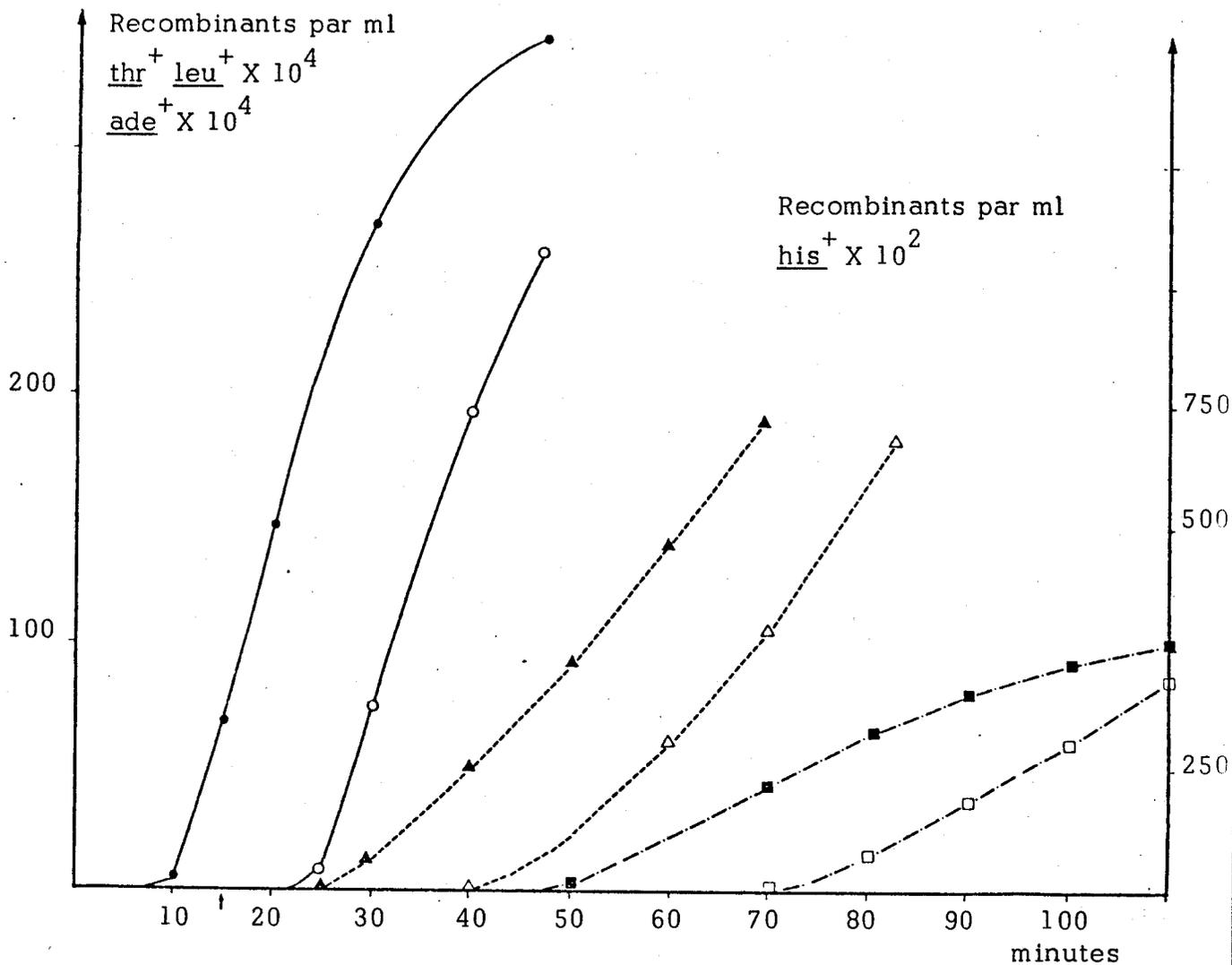
La différence des résultats est en relation directe avec l'absence de formation d'un nouveau contact cellulaire.

Ceci est en faveur de l'existence d'un signal de conjugaison, transmis de cellule à cellule au moment du contact membranaire, induisant spécifiquement chaque fois un nouveau cycle de transfert. (113)

2) Remarques particulières

Il faut signaler que Bouck et Adelberg d'une part (19), et Hane d'autre part (79), ont montré qu'après inhibition du

Figure 26 : Reprise d'un nouveau cycle de transfert de DNA après séparation des couples d'un premier croisement



Cinétique d'apparition des recombinants issus des bactéries ABF 2 lors du croisement :

1 Hfr H X (10 ABF 1 + 10 ABF 2)

Croisement entre des bactéries Hfr H et le mélange de bactéries (ABF 1 + ABF 2)

—●— $\underline{thr}^+ \underline{leu}^+$; —▲— \underline{ade}^+ ; —■— \underline{his}^+ ;

Croisement Hfr H x ABF 1, interrompu à 15 min du début de croisement et repris en présence des bactéries ABF 2.

—○— $\underline{thr}^+ \underline{leu}^+$; —△— \underline{ade}^+ ; —□— \underline{his}^+

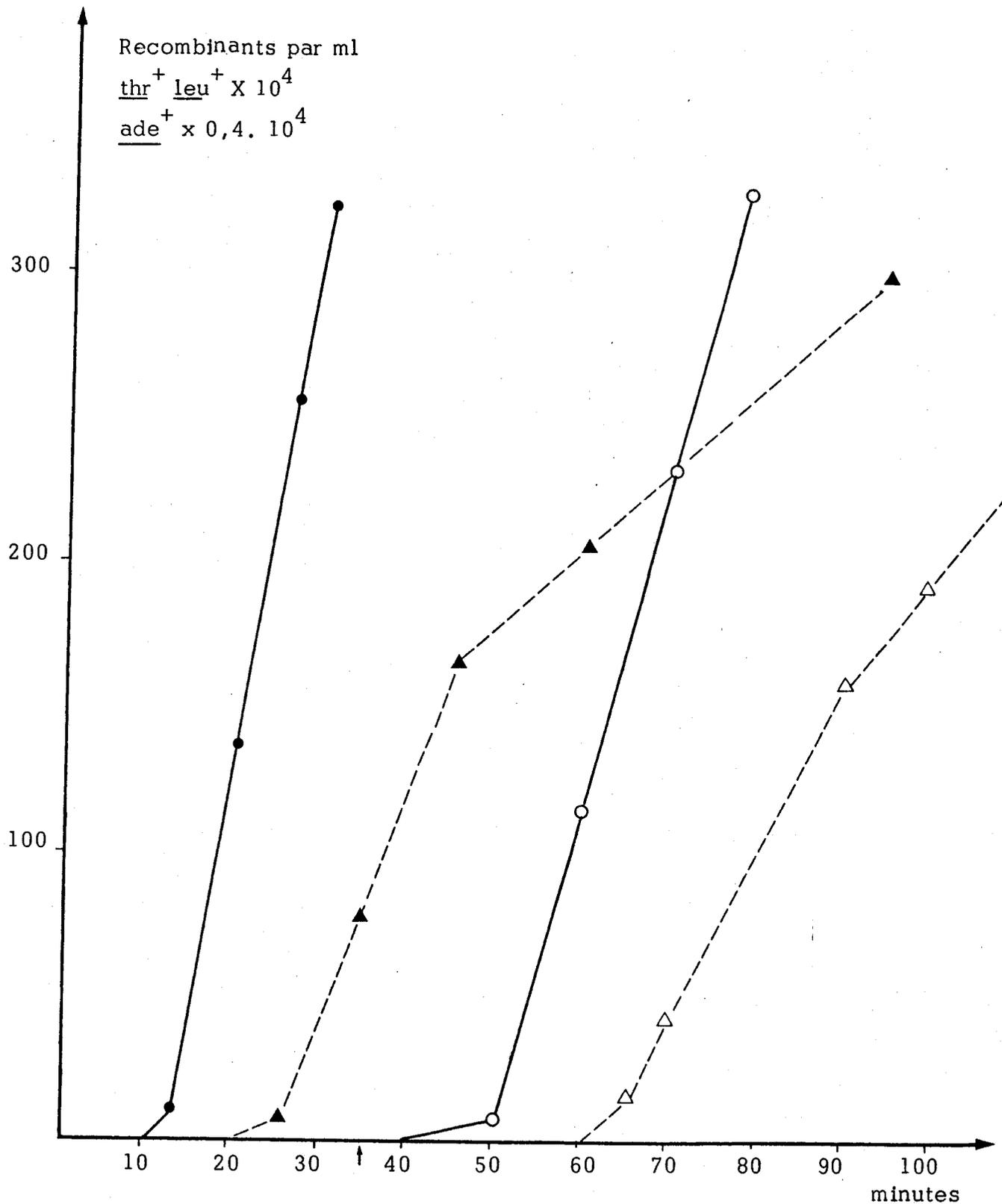


Figure 27 : Reprise d'un nouveau cycle de transfert de DNA après séparation des couples d'un premier croisement

même expérience que figure 26 page

Croisement entre des bactéries Hfr H et le mélange de bactéries (ABF 1 + ABF 2) $\underline{thr}^+ \underline{leu}^+$ —●— ; \underline{ade}^+ —▲—

Croisement Hfr H X ABF 1 interrompu à 35 mn du début du croisement et repris en présence des bactéries ABF 2 : $\underline{thr}^+ \underline{leu}^+$ —○— ; \underline{ade}^+ —△—



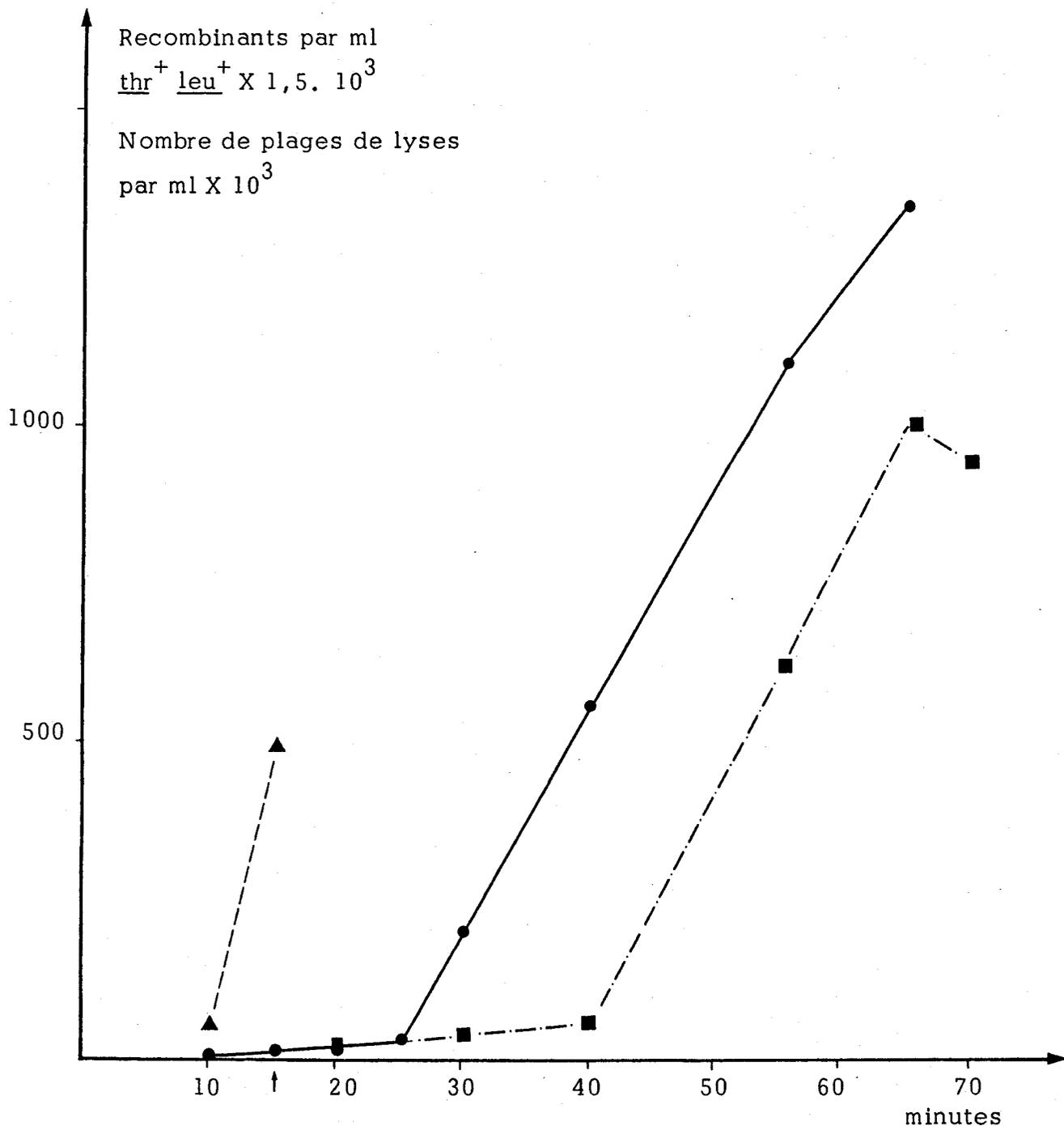


Figure 28 : Cinétique de transfert du prophage λ après séparation des couples d'un premier croisement

Cinétique de transfert du prophage λ aux bactéries GY 2164

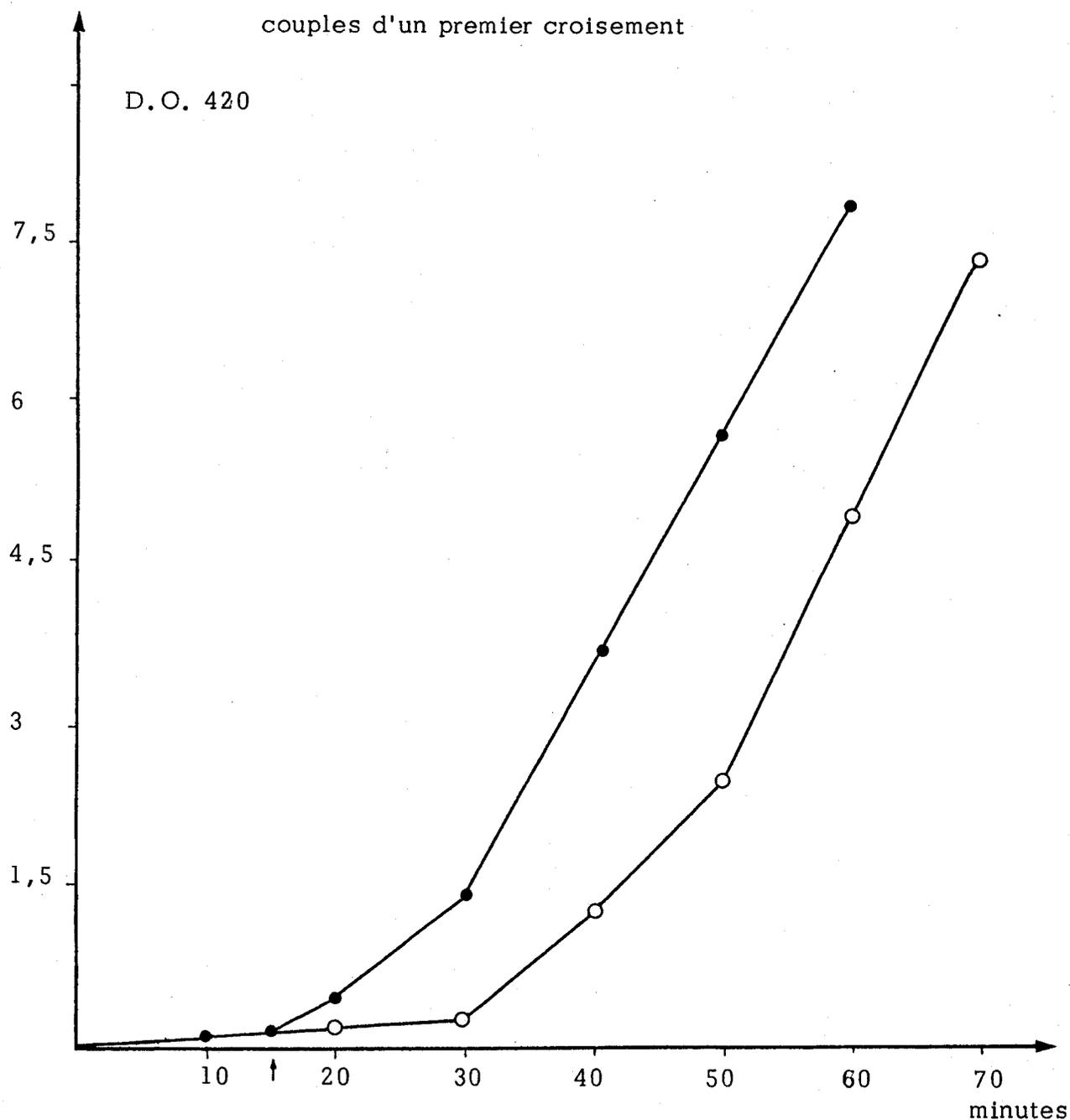
—●— lors du croisement 1 GY 2200 X (10 ABF 3 + 10 GY 2164)

—■— lors du croisement, effectué dans les mêmes proportions, GY 2200 X ABF 3, interrompu à 15 min du début du croisement et repris en présence des bactéries GY 2164

—▲— recombinants $\underline{thr}^+ \underline{leu}^+$ issus des bactéries ABF 3 lors des 15 min du croisement GY 2200 X ABF 3



Figure 29 : Cinétique de transfert du gène lac^+ après séparation des couples d'un premier croisement



Cinétique de transfert du gène lac^+ aux bactéries MK 20

- lors du croisement 2 Hfr H x (4 ABF 1 + 4 MK 20)
- lors du croisement, effectué dans les mêmes proportions, Hfr H X ABF 1, interrompu à 15 min du début du croisement et repris en présence des bactéries MK 20.

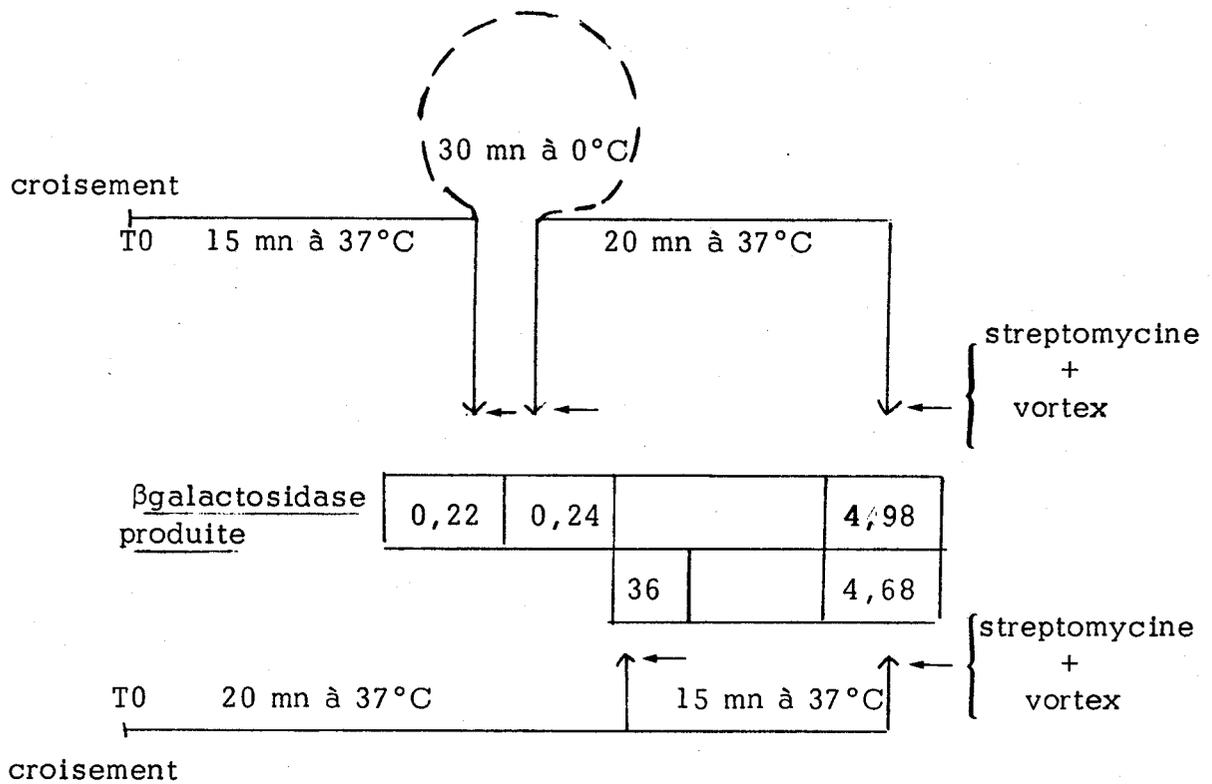


Tableau 15 : Détermination du transfert du gène lac^+ après arrêt de transfert à 0°C sans séparation de couples.

Un échantillon de croisement Hfr H X MK 20 a été incubé 15 mn à 37°C puis 30 mn à 0°C et de nouveau 20 mn à 37°C.

La β galactosidase a été déterminée sur 3 aliquots agités 3 mn au vortex en présence de streptomycine juste avant et après l'abaissement de température à 0°C et à la fin du croisement.

Un autre échantillon du croisement a été constamment incubé à 37°C. La β galactosidase a été déterminée sur des aliquots agités 3 mn au vortex en présence de streptomycine à 20 et 35 mn du début du croisement.

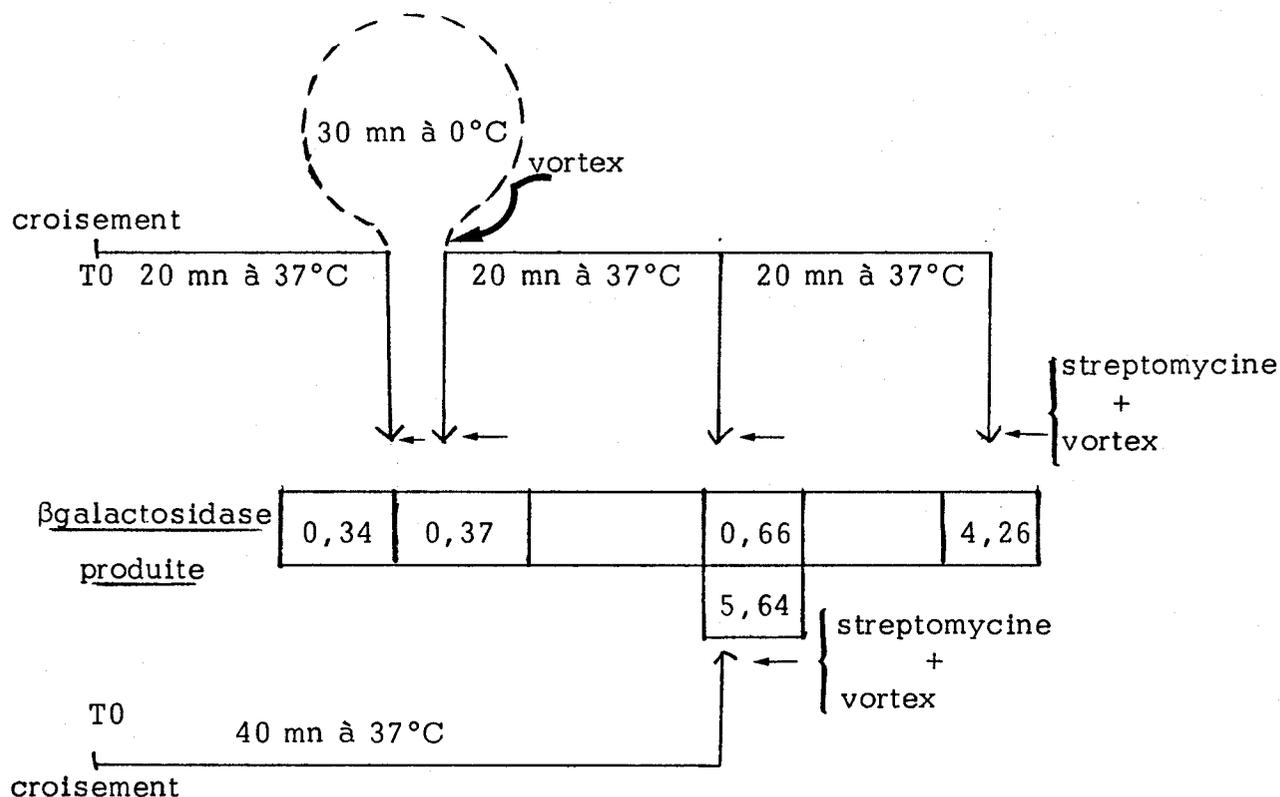


Tableau 16 : Détermination du transfert du gène lac⁺
après arrêt de transfert à 0°C et
séparation des couples

Un échantillon de croisement Hfr H X MK 20 a été incubé 20 mn à 37°C, puis 30 mn à 0°C, agité 3 mn au vortex et laisse ensuite incubé 40 mn à 37°C.

La β galactosidase a été déterminée sur 4 aliquots agités 3 mn au vortex en présence de streptomycine, juste avant et après le passage à 0°C, à 20 mn et 40 mn après l'incubation à 0°C.

La β galactosidase a également été déterminée sur un échantillon de croisement incubé 40 mn à 37°C.

transfert de DNA par l'acide nalidixique, un nouveau transfert de DNA revenait à l'origine après élimination de l'acide nalidixique.

Ce résultat, comparé à celui que nous avons obtenu par séparation mécanique des couples conjugants, permet de supposer qu'il se produit une séparation de couple et une rupture du brin de DNA transféré au cours de l'inhibition du transfert de DNA par l'acide nalidixique.

La supposition d'une formation de cassures dans la chaîne de DNA est à rapprocher de certaines études qui montrent que l'acide nalidixique provoque l'altération (195) et la dégradation du DNA (37). L'apparition d'extrémités libres de DNA par cassure de la chaîne au moment de l'inhibition du transfert par l'acide nalidixique, peut être corrélée au fait que l'acide nalidixique induit le prophage λ dans une bactérie lysogène (179) et qu'il y a production dans ces conditions d'un taux élevé de phages non infectieux (79). Ces propriétés font penser en effet aux fonctions inductibles S.O.S. évoquées précédemment.

III - Effet de la conjugaison sur la réplication semi-conservative et la division cellulaire des bactéries donatrices (112)

Dans cette partie nous allons examiner s'il existe une interférence entre les fourches répliquatives végétatives et celles de transfert qui provoque le blocage de la réplication végétative ou si cette dernière est maintenue au stade zéro afin de permettre au processus de transfert de DNA de se dérouler sans perturbation.

Le problème de l'interférence entre les fourches répliquatives ne devrait concerner que les bactéries Hfr chez lesquelles le facteur F est intégré au chromosome. Chez les bactéries F^+ et F' , l'épisome étant à l'état autonome, la réplication de transfert ne devrait pas interférer avec les fourches de réplication du chromosome bactérien.

Chez les bactéries Hfr, la réplication devrait être logiquement bloquée après activation du réplicon F, soit au niveau de la collision des fourches répliquatives soit à l'origine de réplication.

La discrimination entre ces 2 possibilités a été faite lors de croisements effectués en présence de streptomycine qui a le double avantage de permettre le déroulement du transfert et des cycles de réplication en

cours mais d'inhiber la mise en route de nouveaux cycles par absence de synthèse protéique.

A) La répllication végétative des bactéries Hfr se bloque quand elles sont croisées avec des bactéries réceptrices.

1) Principe de l'expérience

Dans cette étude, nous avons suivi la synthèse de DNA par incorporation de thymine tritiée chez les bactéries donatrices croisées avec des bactéries réceptrices. Nous avons utilisé chaque fois une bactérie donatrice thy A faiblement exigeante en thymine (2 $\mu\text{g/ml}$). La bactérie réceptrice est résistante au 5 bromouracile (BU^{R}) et n'incorpore donc pas la thymine tritiée.

L'incorporation de thymine tritiée par une souche bactérienne BU^{R} est pratiquement nulle. La radioactivité, mesurée après 2 heures de culture de cette souche dans le milieu de Lennox contenant 4 $\mu\text{Ci/ml}$ de thymine tritiée, correspond au seuil de base donné par un échantillon prélevé au temps zéro de la cinétique d'incorporation, soit en moyenne 300 C. P. M. La souche thy A donne dans les mêmes conditions plus de 15000 C. P. M.

Nous avons mesuré dans un premier temps la synthèse de DNA chez les bactéries Hfr en croissance et déterminé parallèlement leur nombre (figure 30).

La comparaison de la cinétique d'incorporation de thymine tritiée avec la courbe de croissance, montre que la synthèse de DNA peut être mesurée tout au long de la croissance jusqu'à la phase d'arrêt donc pendant un temps beaucoup plus long que celui demandé par le transfert du chromosome en entier.

Les expériences n'ont été retenues que dans le cas de croisements effectifs déterminés par la quantité de β galactosidase produite dans des échantillons de croisement.

2) Résultats

a) détermination du phénomène d'inhibition

L'incorporation de thymine tritiée diminue très nettement chez les bactéries Hfr croisées avec les bactéries réceptrices alors qu'elle

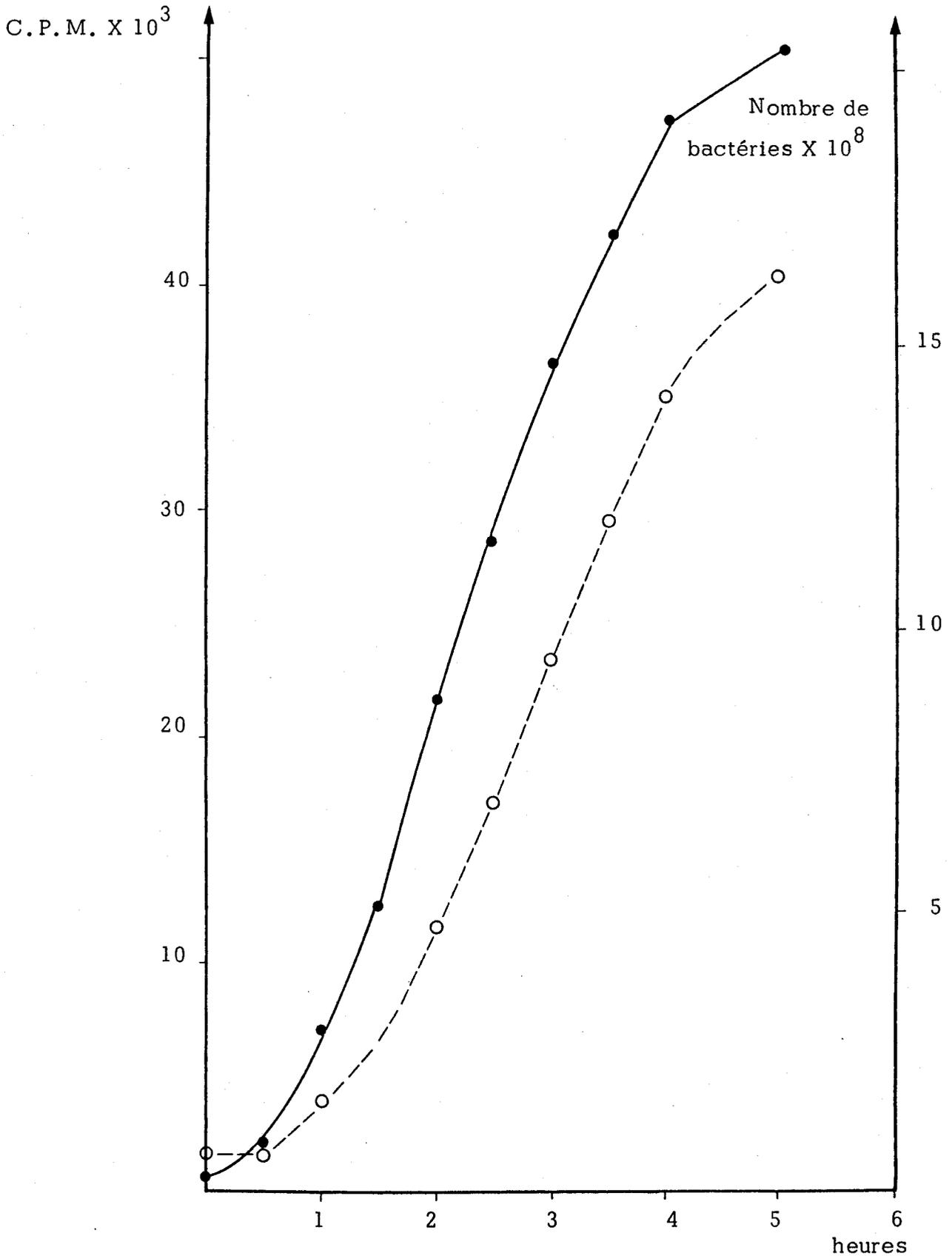


Figure 30 : Mesure de l'incorporation de thymine tritiée dans le matériel TCA insoluble d'un échantillon de culture de bactéries Hfr H thy A

—●— cinétique d'incorporation de thymine tritiée chez les bactéries MK 1 d'un échantillon de culture. 4 μ Ci/ml de thymine ³H ont été ajoutées au temps zéro.
 —○— dénombrement des bactéries MK 1 dans le même échantillon de culture.



continue chez les bactéries Hfr cultivées seules. Une synthèse de DNA persiste cependant. Elle semble trop importante pour correspondre à la resynthèse du brin transféré, mais elle pourrait être attribuée à la répllication végétative qui se poursuit chez les bactéries Hfr restées libres ou à la terminaison des cycles de répllication végétative des bactéries Hfr conjugantes. (figure 31).

L'inhibition de la répllication végétative est observée quels que soient l'origine et le sens d'injection du chromosome des bactéries Hfr croisées avec les bactéries réceptrices. (figure 32).

Le blocage de la répllication peut durer pendant une très longue période (5 heures) nettement au delà de la durée de transfert du chromosome en entier. (figure 33).

Ceci est en accord avec le fait observé précédemment que de multiples croisements successifs se produisent entre les cellules de sexe opposé en présence.

Les appariements devenant moins efficaces au cours du temps, une légère reprise de l'incorporation de thymine tritiée est observée après 3 heures d'incubation et pourrait correspondre à l'accroissement du nombre de bactéries Hfr détachées des bactéries réceptrices.

b) Le phénomène observé n'est pas un artefact.

α) l'inhibition n'est pas due à l'appauvrissement du milieu

Nous avons déterminé précédemment que les bactéries Hfr incorporaient la thymine tritiée ajoutée au milieu de Lennox, pendant une période de 5 heures.

De plus, l'efficacité de croisement est très sensible aux conditions de milieu. Le fait que des croisements successifs se produisent pendant une longue période atteste que le milieu a conservé suffisamment de sources nutritives.

L'inhibition de l'incorporation de thymine tritiée ne semble donc pas due à un appauvrissement prématuré du milieu d'incubation.

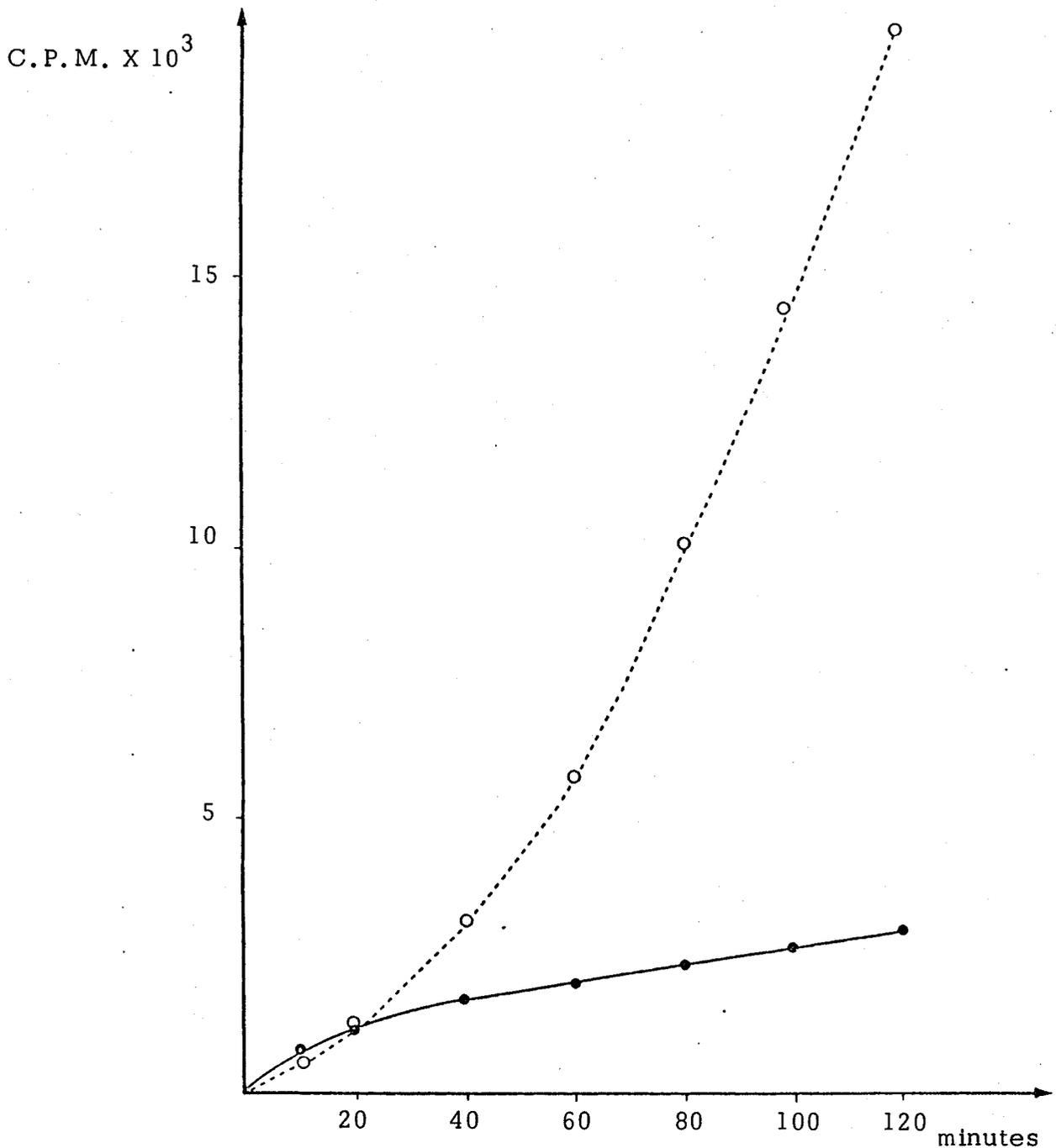
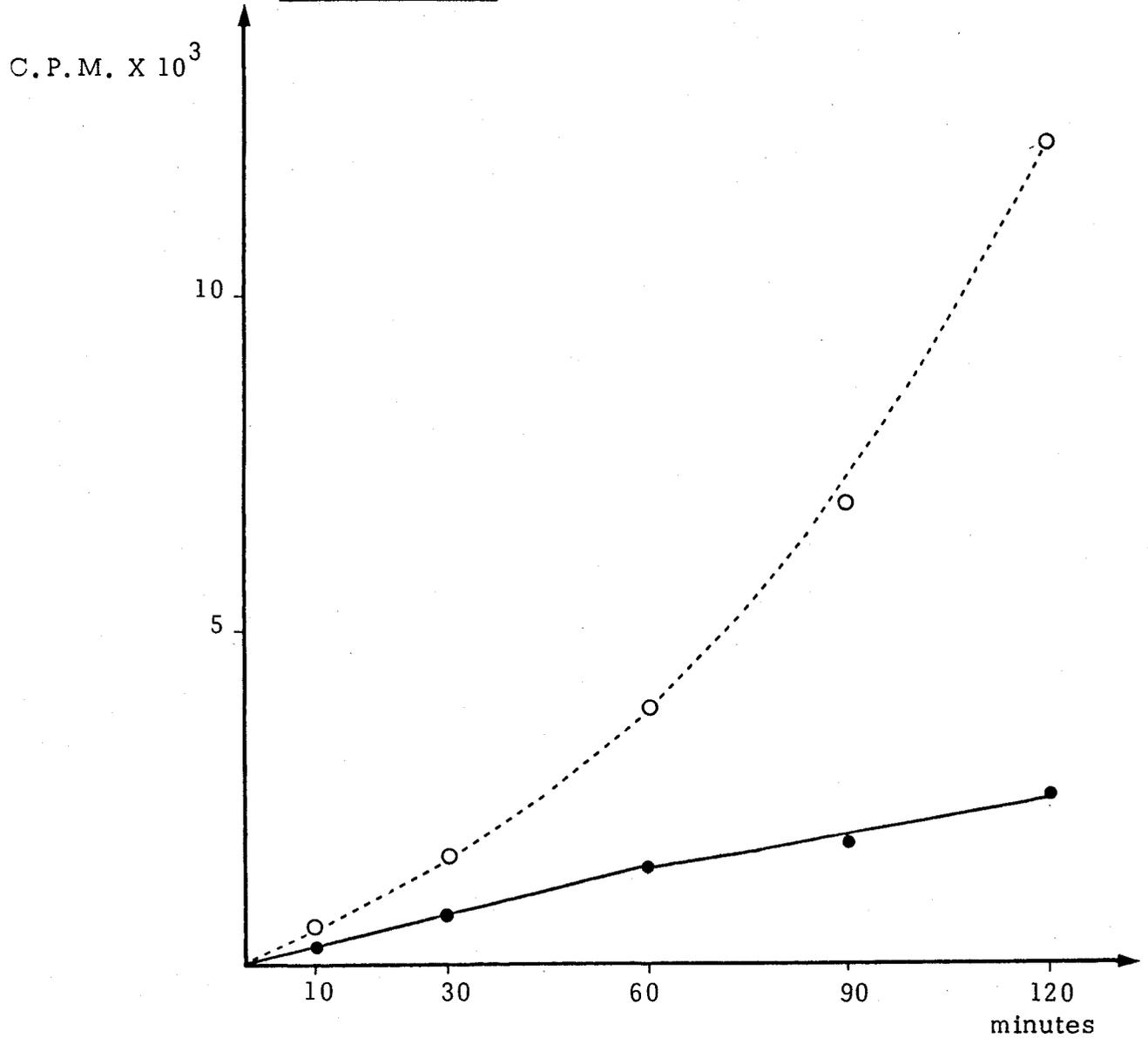


Figure 31 : Cinétique d'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries Hfr H thy A croisées avec des bactéries réceptrices BU^R

Les bactéries MK 1 ont été croisées avec les bactéries réceptrices MK 14 dans les proportions de 1 Hfr pour 4 F⁻ ou incubées seules en quantité équivalente à celle du croisement. 4 uCi/ml de thymine tritiée ont été ajoutées au temps zéro. En ordonnée figure la radioactivité du matériel TCA insoluble des fractions prélevées aux temps indiqués en abscisse.

- bactéries MK 1 croisées avec les bactéries MK 14
- bactéries MK 1 incubées seules

Figure 32 : Cinétique d'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries Hfr K 10 thy A croisées avec des bactéries réceptrices BU^R



Même expérience que figure 31 page sauf que les bactéries donatrices sont des Hfr Cavalli : MK 6

- Bactéries MK 6 croisées avec les bactéries réceptrices MK 14
- Bactéries MK 6 incubées seules

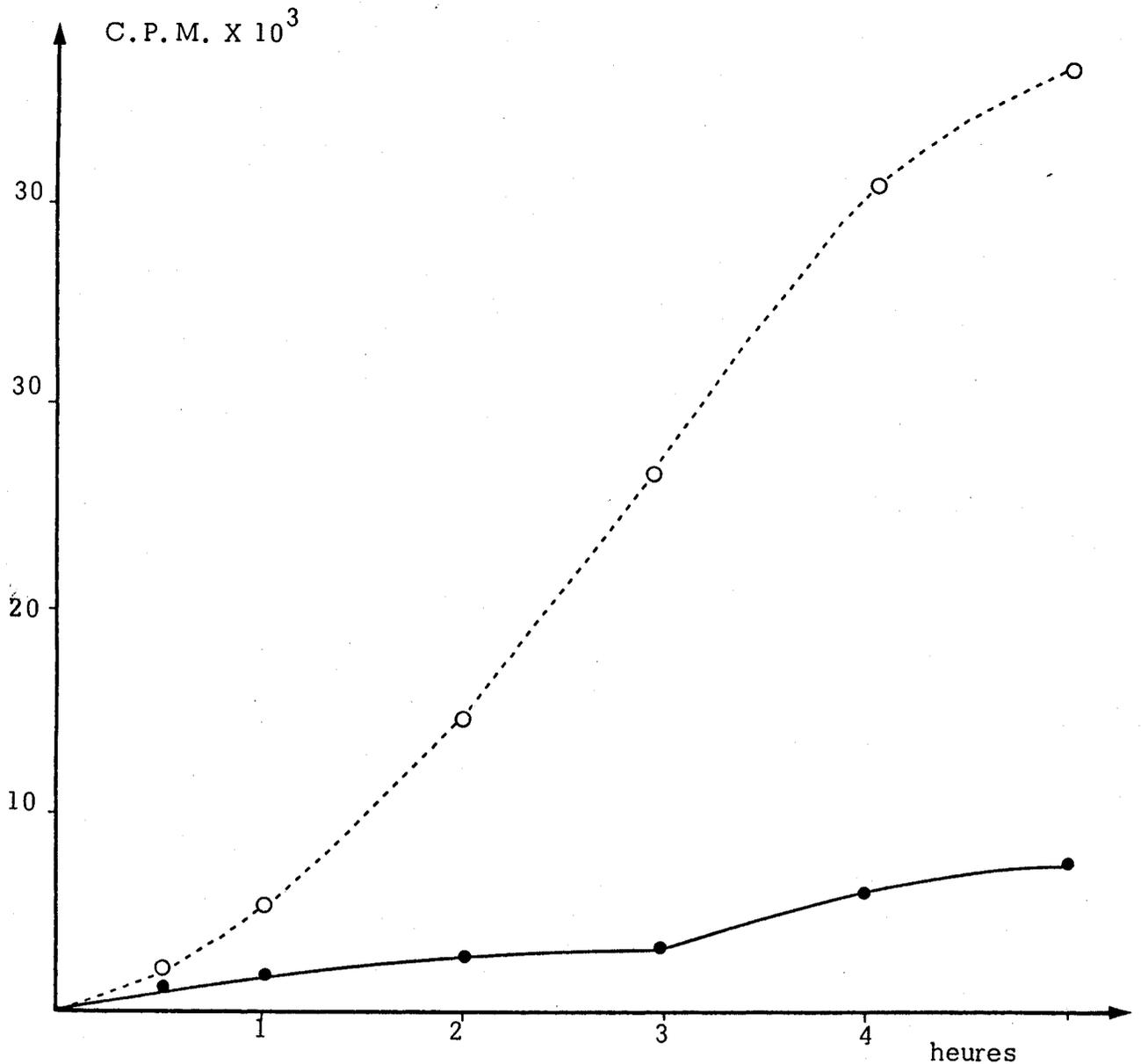


Figure 33 : Cinétique d'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries Hfr H thy A, croisées pendant un temps long avec des bactéries réceptrices BU^R

Même expérience que figure 31 page ; l'incorporation de thymine tritiée par les bactéries MK 1 a été mesurée pendant 5 heures

- bactéries MK 1 croisées avec les bactéries réceptrices MK 14
- bactéries MK 1 incubées seules

L'inhibition de la synthèse de DNA a en effet persisté après que nous ayons dilué périodiquement dans un milieu neuf la suspension de bactéries en croisement (figure 34).

Nous avons remarqué une légère reprise de l'incorporation de thymine tritiée chaque fois que l'opération de dilution a été faite brutalement et qu'il y a eu rupture des couples conjuguants. L'inhibition de la synthèse de DNA chez les bactéries Hfr conjugantes semble donc dépendre du taux d'appariement entre bactéries donatrices et réceptrices.

β) Le blocage de la réplication végétative chez les bactéries Hfr conjugantes dépend du taux d'appariement des cellules.

Nous avons mesuré l'inhibition de la réplication chez des bactéries Hfr croisées avec un nombre variable de bactéries réceptrices.

Dans les croisements où le rapport bactéries donatrices/ bactéries réceptrices est de 1 à 4, l'inhibition de l'incorporation de thymine tritiée est très importante. Or, nous avons montré précédemment que pratiquement toutes les bactéries Hfr conjugent dans ces conditions.

L'inhibition n'est plus observée dans les croisements où le rapport est 1Hfr/1F⁻. Dans ce cas, nous pouvons estimer à 10% les bactéries Hfr conjugantes puisque 10% des bactéries réceptrices d'une population sont compétentes dans nos conditions.

(figure 35).

B) Absence d'inhibition de la réplication chez les bactéries donatrices F-lac⁺ croisées avec des bactéries réceptrices

Les conditions d'étude sont identiques à celles utilisées pour les bactéries Hfr. La seule différence vient de la bactérie donatrice qui possède l'épisome à l'état non intégré.

Aucune inhibition d'incorporation de thymine tritiée n'a été

observée dans un croisement entre bactéries donatrices F-lac⁺ et bactéries réceptrices alors que le taux de transfert de l'épisome F-lac⁺ a dépassé 100 % (figure 36).

Ceci correspond bien à l'hypothèse formulée. L'inhibition de réplication ne devrait intervenir que dans le cas où l'épisome est intégré dans le chromosome.

Remarque :

Nous avons vérifié que l'inhibition de réplication ne se produit jamais chez des bactéries réceptrices croisées avec des bactéries donatrices bien que cette expérience soit moins significative puisque les bactéries réceptrices sont croisées en excès par rapport aux bactéries donatrices pour avoir des taux de transfert élevés. On pouvait cependant espérer trouver un changement de pente de la courbe cinétique d'incorporation dans le cas d'une inhibition (figure 37, page). Le même résultat est obtenu, que la bactérie donatrice soit F-lac⁺ ou Hfr.

C) La division cellulaire des bactéries Hfr se bloque quand elles sont croisées avec des bactéries réceptrices.

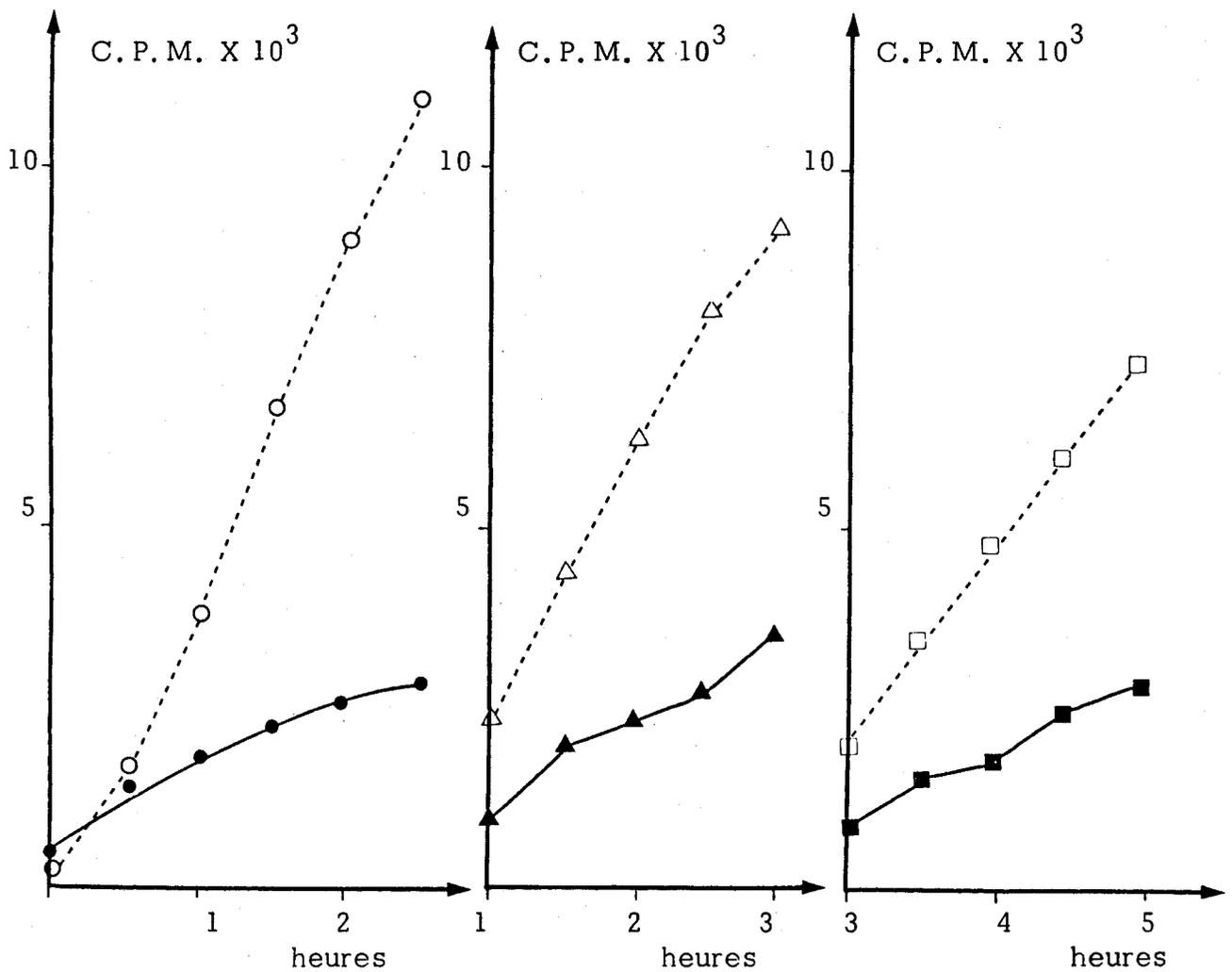
Le dénombrement des bactéries Hfr, croisées avec des bactéries réceptrices, indique que leur division cellulaire est bloquée. Aucune inhibition de la division cellulaire n'a été observée dans ces conditions chez les bactéries F-lac⁺ ni chez les bactéries réceptrices présentes dans ces croisements (figure 38).

Le blocage de la division cellulaire chez les bactéries Hfr peut être interprété comme la conséquence de l'arrêt de la réplication.

D) Comment se manifeste le signal de conjugaison ?

L'inhibition de la réplication du DNA chromosomique chez les bactéries Hfr se produit après activation du facteur sexuel F. Le signal de conjugaison ne peut être l'effecteur commun de l'activation du réplicon F et de l'inhibition du réplicon bactérien car l'on observerait dans ce cas une inhibition chez les bactéries F-lac⁺ croisées avec des bactéries réceptrices.

Figure 34 : Persistence du blocage de la réplication chez des bactéries Hfr conjugantes après dilution de l'échantillon de croisement



Cinétique d'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries Hfr thy A croisées avec des bactéries réceptrices BU^R ou incubées dans les mêmes conditions en présence des bactéries Hfr K 10 BU^R : MK 7

- bactéries MK 1 croisées avec les bactéries réceptrices MK 14
- bactéries MK 1 mises en présence des bactéries donatrices MK 7

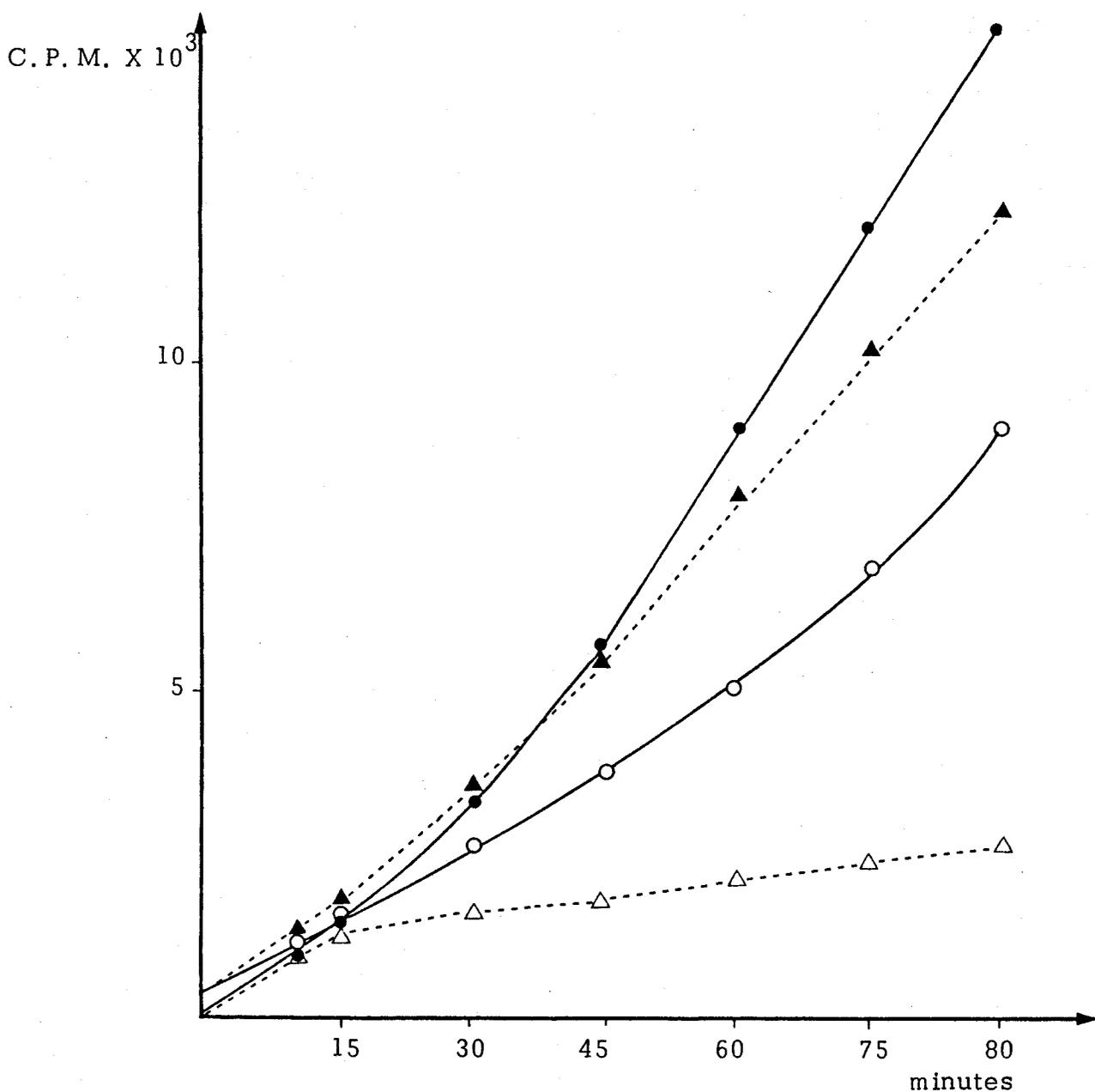
Après une heure d'incubation, une fraction de chaque suspension bactérienne a été diluée au 1/2 dans un milieu neuf contenant de la thymine tritiée et incubée deux heures.

- ▲— bactéries MK 1 croisées avec les bactéries réceptrices MK 14
- △— bactéries MK 1 mises en présence des bactéries donatrices MK 7

Après ces deux heures d'incubation, chaque fraction a été diluée au quart dans un milieu neuf contenant de la thymine tritiée et incubée 2 heures.

- bactéries MK 1 croisées avec les bactéries réceptrices MK 14
- bactéries MK 1 mises en présence des bactéries donatrices MK 7

Figure 35 : L'inhibition de la répllication observée dans un croisement entre bactéries donatrices et réceptrices dépend de leur proportion



Cinétique d'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries MK 1 mises en présence des bactéries Hfr MK 7 dans les proportions :

—●— $\frac{1 \text{ MK } 1}{1 \text{ MK } 7}$

—○— $\frac{1 \text{ MK } 1}{4 \text{ MK } 7}$

ou croisées avec des bactéries réceptrices MK 14 dans les mêmes proportions :

—▲— $\frac{1 \text{ MK } 1}{1 \text{ MK } 14}$

—△— $\frac{1 \text{ MK } 1}{4 \text{ MK } 14}$

Les suspensions de bactéries mélangées dans le rapport 1/1 sont diluées 2, 5 fois pour avoir dans tous les échantillons des quantités équivalentes de bactéries thy A qui incorporent la thymine tritiée.

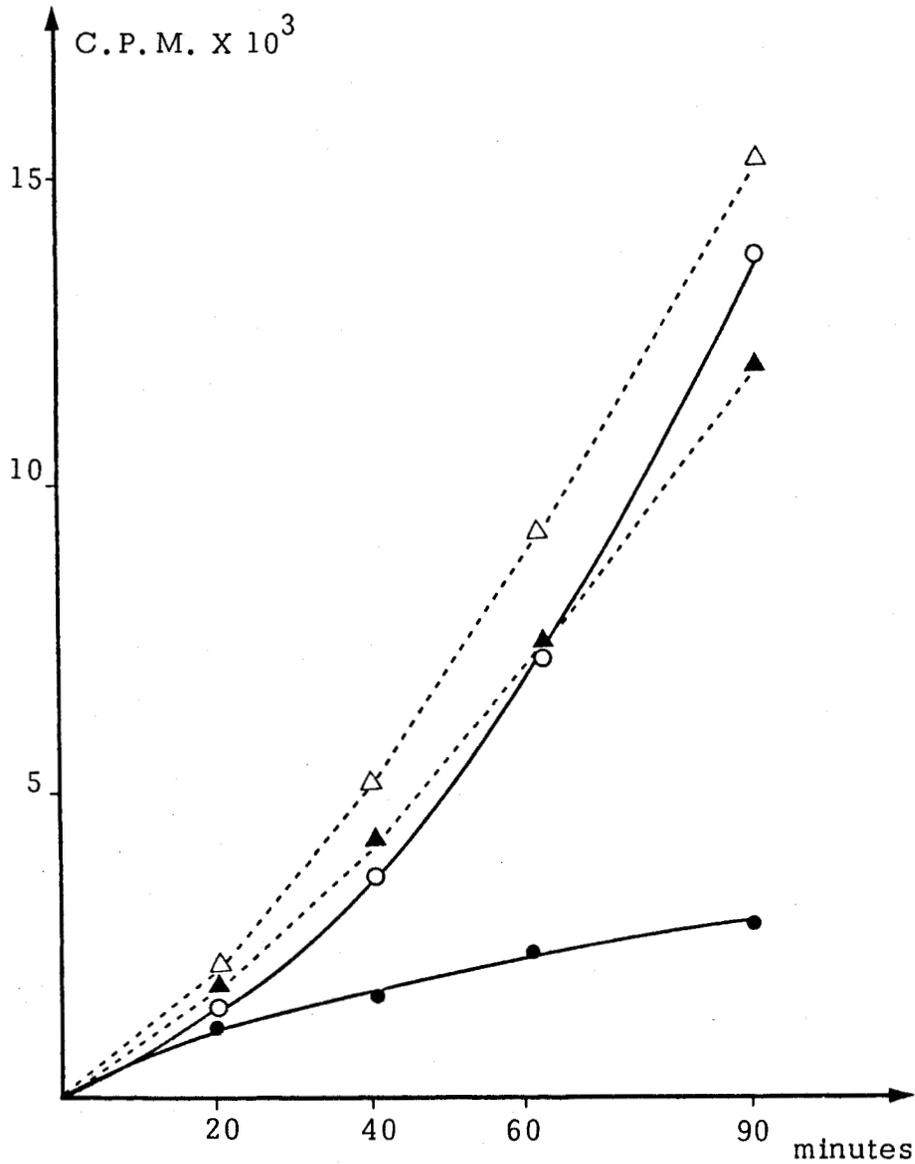


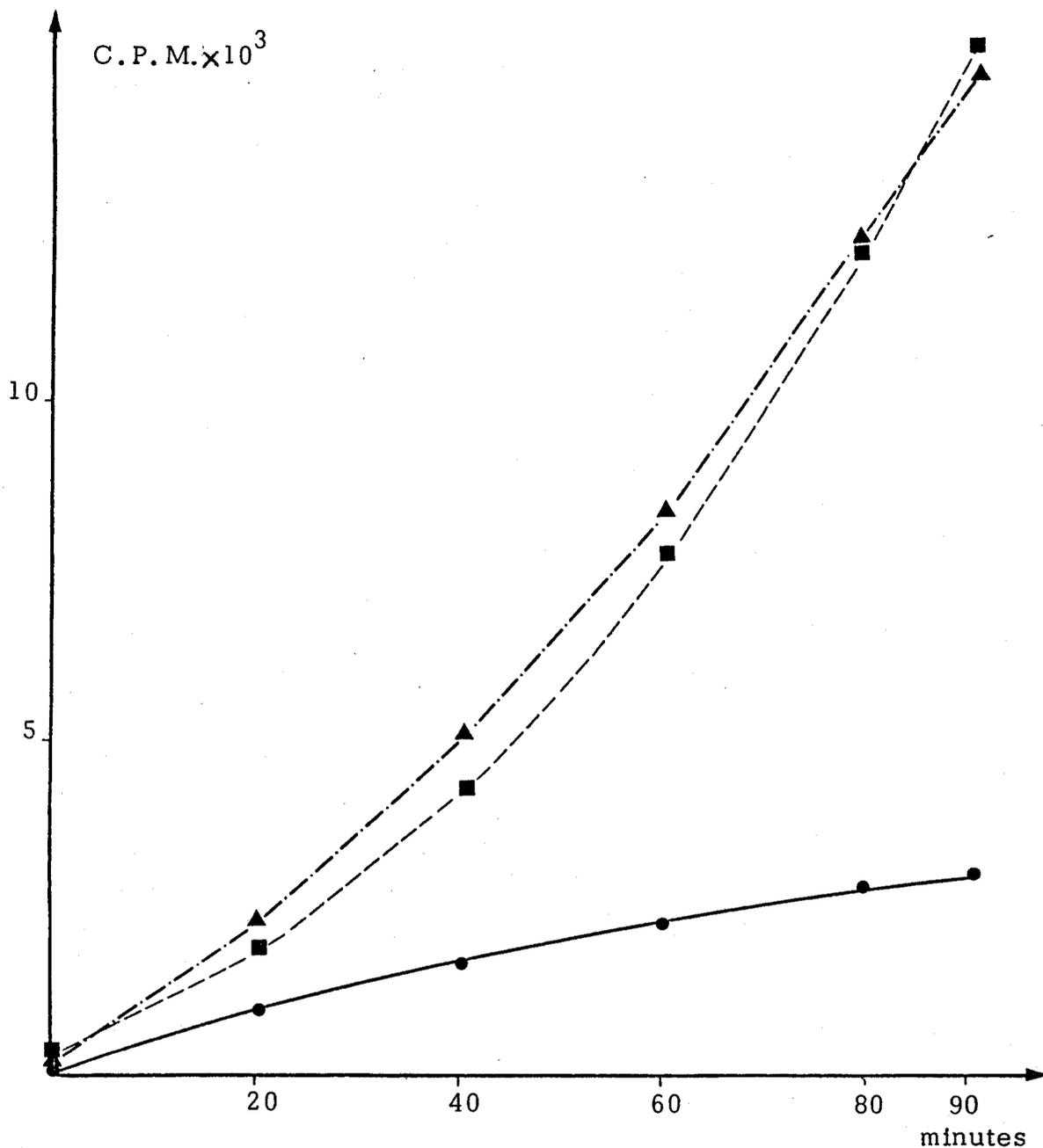
Figure 36 : Absence d'inhibition de la réplication chez des bactéries F' croisées avec des bactéries réceptrices

Comparaison des cinétiques d'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries donatrices Hfr H ou F' thy A incubées seules ou croisées avec des bactéries réceptrices BU^R.

- bactéries MK 1 croisées avec des bactéries réceptrices MK 14
- bactéries MK 1 incubées seules
- ▲— bactéries MK 13 F-lac⁺ croisées avec des bactéries réceptrices MK 14
- △— bactéries MK 13 F-lac⁺ incubées seules



Figure 37 : Absence de blocage de la réplication chez des bactéries réceptrices croisées avec des bactéries donatrices



Cinétique d'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries :

- MK 1 croisées avec des bactéries réceptrices MK 14
- ▲ MK 13 mises en présence des bactéries MK 14
- MK 13 croisées avec des bactéries donatrices MK 18 F-lac⁺

Les bactéries réceptrices étant 4 fois plus nombreuses que les bactéries donatrices, cet échantillon de croisement a été dilué au quart à 10 min du début de croisement pour obtenir un nombre équivalent de bactéries qui incorporent la thymine tritiée dans les 3 échantillons. 4 μ Ci/ml de thymine tritiée ont été ajoutées au temps zéro des mélanges bactériens sauf dans le cas du 3^{ème} croisement où elles ont été ajoutées dans l'échantillon au moment de la dilution.

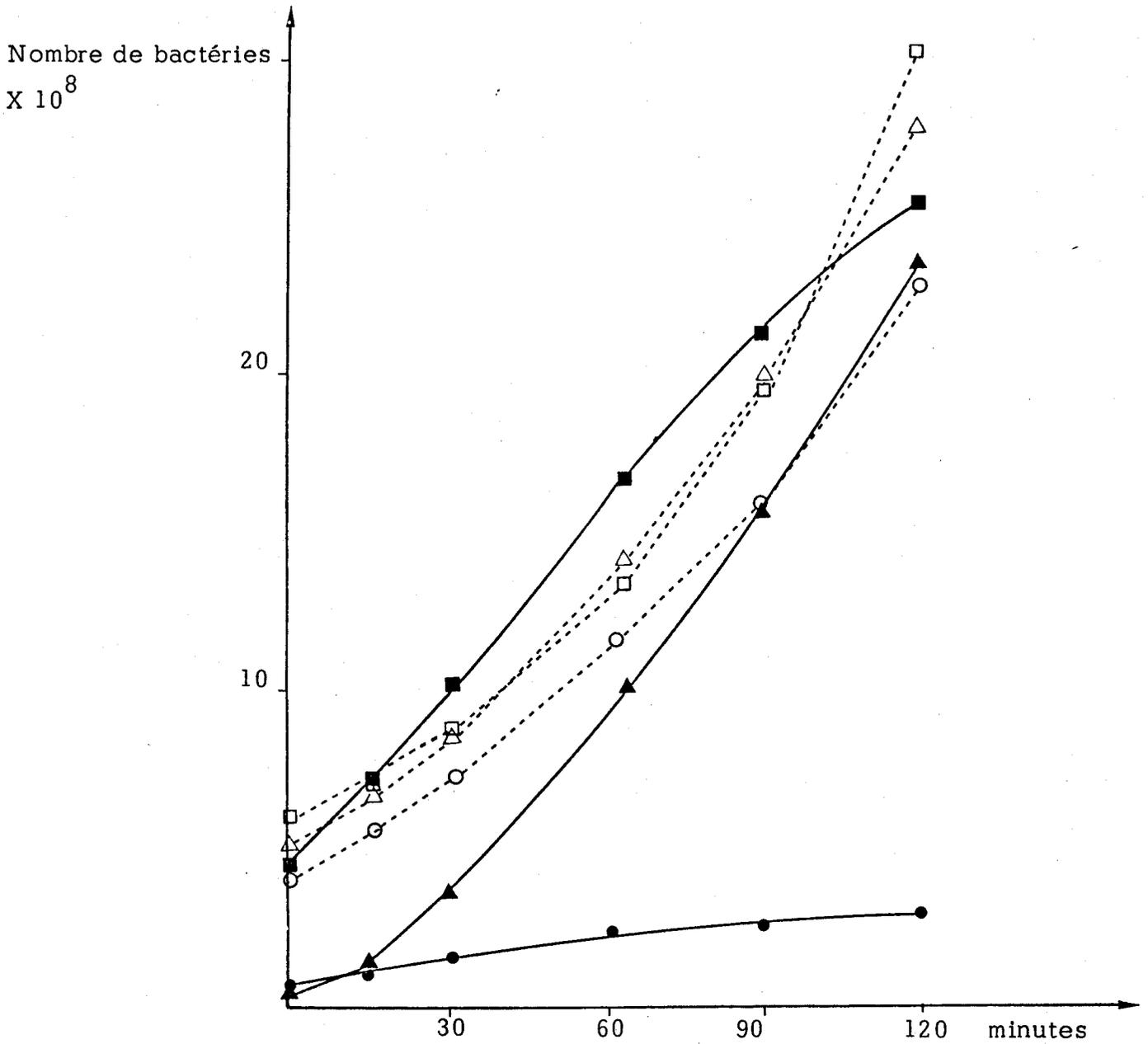


Figure 38 : Blocage de la division cellulaire chez des bactéries Hfr croisées avec des bactéries réceptrices

Dénombrement des bactéries donatrices MK 1 incubées seules (---o---) ou croisées avec les bactéries réceptrices MK 20 (—●—)

Dénombrement des bactéries 200 PS F-lac⁺ incubées seules (---Δ---) ou croisées avec les bactéries réceptrices MK 20 (—▲—)

Dénombrement des bactéries réceptrices MK 20 incubées seules (---□---) ou croisées avec les bactéries donatrices MK 1 (—■—)



Nous avons utilisé l'inhibition de la réplication chez les bactéries Hfr conjugantes pour mettre en évidence le mode d'action du signal de conjugaison.

1) Le signal de conjugaison n'est pas un produit soluble diffusible

Les bactéries donatrices Hfr, incubées dans des surnageants de cultures de bactéries réceptrices en phase exponentielle de croissance ou dans des surnageants provenant de croisements entre bactéries réceptrices et donatrices, n'ont jamais présenté d'inhibition de la réplication végétative.

(figure 39).

Le signal de conjugaison ne semble donc pas agir sous une forme diffusible. Il serait plutôt transmis au niveau du contact membranaire.

2) La transmission du signal de conjugaison dépend d'un processus actif

Les bactéries réceptrices chez lesquelles le DNA a été substitué par le BUdR et fortement dégradé par irradiation à 313 nm ne provoquent plus d'inhibition de la réplication chez les bactéries Hfr croisées avec elles.

(figure 40).

Aucun transfert de DNA, mesuré par l'induction de la β galactosidase chez les zygotes ou la recombinaison génétique, n'a été déterminé dans ces conditions.

Le même résultat a été obtenu avec des bactéries réceptrices Str^S traitées par la streptomycine. Elles se trouvent cependant au stade zéro de la réplication après action de l'antibiotique, donc en état de compétence pour la conjugaison.

Le signal de conjugaison semblerait dépendre d'un processus actif qui nécessite une synthèse protéique.

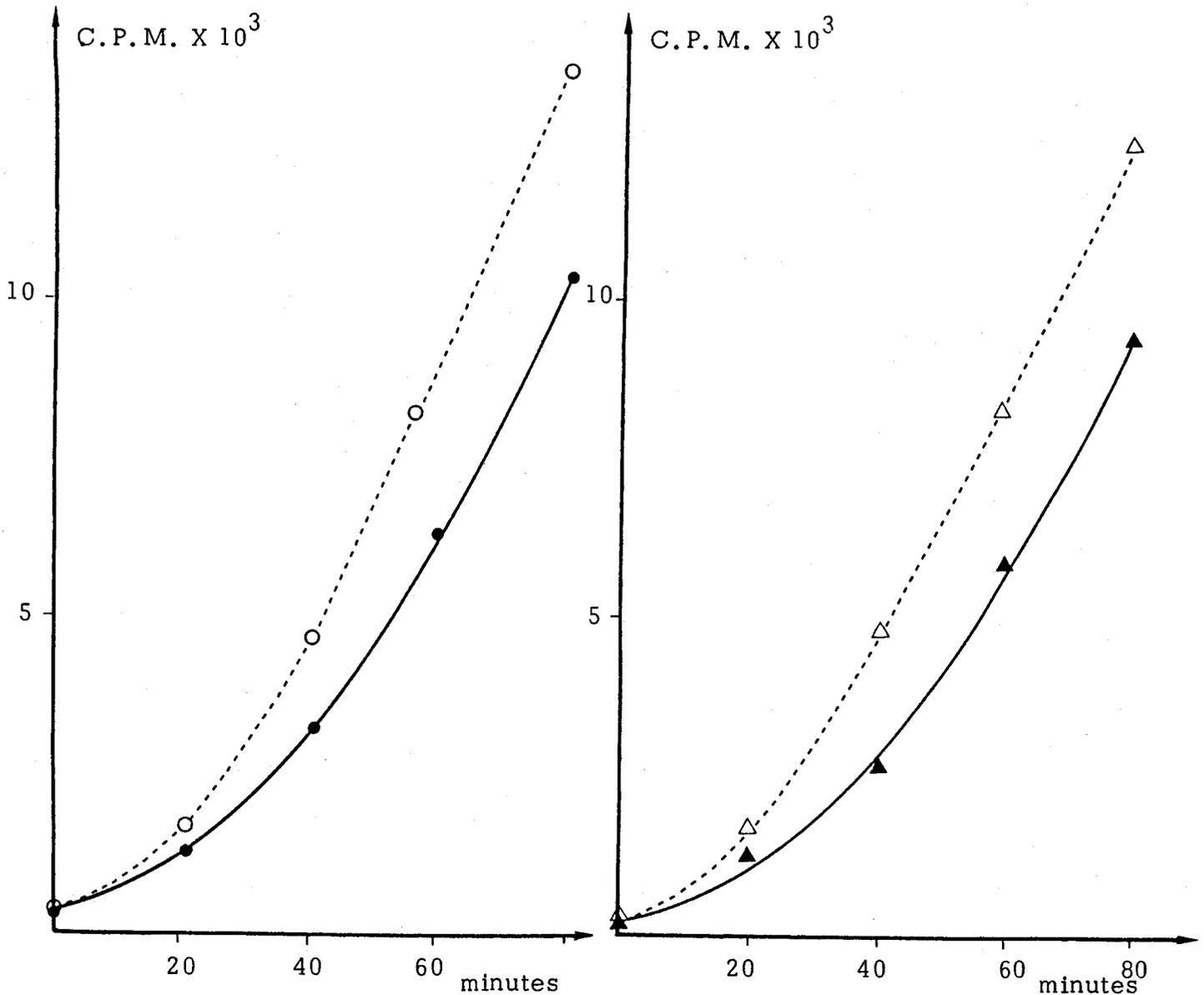


Figure 39 : Incorporation de thymine tritiée par des bactéries Hfr H incubées dans des surnageants provenant de croisements entre bactéries donatrices et réceptrices

Cinétique d'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries Hfr H thy A str A

- \triangle — incubées dans un milieu neuf contenant 250 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine et 4 $\mu\text{Ci/ml}$ de thymine tritiée.
- \blacktriangle — incubées dans un surnageant obtenu par filtration d'un échantillon de croisement entre bactéries donatrices et réceptrices sensibles à la streptomycine, additionné de 250 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine et 4 $\mu\text{Ci/ml}$ de thymine tritiée. (Le surnageant traité par la streptomycine ne donne pas d'incorporation de thymine tritiée).

La même expérience a été réalisée avec des bactéries réceptrices thy A : MK 13

- \circ — incubées dans une fraction du milieu neuf précédent
- \bullet — incubées dans une fraction du surnageant précédent



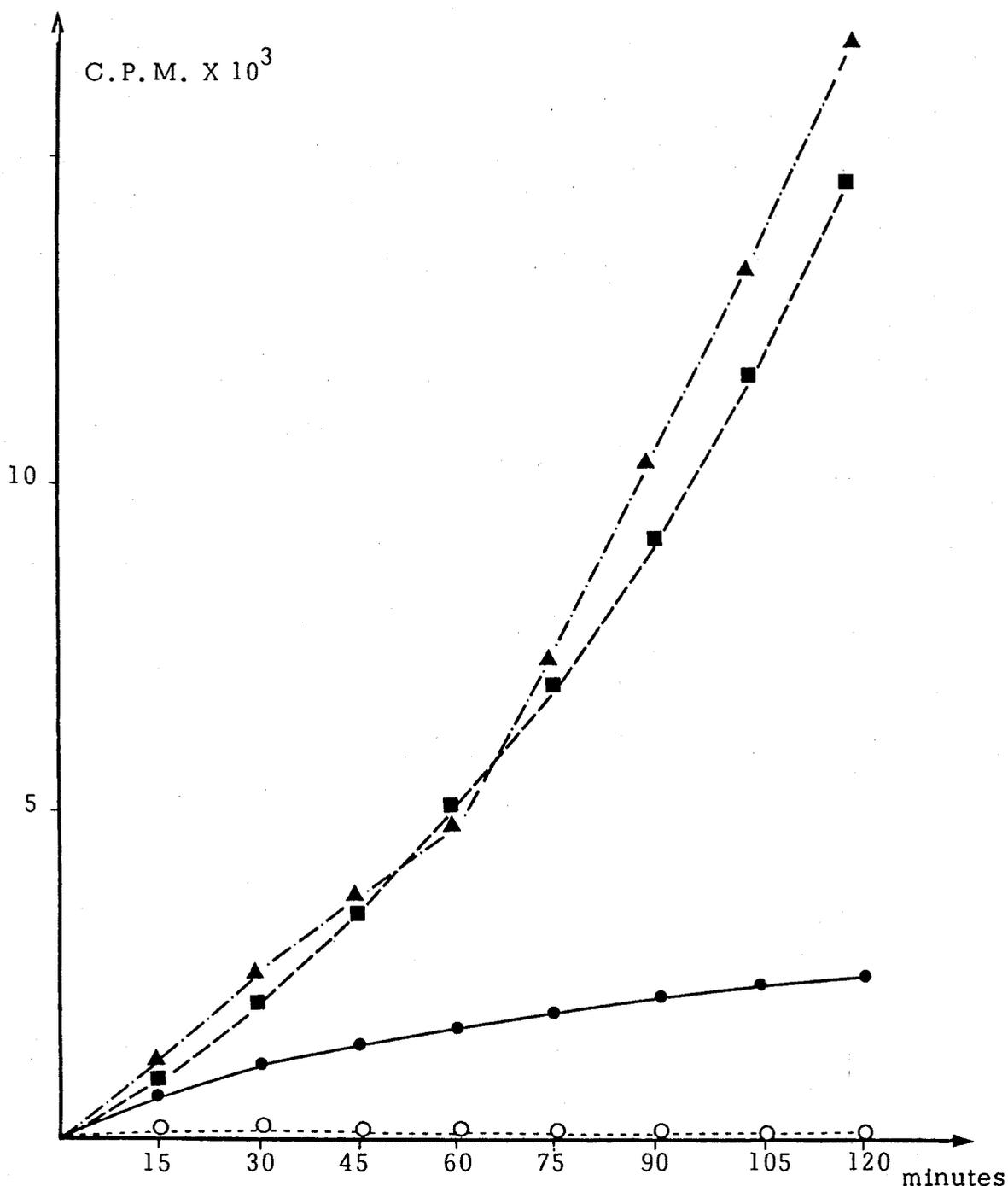


Figure 40 : Absence d'inhibition de la répllication chez des bactéries Hfr H croisées avec des bactéries réceptrices tuées

Comparaison des cinétiques d'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries Hfr H thy A incubées seules ou croisées avec des bactéries réceptrices en phase exponentielle de croissance ou tuées. Les conditions expérimentales sont celles de la figure 31 page

- bactéries MK 1 croisées avec des bactéries réceptrices MK 14
- ▲— bactéries MK 1 croisées avec des bactéries réceptrices MK 13 ayant été cultivées 2 heures dans le milieu de Lennox contenant 2 µg/ml de BUdR et irradiées à 313 nm (survie 0,1 %)
- bactéries MK 1 incubées seules
- incorporation de thymine tritiées par des bactéries MK 13 provenant de l'échantillon de culture en BUdR et irradiées à 313 nm

E) Inhibition de la réplication chez des bactéries Hfr croisées avec d'autres bactéries donatrices.

Quoique le phénomène soit moins prononcé, nous avons observé une inhibition de la réplication chez des bactéries Hfr mises en présence d'autres bactéries donatrices (figure 41, page). Ce phénomène n'est pas un artéfact dû à l'appauvrissement du milieu. Il est reproductible et continue à se produire lorsque les bactéries Hfr ont été resuspendues dans un milieu neuf (figure 41).

L'inhibition est deux à trois fois inférieure à celle observée dans des croisements entre bactéries donatrices et bactéries réceptrices et n'est pas observé chez les bactéries F-lac⁺ ni chez les bactéries réceptrices croisées entre elles. (figure 37, page).

Cela signifie que le phénomène d'inhibition de la réplication ne se produit que lorsque des structures complémentaires mâles et femelles sont en contact. Or les structures mâles des bactéries donatrices sont des structures surajoutées aux structures femelles toujours existantes. Il est possible en effet d'obtenir temporairement des phénocopies F⁻ à partir de bactéries donatrices en éliminant mécaniquement les structures mâles externes (144) (180) ou en inhibant leur expression (43) (16).

Le fait de trouver sur une bactérie donatrice les deux types de structure permet d'expliquer l'inhibition de réplication par le contact possible de structures complémentaires entre deux bactéries donatrices.

IV - Le blocage de la réplication végétative chez les bactéries Hfr conjugantes est provoqué par la rencontre des fourches de réplication végétative avec celles de transfert.

Nous venons de déterminer que le croisement entre bactéries donatrices et réceptrices entraîne chez les bactéries donatrices Hfr un blocage de la réplication végétative. Une synthèse résiduelle de DNA persiste cependant pendant le temps d'incubation des bactéries en croisement.

Nous avons envisagée l'alternative suivante :

- La réplication végétative devait être bloquée au stade zéro, afin de laisser le transfert se dérouler sans l'interférence entre fourches répliquatives,

- ou au niveau des collisions entre fourches répliquatives de transfert et fourches répliquatives végétatives.

Dans le dernier cas, les mises en route des cycles de réplication sont possibles et devraient être bloquées lors de croisements traités par 250 ug/ml de streptomycine. Une diminution de la synthèse résiduelle de DNA devrait en résulter. Nous avons vu en effet que la streptomycine permet le déroulement du transfert de DNA et de la réplication végétative chez les bactéries Hfr mais inhibe la mise en route des nouveaux cycles de réplication.

Dans le cas où le blocage de la réplication se situerait au stade zéro, aucune diminution de la synthèse résiduelle de DNA ne devrait se produire lors de croisements traités par la streptomycine.

Une diminution de la synthèse résiduelle de DNA est donc attendue dans le cas d'un blocage de la réplication provoquée par la rencontre des fourches répliquatives et aucune modification dans le cas d'une réplication maintenue au stade zéro.

Nous avons mesuré la synthèse de DNA par l'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries donatrices thy A croisées avec des bactéries réceptrices BU^R dans des milieux contenant 250 ug/ml de streptomycine, ou n'en contenant pas.

La synthèse résiduelle de DNA mesurée lors du croisement effectué en présence de streptomycine a été comparée à celle observée dans l'échantillon de croisement non traité.

Une diminution de la synthèse résiduelle de DNA, qui doit correspondre au blocage des mises en route de nouveaux cycles de réplication chez les bactéries Hfr est observée dans l'échantillon de croisement traité par la streptomycine. (figure 42).

La faible synthèse qui persiste en présence de streptomycine est compatible avec la resynthèse dans la bactérie Hfr du brin transféré.

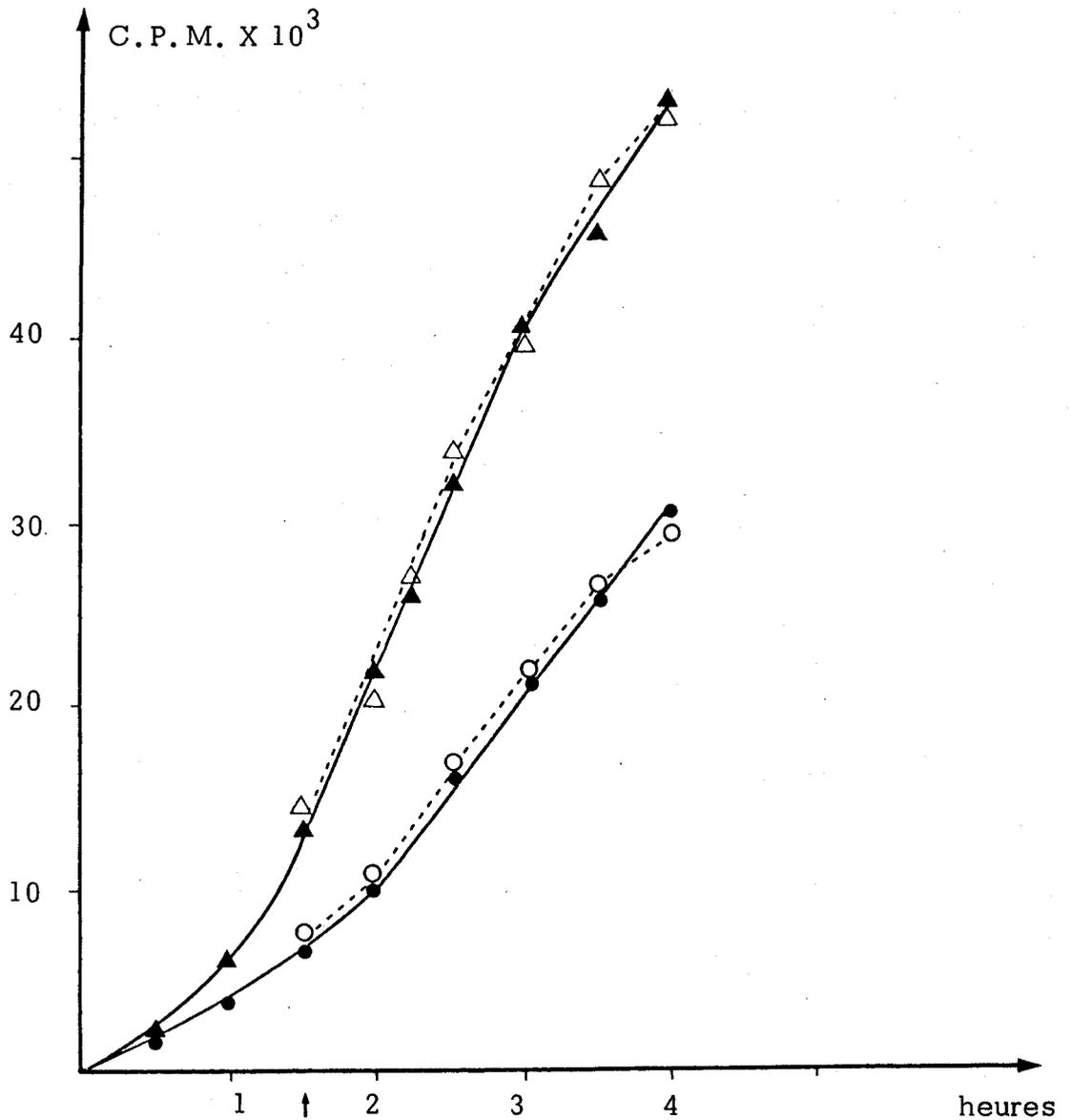


Figure 41 : Inhibition de la répllication chez des bactéries Hfr croisées avec des bactéries donatrices; persistance de l'inhibition après changement de milieu.

Cinétique d'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries Hfr H thy A

- mises en présence des bactéries Hfr MK 7.
- ▲— incubées seules en quantité équivalente à celle de l'échantillon précédent.

Des aliquots de bactéries marquées ont été prélevés dans les 2 échantillons après 1 h 30 d'incubation. Les bactéries ont été centrifugées et suspendues dans un milieu neuf contenant de la thymine tritiée.

- bactéries Hfr H thy A mises en présence des bactéries MK 7.
- △— bactéries Hfr H thy A incubées seules.



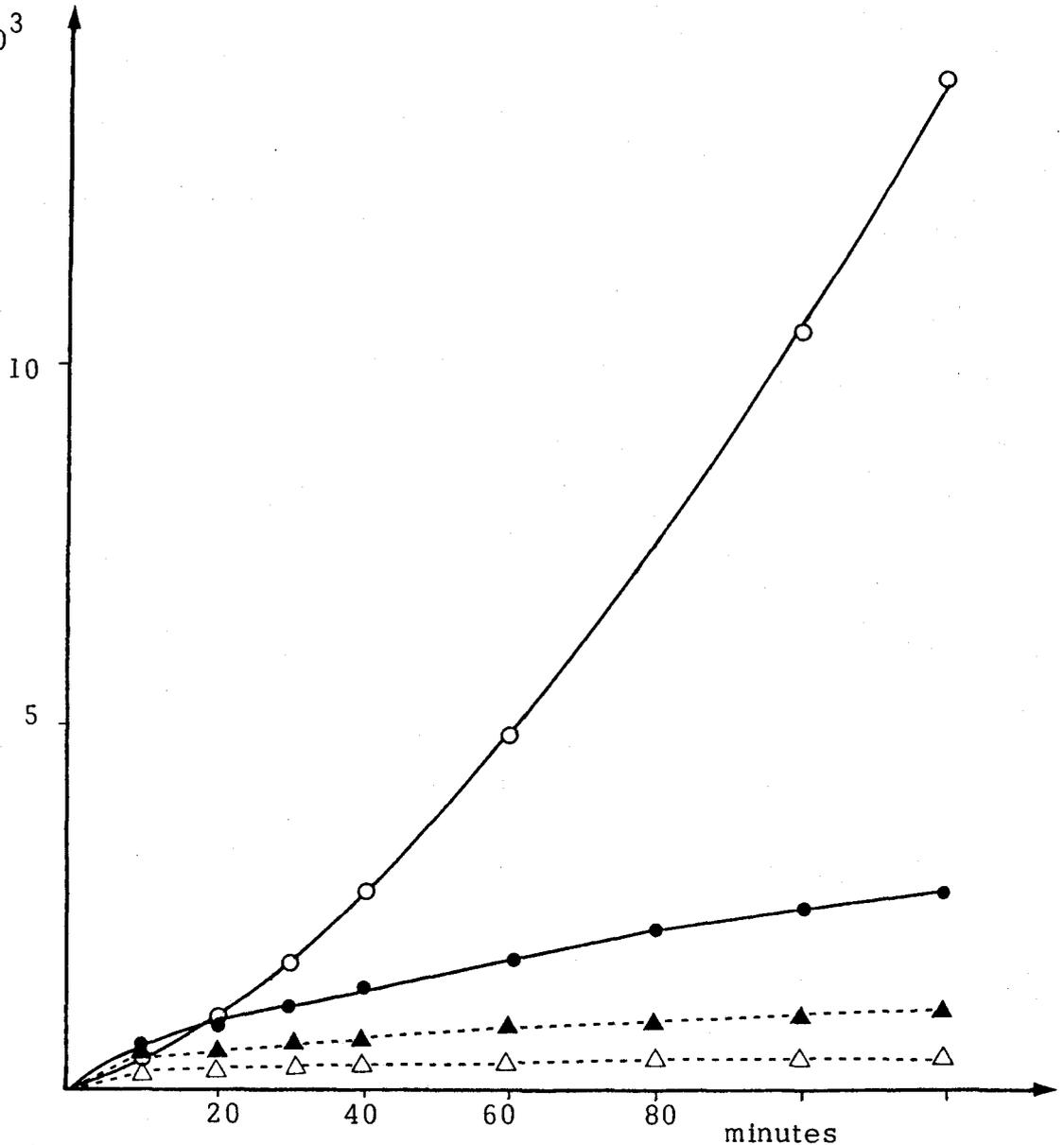
C.P.M. X 10³

Figure 42 : Cinétique d'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries Hfr H thy A Str^S croisées, avec des bactéries réceptrices BU^R str A dans un milieu contenant de la streptomycine.

Les bactéries MK 1 ont été croisées avec les bactéries réceptrices MK 14 dans le milieu de Lennox additionné de streptomycine à 10 min du début du croisement (—▲—) ou dans le même milieu sans streptomycine. —●—

Cinétique d'incorporation de thymine tritiée chez les bactéries MK 1 incubées seules en quantité égale à celle du croisement dans le milieu de Lennox contenant de la streptomycine —△— ou n'en contenant pas (—○—)

La thymine tritiée a été ajoutée à 10 min du début d'incubation des 4 échantillons ce qui représente le temps zéro des cinétiques.

A partir des résultats notés sur la figure 42, nous avons transcrit le nombre de C.P.M. obtenus après 120 mn d'incorporation de thymine tritiée dans les échantillons, traités ou non par la streptomycine, de bactéries Hfr, incubées seules ou croisées avec des bactéries réceptrices.

	C.P.M. après 120 mn d'incorporation de thymine tritiée
MK 1 incubé seul	14 000
MK 1 incubé dans un milieu contenant de la streptomycine	400
croisement MK 1 X MK 14	2 700
croisement MK 1 X MK 14 en milieu contenant de la streptomycine	1 100

3) Discussion des résultats obtenus

Nous avons montré précédemment que toutes les bactéries Hfr ont la capacité de conjuguer dans nos conditions expérimentales et que les bactéries Hfr détachées des couples peuvent de nouveau s'apparier aux bactéries réceptrices compétentes. Cela est en accord avec le fait que l'inhibition de la réplication dure plus longtemps que le transfert complet du chromosome.

L'incorporation de thymine tritiée par les bactéries Hfr, mesurée dans le croisement traité par la streptomycine, correspond à 40 % de celle qui est mesurée dans le même croisement non traité par la streptomycine.

Cette diminution de 60 pourcent paraît donc beaucoup trop importante pour ne correspondre qu'à la fraction de bactéries Hfr libres qui commencent un cycle de réplication. Elle semble plutôt correspondre à

l'ensemble des bactéries Hfr conjugantes chez lesquelles la mise en route de la réplication a été bloquée par la streptomycine.

L'inhibition de la réplication chez une bactérie Hfr conjugante n'est donc pas due à une régulation qui maintiendrait la réplication au stade zéro après activation du réplicon F. Le blocage de la réplication semble plus probablement provoqué par la rencontre des fourches de réplication végétative et de transfert et donc par l'impossibilité physique qu'elles ont de poursuivre leur mouvement.

Le fait que l'inhibition de la réplication se fasse progressivement est sans doute dû à l'étalement dans le temps des collisions des fourches de réplication puisque les bactéries Hfr utilisées ne sont pas synchronisées.

4) Conséquences de l'interaction entre fourches de réplication végétative et fourches répliquatives de transfert chez les bactéries Hfr croisées avec des bactéries réceptrices.

Le blocage des fourches répliquatives pourrait empêcher le déroulement du transfert par encombrement stérique ou absence de réplication de transfert et être ainsi à l'origine de la séparation des couples qui se produit dans le temps. Le gradient de transmission des caractères génétiques pourrait s'expliquer de cette façon.

L'interférence entre fourches de réplication qui se produit chez les bactéries Hfr conjugantes n'est pas forcément en désaccord avec les résultats de Fulton (68) qui a mis en évidence le transfert complet du chromosome. Le transfert de DNA pourrait se dérouler sans perturbation chez les bactéries Hfr qui ont déclenché le transfert de DNA après le passage de la fourche de réplication végétative.

V - Conclusion

1) Existence d'un signal de conjugaison (113)

L'analyse du transfert de DNA qui reprend après interruption d'un croisement a permis de mettre en évidence la transmission d'un signal de conjugaison entre bactéries réceptrices et donatrices appariées, qui a pour conséquence l'activation du réplicon F.

La transmission du signal de conjugaison semblerait dépendre du déroulement dans la bactérie réceptrice d'un processus qui nécessiterait une synthèse protéique.

2) La réplication végétative et la division cellulaire se bloquent chez les bactéries Hfr conjugantes (77) (112).

a) Contacts cellulaires entre bactéries donatrices et réceptrices

Le contact entre bactéries de sexe opposé entraîne deux réponses physiologiques distinctes chez les bactéries donatrices suivant que l'épisome sexuel est intégré au chromosome bactérien (Hfr) ou autonome dans la cellule (F' ou F^+).

* cas de la cellule Hfr

Le contact cellulaire se traduit par le fonctionnement du réplicon épisomique, le blocage du système de réplication végétative et l'arrêt de la division cellulaire.

* cas de la cellule F'

Le contact cellulaire se traduit cette fois par le fonctionnement du réplicon épisomique sans blocage du réplicon chromosomique ni arrêt de la division cellulaire.

Le blocage de la réplication et de la division cellulaire a été confirmé peu après par d'autres auteurs (162, 163) qui ont analysé en gradient de densité le DNA synthétisé chez des bactéries donatrices en phase exponentielle de croissance, ou croisées avec des bactéries réceptrices. Les bactéries donatrices avaient le DNA préalablement marqué sur les deux brins par des isotopes lourds.

Ils ont déterminé l'apparition prématurée de chaînes doublement légères chez les bactéries Hfr conjugantes. Ils ont ainsi montré que les bactéries Hfr croisées avec des bactéries réceptrices commencent de nouveaux cycles de réplication et postulé qu'il s'agit de cycle de réplication de transfert.

En comparant les différences de densité en gradient de CsCl du DNA provenant de bactéries Hfr cultivées seules ou croisées avec des bactéries réceptrices, ils ont également montré que la réplication végétative était bloquée chez les bactéries Hfr conjugantes. Ils ont cependant obtenu des résultats différents suivant le type d'Hfr utilisé, Cavalli ou Hayes.

Chez les bactéries Hfr Cavalli, la réplication ne semble bloquée au cours de la conjugaison qu'après terminaison du cycle de la réplication végétative en cours.

Chez les bactéries Hfr H, elle semble bloquée immédiatement mais les résultats sont moins nets, d'ûs sans doute selon les auteurs à des séparations prématurées des couples conjuguants.

Les auteurs ont simplement mis en évidence le phénomène d'inhibition de la réplication végétative sans tirer de conclusions ni expliquer ou donner une hypothèse concernant les causes de cette inhibition de la réplication chez les bactéries Hfr conjuguantes.

Nous avons par contre montré que l'inhibition de la réplication chez les bactéries Hfr conjuguantes s'observe aussi bien chez les bactéries Hfr H que chez les bactéries Hfr K 10 qui possèdent une origine et un sens d'injection du chromosome différent. Le phénomène semble donc indépendant du type d'Hfr utilisé.

Nos résultats suggèrent que le blocage de la réplication est probablement dû à la collision des fourches de réplication végétative et de transfert, et donc de l'impossibilité physique qu'elles ont de poursuivre leur mouvement. Nous avons postulé que ce phénomène pouvait être à l'origine de la séparation prématurée des couples conjuguants et donc du gradient de transmission des gènes transférés aux bactéries réceptrices.

b) Contacts cellulaires entre bactéries donatrices

L'inhibition de la réplication est également observée chez les bactéries Hfr croisées avec des bactéries donatrices alors qu'aucune inhibition n'intervient chez les bactéries F-lac⁺ ni chez les bactéries réceptrices.

Il est possible que dans les couples bactéries Hfr-bactéries donatrices, les structures mâles des bactéries Hfr soient en contact avec les structures complémentaires femelles des bactéries donatrices partenaires. Le réplicon F est sans doute activé chez les bactéries F-lac⁺ comme chez les bactéries Hfr. La conséquence de l'activation du réplicon F est différente : la réplication se bloque chez les bactéries Hfr et continue chez les bactéries F-lac⁺.

L'inhibition est moins importante que dans le cas du couple bactérie donatrice-bactérie réceptrice. Ceci peut être expliqué par le fait que les structures mâles rendent moins accessibles les sites femelles sous jacents empêchant un contact efficace entre les bactéries donatrices.

Il est possible que le phénomène observé soit un processus de conjugaison abortive. Une bactérie donatrice au stade zéro de la réplication serait dans un état de compétence comparable aux bactéries réceptrices et activerait par contact membranaire le réplicon F de la bactérie donatrice partenaire.

La réplication de transfert serait déclenchée à partir du facteur F mais le transfert de DNA serait rendu impossible par le système d'exclusion de surface qui fonctionne entre deux bactéries donatrices (134)

3) Interprétation des réplifications particulières observées dans d'autres laboratoires chez les bactéries Hfr synchronisées (34, 54, 137)

Nagata a montré en 1963, qu'après synchronisation d'une population bactérienne Hfr Cavalli, une réplication commençait au niveau du facteur F (137).

Très récemment l'équipe de Caro a montré qu'après synchronisation d'une population bactérienne Hfr on observait deux réplifications, l'une commencée au niveau du facteur F, l'autre à l'origine du chromosome bactérien (34).

Dans les deux travaux, le phénomène de double réplication n'est pas observé quand la population bactérienne Hfr n'est pas synchronisée.

Nous pensons que les auteurs ont observé le phénomène de conjugaison abortive que nous avons mis en évidence, dû à l'activation des réplicons F par contact entre les bactéries donatrices. Nous allons justifier cette interprétation par le raisonnement suivant qui tient compte de 2 de nos résultats.

- Le réplicon F est activé chez les bactéries donatrices en contact avec des bactéries réceptrices ou avec d'autres bactéries donatrices.

- La réplication végétative est bloquée chez les bactéries Hfr conjugantes par interaction entre les fourches de réplication végétatives et les fourches de réplication de transfert.

Deux réplifications seraient déclenchées au temps zéro du croisement, la réplication végétative au niveau de l'origine du chromosome et la réplication de transfert après activation du facteur F.

Chez l'Hfr Cavalli, le facteur F est intégré à environ 25 min de l'origine de réplication du chromosome ; les deux fourches de réplication végétative et de transfert pourront donc progresser sans se rencontrer pendant une période de temps inférieure à 25 mn.

Deux réplifications, l'une végétative l'autre de transfert, pourraient donc être mises en évidence pendant cette période.

Elles ne seraient pas observées avec des bactéries Hfr non synchronisée puisque les rencontres de fourches répliquatives se produiraient à tous les instants.

Puisque les contacts entre bactéries donatrices activent également le réplicon F, on devrait obtenir des résultats analogues en remplaçant les bactéries réceptrices compétentes par des bactéries donatrices au stade zéro de la réplication qui est le stade de compétence des bactéries réceptrices.

Or dans les expériences de Nagata (137) et Caro (34) les bactéries Hfr ont été synchronisées par carence en acides aminés. Elles sont donc toutes au stade zéro de la réplication dans un état correspondant à la compétence des bactéries réceptrices.

A la restitution des acides aminés les bactéries Hfr synchronisées, tout en commençant des cycles de réplication végétative, vont pouvoir entrer en contact chaque bactérie Hfr pourra activer le réplicon F de la bactérie donatrice partenaire. Deux réplifications devraient donc être observées chez les bactéries Hfr synchronisées, l'une commencée à l'origine du chromosome, l'autre à l'origine du facteur F.

Il semblerait bien que le phénomène de double réplication observé par Caro, corresponde au processus de conjugaison abortive sans transfert de DNA, que nous avons mentionné précédemment.

Il a été montré que le facteur F autonome se réplique de façon synchrone avec le chromosome (36) (38) (48). Il existe en moyenne une copie du facteur F par chromosome bactérien. Nous avons déterminé que l'état de compétence apparaît à la période de repos en réplication et qu'un "produit" semble synthétisé à ce stade.

Suivant la bactérie où il est synthétisé deux rôles peuvent être attribués à un tel "produit".

- synthétisé dans une bactérie réceptrice il servirait à la conjugaison en activant le réplicon F de la bactérie donatrice partenaire.
- synthétisé dans une bactérie F^+ il pourrait être responsable de la réplication synchrone du facteur F, soit par l'intermédiaire des contacts membranaires, soit par action interne dans le cytoplasme de la bactérie. Cela serait en accord avec les résultats de Collins et Pritchard (36) qui indiquent que la réplication du facteur sexuel F commence au moment où la réplication du chromosome de la bactérie F^+ se termine.

Il est cependant possible que le phénomène d'activation du réplicon F par les bactéries donatrices ne serve pas de régulation à la réplication du facteur sexuel F mais modifie au contraire la programmation de la réplication du facteur sexuel. Certains résultats (155) excluent en effet toute relation entre période de réplication du facteur sexuel F et cycle de réplication ou de division cellulaire de la bactérie F^+ .

REPRISE DE LA REPLICATION VEGETATIVE CHEZ LES BACTERIES DONATRICES ISSUES D'UN CROISEMENT AVEC DES BACTERIES RECEPTRICES

Les bactéries Hfr, issues d'un croisement avec des bactéries réceptrices, doivent passer d'une répliation de transfert unidirectionnelle σ à une répliation semi conservative bidirectionnelle θ .

Selon le moment où les bactéries Hfr ont été détachées des bactéries réceptrices, les fourches de répliation végétative peuvent être en progression ou au contraire bloquées par les fourches répliatives de transfert.

Nous avons essayé de déterminer si, après séparation des couples, les bactéries Hfr reprennent immédiatement la répliation végétative.

- à partir des fourches répliatives existantes,
- simultanément à partir de l'origine du chromosome et des fourches répliatives existantes,
- uniquement à partir de l'origine du chromosome en éliminant par un système de réparation les fourches de répliation végétative.

I - Reprise d'une répliation synchronisée chez les bactéries Hfr issues d'un croisement avec des bactéries réceptrices

1) Expérience

Nous avons mesuré l'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries Hfr H thy A str A croisées pendant 25 min avec des bactéries réceptrices BU^R Str^S, puis pendant 5 min après addition de 250 ug/ml de streptomycine avant d'être détachées des bactéries réceptrices par agitation mécanique et laissées incubées pendant 2 h. L'incorporation de thymine tritiée a également été mesurée chez les bactéries Hfr H thy A str A incubées seules et dans une fraction de l'échantillon de croisement qui n'a pas été traitée par la streptomycine ni soumise à l'agitation mécanique.

2) Résultats

La répliation végétative, qui s'était progressivement arrêtée chez les bactéries Hfr pendant les 30 premières minutes du croisement, a repris après un temps de latence, chez les bactéries Hfr détachées

des bactéries réceptrices. Elle s'effectue par périodes de synthèse de DNA entre-coupées de périodes de non synthèse. (figure 43).

Ce résultat n'est pas en faveur d'une synthèse de DNA commencée en même temps à l'origine du chromosome et à partir des fourches de réplication existantes.

La forme de la courbe de cinétique d'incorporation de thymine tritiée chez les bactéries Hfr exconjugantes correspondrait plutôt à une réplication synchronisée, donc à la reprise simultanée des cycles de réplication à l'origine du chromosome. Il est cependant possible que les paliers observés correspondent à des arrêts momentanés de la synthèse de DNA occasionnés par des phénomènes de réparation.

Cela implique dans les 2 cas que les fourches de réplication existantes soient éliminées par des processus de réparation qui peuvent être effectués par les fonctions S. O. S.

II - Induction des fonctions S. O. S. chez les bactéries Hfr issues d'un croisement avec des bactéries réceptrices

La séparation des couples conjuguants, s'accompagne de la rupture du brin de DNA transféré qui peut poser des problèmes de survie aux deux partenaires, si le brin de DNA n'est pas réparé. Les fourches répliquatives bloquées doivent être également éliminées pour qu'elles n'interfèrent pas avec le nouveau cycle de réplication qui a repris. Un système de réparation devrait donc être nécessaire dans ces conditions. Nous avons vu précédemment que les fonctions S. O. S. semblent être effectivement induites chez les bactéries donatrices et réceptrices provenant de leur croisement.

L'induction du prophage λ chez une bactérie lysogène, résulte de l'induction des fonctions S. O. S. Nous avons montré leur existence par l'induction du prophage λ chez des bactéries Hfr lysogènes provenant d'un croisement avec des bactéries réceptrices.

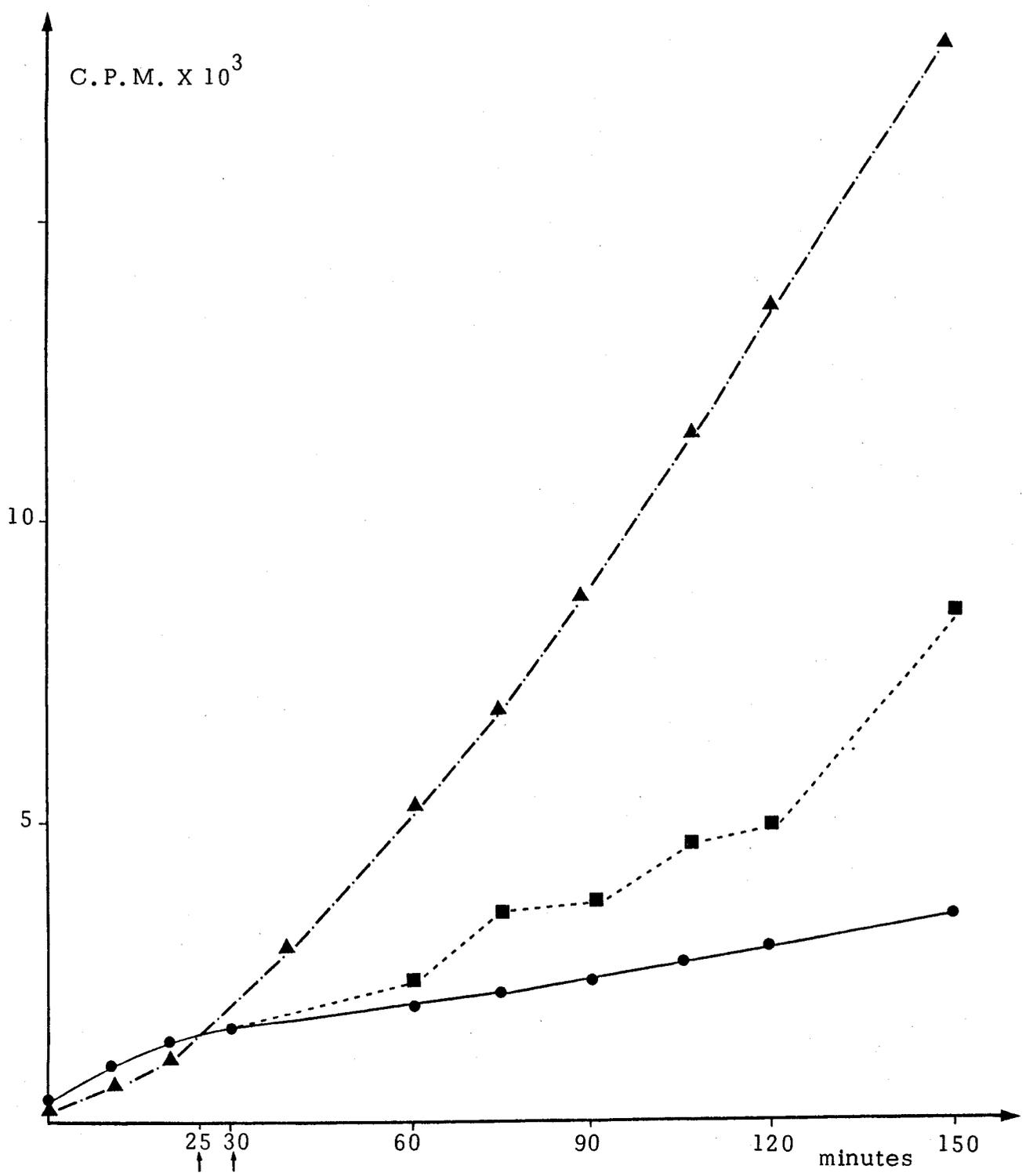


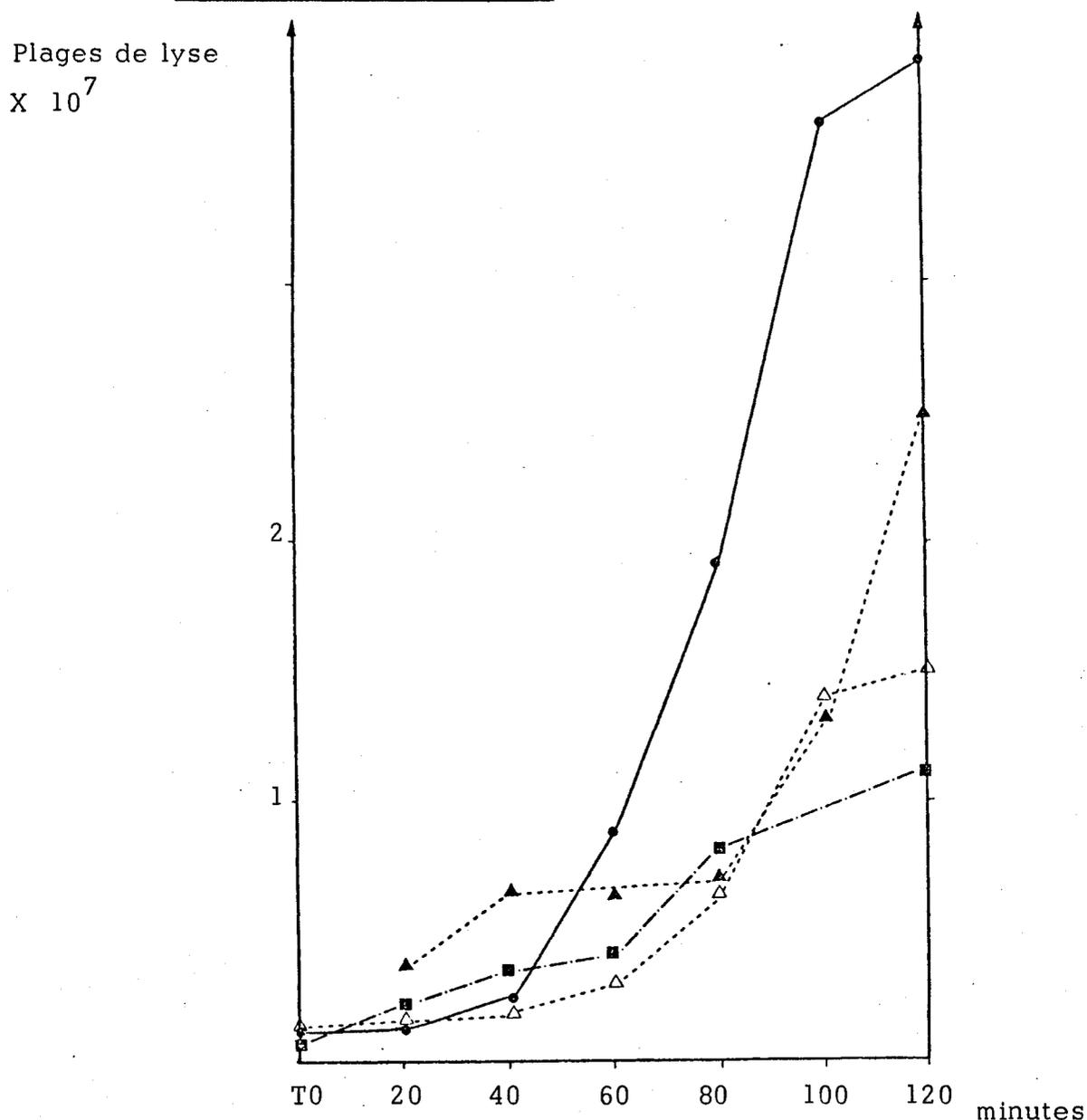
Figure 43 : Reprise de la répliation chez des bactéries Hfr issues de couples conjugants

Cinétique d'incorporation de thymine tritiée chez des bactéries donatrices MK 4 (thy A str A) croisées avec des bactéries réceptrices MK 18 Str^S (—●—) ou incubées seules en quantité équivalente à celle du croisement (—▲—)



L'incorporation de thymine tritiée par les bactéries MK 4 est continuée dans une fraction de l'échantillon de croisement prélevée à 25 min du début du croisement, traitée 5 min par 250 µg/ml de streptomycine avant d'être agité mécaniquement pendant 3 min (—■—)

Figure 44 : Induction du prophage λ chez des bactéries Hfr provenant d'un croisement interrompu



- Des bactéries Hfr K 10 λ^+ str A ont été croisées 15 min avec des bactéries réceptrices VL 232 λ^R Str^S dans le rapport 1/9, puis 5 min après addition de 250 ug/ml de streptomycine et séparées des bactéries réceptrices par une agitation mécanique de 3 min qui est le temps zéro de la cinétique d'induction du prophage λ .
- △— L'induction du prophage λ chez les bactéries Hfr conjugantes, a été mesurée dans une fraction de l'échantillon de croisement non traitée par la streptomycine ni soumise à l'agitation mécanique.
- ▲— L'induction zygotique du prophage λ a été mesurée dans la même fraction non traitée de l'échantillon de croisement.
- L'induction spontanée du prophage λ chez les bactéries Hfr lysogènes a été déterminée dans un échantillon de culture.

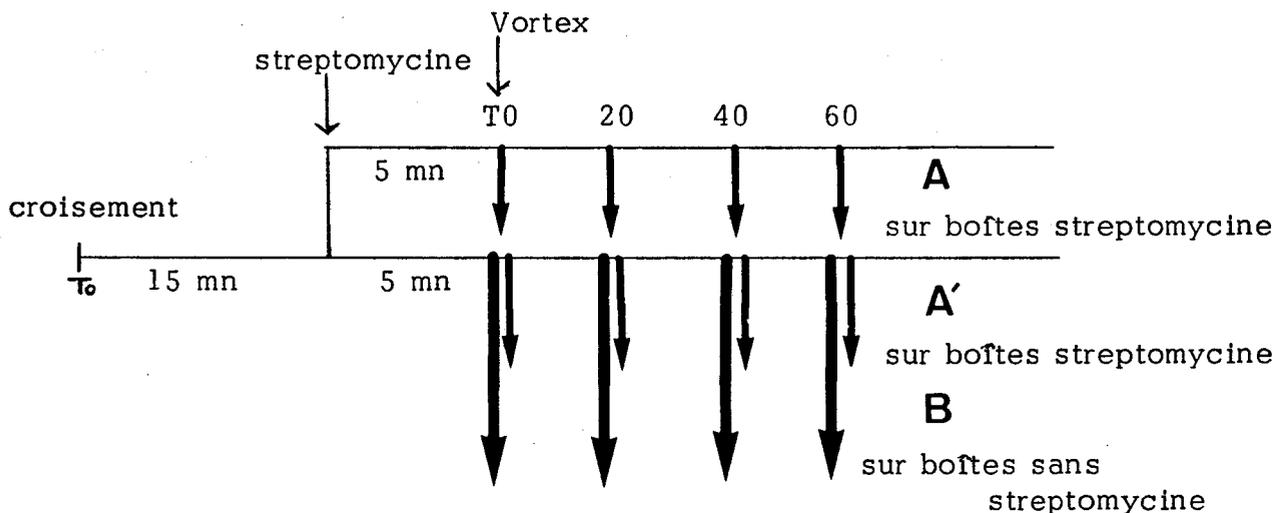
1) Expérience

Des bactéries Hfr K 10 λ^+ str A ont été croisées 15 mn avec des bactéries réceptrices λ^R Str^S dans le rapport 1/9, puis 5 mn en présence de 250 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine et séparées des bactéries réceptrices par une agitation de 3 mn au vortex qui est le temps zéro de la cinétique d'induction du prophage λ . (échantillon A).

L'induction du prophage λ chez les bactéries Hfr toujours appariées aux bactéries réceptrices a été mesurée dans une fraction de l'échantillon de croisement non exposée à la streptomycine ni soumise au vortex. (échantillon A').

L'induction zygotique du prophage λ a été mesurée dans la même fraction non traitée de l'échantillon de croisement (échantillon B).

L'induction spontanée du prophage λ chez les bactéries Hfr lysogènes a été déterminée dans un échantillon de culture.



Les cultures et les croisements de bactéries ont été effectués en milieu Luria complété par du glucose 1% et du casaminoacids 0,2%.

Les prélèvements ont été coulés en présence d'une souche indicatrice λ^S strA sur boîtes de Luria gélosé contenant de la streptomycine sauf pour ceux de l'induction zygotique qui ont été coulés sur des boîtes de Luria gélosée sans streptomycine.

2) Résultats

§ 44

L'induction du prophage λ chez les bactéries Hfr lysogènes débute 40 min après la séparation des couples. Elle ne peut être confondue

avec l'induction zygotique du prophage λ qui se produit à 80 min de la cinétique de transfert effectuée en absence de streptomycine. Nous avons montré par ailleurs que l'induction du prophage λ observée se fait bien chez les bactéries donatrices puisqu'elle n'est plus observée dans ces conditions quand les bactéries sont sensibles à la streptomycine.

L'induction du prophage λ apparaît plus tardivement et beaucoup plus réduite quand le croisement n'est pas interrompu. Elle peut correspondre aux séparations de couples qui se produisent tout au long du croisement.

Il semble donc qu'un système de réparation soit induit chez les bactéries Hfr issues d'un croisement avec des bactéries réceptrices.

III - Conclusion

Après croisement avec des bactéries réceptrices, les bactéries Hfr semblent reprendre un cycle de réplication au point origine du chromosome. La reprise de la réplication ne s'effectue qu'après un temps de latence.

L'induction du prophage λ chez les bactéries Hfr lysogènes issues de couples conjuguants, est en faveur de l'existence d'un système de réparation induit après la séparation des couples. Nous avons vérifié par ailleurs que l'induction du prophage λ dépend du gène rec A⁺ et de l'allèle ind⁺ du gène cI de lambda. Ceci permet de supposer que le système de réparation est du type S.O.S. (50) (196).

Le système de réparation semble être plutôt induit chez les bactéries Hfr détachées des bactéries réceptrices que chez les bactéries Hfr restées en croisement. Il servirait donc plus spécifiquement à éliminer les extrémités libres des brins de DNA rompus par la séparation des couples qu'à résorber in situ les points de blocage des fourches répliquatives.

Nous avons supposé que le blocage des fourches répliquatives était à l'origine des séparations de couples qui se produisent tout au long du croisement et donc du gradient de transmission des caractères génétiques.

Il est donc possible que les points de blocage des fourches répliquatives soient ainsi résorbés indirectement par la réparation des cassures de DNA qu'ils engendrent.

RESUME DU TRAVAIL ET CONCLUSION GENERALE

I - Amélioration des conditions expérimentales classiquement utilisées

1) Le "casaminoacids" augmente l'efficacité d'appariement des bactéries donatrices avec les bactéries réceptrices.

Nous avons observé que l'addition de "casaminoacids" à des cultures de bactéries donatrices et réceptrices en milieu synthétique contenant déjà des facteurs de croissance augmente très nettement la fréquence de recombinaison lors du croisement de ces bactéries.

Nous avons montré que l'augmentation de la fréquence de recombinaison dépend essentiellement de l'addition de "casaminoacids" dans les cultures en milieu synthétique de bactéries donatrices ou pendant la période d'appariement des bactéries donatrices avec les bactéries réceptrices. Ceci permet de supposer que le "casaminoacids" agit essentiellement au cours de l'étape d'appariement, sans affecter le transfert de DNA, et préférentiellement sur les structures d'appariement des bactéries donatrices. Des résultats non mentionnés dans le mémoire montrent que le "casaminoacids" augmente également l'efficacité d'appariement des bactéries donatrices avec les bactéries réceptrices lorsque les cultures et les croisements des cellules sont effectués en milieu riche de Luria.

Il semble qu'un ou plusieurs acides aminés, en présence de l'ion phosphate, accroissent l'efficacité des contacts membranaires et la solidité des couples tout au long de la conjugaison.

2) La streptomycine empêche la formation de nouveaux couples sans modifier le transfert de DNA chez les bactéries déjà appariées.

Nous avons montré que la streptomycine bloque l'appariement des cellules (bactérie mâle, sensible/bactérie femelle résistante) sans modifier le transfert de DNA chez les bactéries déjà appariées. Ceci permet, d'éviter les interférences entre les cellules non appariées et d'empêcher des conjugaisons successives qui modifient le système : donc de suivre plus spécifiquement les variations physiologiques des cellules qui étaient en conjugaison au moment de l'addition de la streptomycine.

L'absence de reconjugaison est pratiquement totale lorsque la séparation mécanique des couples est réalisée après addition de streptomycine dans le croisement. En utilisant les propriétés de résistance ou de sensibilité des bactéries à la streptomycine, il est possible d'étudier la physiologie des bactéries donatrices ou réceptrices

après conjugaison, le partenaire sensible étant tué.

3) Les modes de croissance des bactéries donatrices et réceptrices influent l'efficacité de la conjugaison.

Des taux de transfert avoisinant 100 % pour des croisements où les bactéries réceptrices sont en excès par rapport aux bactéries donatrices ont été obtenus avec des bactéries en phase exponentielle de croissance cultivées suivant des modes différents. Les bactéries donatrices sont maintenues 1 heure, en semi-anaérobiose à 37° C après avoir été cultivées en aérobiose. Les bactéries réceptrices sont cultivées sous forte aération par agitation à 37° C

II - Les bactéries réceptrices ont des cycles de compétence à conjuguer.

1) Relation entre stade de réplication et état de compétence des bactéries réceptrices.

Deux éventualités ont été envisagées :

- * la capacité de conjuguer de la bactérie réceptrice existe tout au long du cycle cellulaire.
- * la capacité de conjuguer n'existe qu'à une période déterminée du cycle.

Dans le 1er cas, toutes les bactéries F^- d'une population en phase exponentielle de croissance peuvent être réceptrices ; le taux de transfert sera donc fonction du nombre de bactéries donatrices mises en présence des bactéries réceptrices.

Dans le 2ème cas, une fraction seulement des bactéries F^- se comportent comme réceptrices ; le taux de transfert sera ici fonction du nombre de bactéries réceptrices dans le croisement.

Les résultats de croisement réalisés avec des rapports bactéries donatrices/réceptrices différents sont en faveur de la 2ème proposition.

Dans une population en phase exponentielle de croissance à chaque instant une fraction seulement des bactéries F^- se comportent comme réceptrices. Nous avons appelé les bactéries de cette fraction : bactéries compétentes, et le stade correspondant de la réplication : stade de compétence.

Nous avons montré que nos résultats n'étaient pas dus à la zygoïté létale qui apparaît dans les croisements où les bactéries mâles sont en surnombre.

Nous avons montré à cette occasion que la zygoïté létale était due à la grande quantité de DNA transféré et non pas de lyse provoquée par des appariements multiples.

2) les bactéries réceptrices passent par le stade de compétence à la conjugaison une fois par cycle cellulaire.

Si une fraction de la population de bactéries réceptrices peut conjuguer à chaque instant cela implique qu'au cours du temps une fraction constante de bactéries réceptrices passe à chaque instant par le stade de compétence.

En effectuant des cinétiques d'addition de streptomycine dans des croisements où les bactéries donatrices et réceptrices sont en quantité égale, nous avons montré que des nouveaux couples se forment tout au long de la conjugaison et que les bactéries réceptrices passent, donc tour à tour au stade de compétence.

Ceci peut impliquer qu'une bactérie réceptrice qui vient de conjuguer ne peut plus reconjuguer immédiatement une deuxième fois.

C'est ce que nous avons trouvé par l'analyse génétique des zygotes apparus dans un croisement où les couples ont été séparés et de nouveau appariés. Nous avons également montré qu'une bactérie réceptrice exconjugante ne participe plus immédiatement à un deuxième transfert de DNA.

3) Division synchronisée des sexductants et des zygotes

Si l'état de compétence de la bactérie réceptrice se développe qu'une fois par cycle cellulaire à une période bien déterminée de ce cycle, cela implique que, dans une population non synchronisée, les bactéries réceptrices qui conjuguent doivent toutes être dans un même état et donc donner naissance à des zygotes qui vont se diviser de façon synchronisée.

C'est ce que nous avons trouvé lors de croisements entre bactéries réceptrices et donatrices F' ou Hfr. Les sexductants ou zygotes formés se divisent de façon synchronisée.

Les bactéries réceptrices qui n'ont pas participé à la conjugaison restent en croissance exponentielle.

Ces résultats sont indépendants de l'origine et du sens d'injection des bactéries Hfr utilisées.

La réplication végétative commence chez les sexductants dès la séparation des couples alors qu'elle ne reprend chez les zygotes qu'après la période de recombinaison du DNA transféré.

4) l'Etat de compétence des bactéries réceptrices apparaît pendant la période de repos de la réplication.

Nous avons synchronisé la réplication des bactéries par action du chloramphénicol ou carence en thymine et cherché à quel stade de croissance elles étaient toutes capables de conjuguer.

Nous avons ainsi situé le stade de compétence pendant la période qui se situe après la terminaison de la réplication et avant l'initiation d'un nouveau cycle de réplication. La période de repos de la réplication semble donc être le stade de compétence.

5) Les zygotes sont immuns à la mort par carence en thymine

Nous avons vérifié que le stade de compétence correspond à la période de repos de la réplication à l'aide de la propriété qu'ont les bactéries au stade zéro de la réplication d'être immuns à la mort par carence en thymine. Nous avons montré que les bactéries réceptrices croisées en absence de thymine avec des bactéries donatrices, donnent naissance à des zygotes qui sont immuns à la mort par carence en thymine pendant la période qui correspond à celle de recombinaison déterminée précédemment.

Cette période écoulée, la létalité par carence en thymine apparaît chez les recombinants bactériens, ce qui est en faveur d'une reprise de la réplication végétative survenant après la période de recombinaison.

6) Le système de recombinaison est-il inductible ?

Les résultats obtenus à l'aide de propriétés de sensibilisation à la radiation 313 nm du DNA ayant incorporé du BUdR semblent indiquer que la recombinaison ne s'effectue qu'après la séparation des couples conjugants. Nous avons également montré l'induction des fonctions S. O. S après la séparation des couples conjugants en mettant en évidence dans ces conditions l'induction du prophage λ^+ . En accord: avec le fait que les deux systèmes dépendent du gène rec A⁺, nous avons émis l'hypothèse que le système de recombinaison est inductible. Les extrémités libres du DNA transféré pourraient servir d'inducteur ou d'effectuer d'induction de la protéine rec A.

III - Effet de l'activation du réplicon F sur la réplication végétative des bactéries donatrices

1) Théorie du signal de conjugaison

a) Transfert de DNA à partir de l'origine de transfert

Après séparation mécanique des couples conjuguants : un nouveau transfert de DNA reprend immédiatement à partir du point d'origine caractéristique de la bactérie donatrice Hfr utilisée et jamais partir du bout interrompu.

b) Transfert de DNA à partir du point d'arrêt

Si l'arrêt de transfert n'est pas associé à une séparation des couples, le transfert de DNA reprend au point où il était bloqué.

c) Interprétation

Ces deux résultats suggèrent l'existence d'un signal de conjugaison, transmis au moment du contact membranaire entre bactéries réceptrices et donatrices. qui induit chaque fois spécifiquement un nouveau cycle de transfert.

Ce signal de conjugaison est un processus actif et semble correspondre à la synthèse d'un produit puisqu'il n'est pas transmis par des bactéries réceptrices compétentes tuées.

2) Le déclenchement du transfert de DNA ne semble lié qu'au signal de conjugaison

Le déclenchement du transfert de DNA chez la bactérie donatrice semble indépendant du stade de réplication où elle se trouve puisque toutes les bactéries donatrices d'une population en phase exponentielle de croissance sont capables de conjuguer. Le déclenchement du transfert de DNA s'effectue dès la reconnaissance par contact membranaire de l'état de compétence de la bactérie réceptrice.

3) La réplication végétative est bloquée chez les bactéries Hfr conjuguantes

à croisements entre bactéries donatrices et réceptrices

Nous avons montré que le croisement entre cellules de sexe opposé entraîne deux réponses physiologiques distinctes chez la bactérie donatrice suivant que l'épisode sexuel est intégré au chromosome bactérien (bactéries Hfr) ou autonome dans la cellule (bactéries F' ou F⁺)

x cans de la cellule Hfr

Le croisement avec une bactérie réceptrice se traduit par le fonctionnement du réplicon épisomique, le blocage du système de réplication végétative et l'arrêt de la division cellulaire.

x cas de la cellule F'

Le croisement avec une bactérie réceptrice se traduit chez la bactérie F' du réplicon épisomique sans blocage de la réplication végétative ni arrêt de la division cellulaire.

b) contacts cellulaires entre bactéries donatrices

L'inhibition de la réplication est observée lorsque des bactéries donatrices Hfr sont croisées avec d'autres bactéries donatrices. On peut considérer que dans les couples bactéries Hfr - bactéries donatrices, les structures mâles des bactéries Hfr sont en contact avec les structures femelles complémentaires des bactéries donatrices partenaires.

Le contact entre deux bactéries donatrices peut probablement donner lieu à une conjugaison abortive. Il est possible qu'une bactérie donatrice qui se trouve à la période de repos de la réplication exprime, à l'égal d'une bactérie réceptrice, un état de compétence par les structures femelles qu'elle possède. Cette bactérie activerait par contact le réplicon F d'une bactérie donatrice partenaire sans qu'il y ait transfert effectif de DNA, celui-ci étant empêché par le système d'exclusion de surface codé par le facteur F.

L'activation du réplicon F qui se produit lors du contact entre bactéries donatrices, peut expliquer l'observation faite dans d'autres laboratoires, de l'existence simultanée de 2 réplications chez les bactéries Hfr synchronisées, l'une commencée à l'origine de la réplication bactérienne, l'autre à l'origine de réplication du facteur F.

c) Interprétation du blocage de la réplication végétative chez les bactéries Hfr conjugantes.

En comparant les taux d'incorporation de thymine tritiée chez les bactéries Hfr Str^s croisées avec des bactéries réceptrices str A dans des milieux contenant ou pas de la streptomycine, nous avons déduit que les bactéries Hfr commencent un cycle de réplication végétative pendant la conjugaison.

L'inhibition de la réplication végétative chez une bactérie Hfr conjugante n'est donc pas la conséquence d'une régulation qui intervient après l'activation du réplicon F. Elle est probablement causée par la rencontre des fourches réplcatives végétatives et des fourches réplcatives de transfert et donc par l'impossibilité physique qu'elles ont de poursuivre leur mouvement. Le fait que l'inhibition soit progressive provient de l'étalement dans le temps des collisions des fourches réplcatives puisque les bactéries Hfr utilisées ne sont pas synchronisées.

Le blocage du transfert de DNA qui résulte de la rencontre des 2 types de fourches répliquatives, peut expliquer le gradient de transfert des marqueurs génétiques pendant la conjugaison.

4) Reprise de la réplication végétative chez les bactéries Hfr conjugantes.

Après séparation des couples, la synthèse de DNA qui reprend dans les bactéries donatrices Hfr qui viennent de conjuguer, semble correspondre à une réplication synchronisée commencée au point d'origine du chromosome.

Les fonction S.O.S. semblent également induites chez les bactéries Hfr issues de couples conjugants. Elles pourraient servir à réparer les extrémités libres des brins de DNA interrompus en cours de transfert et peut être éliminer les fourches répliquatives bloquées.

5) Les modalités du transfert de DNA entre bactéries donatrices et réceptrices

Si de nombreux travaux ont permis d'élucider le mécanisme même de transfert de DNA, nous avons apporté des connaissances nouvelles concernant les modalités du transfert de DNA entre bactéries donatrices et réceptrices.

Un état de compétence à la conjugaison apparaît chaque fois qu'une bactérie réceptrice termine sa réplication semi-conservative. Au cours de la période de repos de la réplication, un processus actif est nécessaire chez la bactérie réceptrice pour la transmission, par contact membranaire, d'un signal de conjugaison qui active le réplicon F de la bactérie donatrice appariée.

Un état de compétence peut également apparaître chez une bactérie donatrice pendant la période de repos de la réplication et activer de la même manière le réplicon F d'une bactérie donatrice partenaire sans qu'il y ait transfert effectif de DNA entre les deux bactéries.

L'activation du réplicon F chez une bactérie Hfr, entraîne chez celle-ci, le blocage de la réplication semi-conservative par interaction entre les fourches de réplication végétative et celles du transfert. La division cellulaire est également bloquée chez les bactéries Hfr conjugantes. L'inhibition de la réplication végétative et de la division cellulaire ne se produit pas chez les bactéries F' conjugantes où l'épisome activé est à l'état autonome.

Le DNA d'une bactérie donatrice n'est transféré qu'à une bactérie réceptrice qui se trouve à la période de repos de la réplication.

Le brin de DNA transféré est répliqué au moment de sa pénétration dans la bactérie réceptrice.

Si le DNA transféré est épisomique, un nouveau cycle de réplication végétative est commencé dans la bactérie réceptrice après séparation des couples.

Si le DNA transféré est chromosomique, la réplication végétative ne reprend chez les zygotes qu'après la période d'intégration du DNA transféré. En effet, le système de recombinaison est induit en même temps que les fonctions S. O. S. pendant la période qui suit la séparation des couples conjuguants.

Deux points essentiels ont ainsi été mis en évidence.

Le transfert de DNA ne peut se dérouler entre bactéries donatrices et réceptrices qu'à la suite d'un processus de reconnaissance entre les deux cellules et la transmission d'un signal de conjugaison. par contact membranaire entre bactéries réceptrices et donatrices.

Il se produit chez les bactéries Hfr conjuguantes une interaction entre les fourches de réplication végétative et celles de transfert, excluant de ce fait toute coordination entre réplication végétative et transfert de DNA, permettant à celui-ci de se dérouler sans perturbation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Achtman M.
 Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 1973, 60, 79
- 2 Achtman M.
 Lunteren Lectures on Mol. Genet., Symp., 1976
- 3 Achtman M., Willets N., Clark A.J.
 J. Bact., 1971, 106, 529
- 4 Adelberg E.A., Burns S.N.
 J. Bact., 1960, 79, 321
- 5 Alfoldi L., Jacob F., Wollman E.L.
 C. R. Acad. Sci., 1957, 244, 2976
- 6 Anderson T.F.
 On the mechanism of adsorption of bacteriophages
 on host cells.
 Symp. Soc. Gen. Microbiol., 1949, 1, 76
- 7 Arai T., Watanabe T.
 Genet. Res. Camb., 1967, 10, 241
- 8 Bachmann B.J.
 Bacteriol. Rev., 1972, 36, 525
- 9 Barbour S.
 J. Mol. Biol., 1967, 28, 373
- 10 Barner H., Cohen S.S.
 J. Bact., 1956, 72, 115
- 11 Bayer M.
 J. Cell. Biol., 1969, 39, 9a
- 12 Beard J.P.
 Abstr. 68 th Ordinary Meet. Soc. Gen. Microbiol.
 Canterbury, England. 1973, p. 11.

- 13 Beard J.P. Bishop S.F.
J. Bact., 1975, 123, 916
- 14 Beard J.P., Connely J.C.
J. Bacteriol., 1975, 122, 59
- 15 Berrah G., Konetzka W.A.
J. Bacteriol., 1962, 83, 738
- 16 Bonhoeffer F.
Z. Vererbungslehre., 1966, 38, 141
- 17 Bonhoeffer F., Hösselbarth R., Lehmann K.
J. Mol. Biol., 1967, 29, 539
- 18 Bouck N., Adelberg E.A.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1963, 11, 24
- 19 Bouck N., Adelberg E.A.
J. Bacteriol., 1970, 102, 688
- 20 Boyle J.V., Goss W.A., Cook T.M.
J. Bact., 1967, 94, 1664
- 21 Bradley D.E.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 47, 142
- 22 Bresler S.E., Lanzov V.A., Lukjaniec Blinkova A.A.
Mol. Gen. Genet., 1968, 102, N° 4, 269
- 23 Brinton C.C. Jr
Nature, 1959, 183, 782
- 24 Brinton C.C. Jr
Trans N.Y. Acad. Sci., 1965n 27, 1003
- 25 Brinton C.C. Jr
Crit. Rev. Microbiol., 1971, 1, 105
- 26 Brinton C.C. Jr., Baron L.C.
Biochim. Biophys. Acta., 1960, 42, 298
- 27 Brinton C.C. Jr., Gemski P., Carnahan J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1964, 52, 776

- 28 Brinton C.C. Jr., Gemski P., Falkow S., Baron L.S.
Biophys. Biochem. Res. Commun., 1961, 5, 293
- 29 Brinton C.C. Jr., Huang S.L.
Bact. Proc., 1962, G. 103
- 30 Brinton C.C. Jr., Stone M. J.
Bact. Proc., 1961, G 96
- 31 Campbell A. M.
Advanc. Genet., 1962, 11, 101
- 32 Caro L.G., Schnö's M.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1966, 56, 126
- 33 Cavalli-Sforza L.L.
Boll. Ist. Serioter Milan, 1950, 29, 281
- 34 Chandler M., Silver L., Roth Y., Caro L.
J. Mol. Biol., 1976, 104, 517
- 35 Cohen A., Fisher W.D., Curtiss R., Adler H.I.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.,
1968, 33, 635
- 36 Collins J., Pritchard R.H.
J. Mol. Biol., 1973, 78, 143
- 37 Cook T.M., Deitz W.H., Goss W.A.
J. Bact., 1966, 91, 774
- 38 Cooper S.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1972, 69, 2706
- 39 Crawford E., Gesteland R.F.
Virology, 1964, 22, 165
- 40 Cuzin F.
C.R. Acad. Sci. (Paris) ., 1965, 260, 6482
- 41 Cuzin F., Buttin G., Jacob F.
J. Cell. Comp. Phys., 1967, 70, sup I, 77

- 42 Curtiss III R.
Ann. Rev. Microbiol., 1969, 23, 69
- 43 Curtiss III R., Caro L., Allison D., Stallions D.
J. Bact., 1969, 100, 1091
- 44 Curtiss III R., Charamella L.J.
Genetics., 1966, 54, 329
- 45 Curtiss III R., Charamella L.J., Stallions D.R., Mays J.A.
Bact. Rev., 1968, 32, 320
- 46 Davidson N., Deonier R.C., Hu S., Ohtsubo E.
Microbiology, 1975, 1, 56
- 47 Davies J. K., Reeves P.
J. Bact., 1975, 123, 372
- 48 Davis D.B., Helmstetter C.E.
J. Bact., 1973, 114, 294
- 49 Deitz W.H., Cook T.M., Gross W.A.
J. Bacteriol., 1966, 91, 768
- 50 Devoret R., Blanco M., George J., Radman M.
Molecular Mechanisms for Repair of DNA
part A., Hanawalt P.C., Stelow R.B. (ed) 1975, 155
- 51 Dubnau E., Mass W.D.
J. Bact., 1968, 95, 531
- 52 Duguid J.P., Smith J.W., Dempster G., Edmunds P.N.
J. Path. Bact., 1955, 70, 335
- 53 Dove W.F.
Virology, 1969, 38, 349
- 54 Eberle H.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1970, 65, 467
- 55 Eckerson H.W., Reynard A.M.
J. Bact., 1977, 129, 131
- 56 Echols H.
J. Bact., 1963, 85, 262

- 57 Falkinham III J.O., Curtiss III R.
J. Bact., 1976, 126, 1194
- 58 Falkow S., Tompkins L., Silver R., Guerry R., Leblanc D.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1971, 182, 153
- 59 Fenwick R.G. Jr., Curtiss III R.
J. Bact., 1973, 116, 1212
- 60 Fenwick R.G. Jr., Curtiss III R.
J. Bact., 1973, 116, 1224
- 61 Fisher K. W.
J. Gen. Microbiol., 1957, 16, 120 et 136
- 62 Fisher K.W.
Genetic Res., 1966, 7, 267
- 63 Fisher K.W., Fisher M.B.
Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.,
1968, 33, 629
- 64 Frazer A.C., Curtiss III R.
Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 1975, 69, 1
- 65 Friefelder D.
J. Bact., 1967, 94, 396
- 66 Freifelder D., Folkanis A., Kirschner I.
J. Bact., 1971, 105, 722
- 67 Freifelder D.R., Freifelder D.
J. Mol. Biol., 1968, 32, 15
- 68 Fulton C.
Genetics., 1965, 52, 55
- 69 George J., Castellazzy M., Buttin G.
Molec. Gen. Genet., 1975, 140, 309
- 70 Gilbert W., Dressler D.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1968, 33, 473
- 71 Goss W.A., Deitz W.H., Cook T.M.
J. Bact., 1964, 88, 1112

- 72 Goss W.A., Deits W.H., Cook T.M.
J. Bact., 1965, 89, 1068
- 73 Greer S.
J. Gen. Microbiol., 1960, 22, 618
- 74 Gross J. D.
Genet. Res., 1963, 4, 457
- 75 Gross J.D., Caro L.G.
Sciences 1965, 150, 1679
- 76 Gross J.D., Caro L.G.
J. Mol. Biol., 1966, 16, 269
- 77 Guillaume J., Martin G., Kusnierz J.P., Werquin M.
"Charles Gernez Rieux"
Imprimerie Crouan et Roques, Juin 1963, p 121
- 78 Guillaume J.B., Terrien M.F., Kusnierz J.P., Martin G.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1970, 21, 15
- 79 Hane M.W.
J. Bacteriol., 1971, 105, 46
- 80 de Hann P.G., Gross J.D.
Genet. Res., 1962, 3, 251
- 81 Havekes L.M., Hoekstra W.P.M.
J. Bact., 1976, 126, 593
- 82 Havekes L.M., Lugtenberg B.J.J., Hoekstra W.P.M.
Molec. Gen. Genet., 1976, 146, 43
- 83 Hayes W.
Nature, 1952, 169, 118
- 84 Hayes W.
J. Gen Microbiol., 1953, 8, 72
- 85 Hayes W.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1953, 18, 75
- 86 Helmuth R., Achtman M.
Nature., 1975, 257, 652

- 87 Herman R.K., Ferro F. Jr
Biophys. J., 1964, 4, 33
- 88 Hiraga S., Saitoh T.
Mol. Gen. Gent., 1975, 137, 239
- 89 Hirota Y.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1960, 46, 57
- 90 Hofschneider P.H.Z.
Z. Naturforsch., 1963, 18 b, 203
- 91 Hohlfert R., Vielmetter W.
Nature N.B., 1973, 242, 130
- 92 Hollom S., Pritchard R.H.
Genet. Res., 1965, 6, 479
- 93 Houwink A.L., Van Iterson W.
Biochim. Biophys. Acta, 1950, 5, 10
- 94 H radecna Z., Szybalski W.
Virology, 1967, 32, 633
- 95 Hu S., Ohtsubo E., Davidson N., Saedler H.
J. Bacteriol., 1975, 122, 764
- 96 Ippen K.A., Valentine R.C.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 27, 674
- 97 Ishibashi M.
J. Bact., 1967, 93, 379
- 98 Jacob F., Campbell A.
C. R. Acad. Sci. (Paris) 1959, 248, 3219
- 99 Jacob F., Wollman E.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.
1953, 18, 101
- 100 Jacob F., Wollman E.L.
C. R. Acad. Sci., 1954, 239, 455
- 101 Jacob F., Wollman E.L.
Ann. Inst. Pasteur., 1956, 91, 486

- 102 Jacob F., Wollman E. L.
C.R. Acad. Sci. (Paris)., 1956, 242, 803.
- 103 Jacob F., Wollman E. L.
C. R. Acad. Sci. (Paris)., 1958, 247, 154
- 104 Jacob F., Wollman E. L.
Sexuality and the genetics of bacteria
Academic Press ; Ed New York and London, 1961, 373 p
- 105 Jacob F., Brenner S., Cuzin F.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 329
- 106 Jamieson A. F., Bergquist P. L.
Molec. Gen. Genet., 1976, 148, 221
- 107 Kaiser A. D.
Virology., 1957, 3, 42
- 108 Kline B. C.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 50, 280
- 109 Kline B. C.
Biochemistry., 1974, 13, 139
- 110 Knolle P.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 27, 81
- 111 Kusnierz J.P.
Manuscrit en révision pour Mol. Gen. Genet.
- 112 Kusnierz J. P.
Manuscrit en révision pour Mol. Gen. Genet.
- 113 Kusnierz J.P., Lombaert M.A.
C.R. Acad. Sci., 1971, 272, 2844

- 114 Lark K. G., Eberle H., Consigli R.A., Minocha H.C.,
Chai N., Lark C.
Organizational Biosynthesis 1967, 63
Vogel H.J., Lampen J.O., Bryson V. (Ed.)
- 115 Lederberg J.
Proc. Intern. Congr. Microbiol., 7 th, Stockholm
1958, 59.
- 116 Lederberg J., Cavalli L.L., Lederberg E.M.
Genetics, 1952, 37, 720.
- 117 Lederberg J., Tatum E.L.
Nature, 1946, 153, 558.
- 118 Lennox E.S.
Virology., 1955, 1, 190.
- 119 Loeb T.
Science., 1960, 131, 932.
- 120 Loeb T., Zinder N.D.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1961, 47, 282.
- 121 Luria S.E., Burrous J.W.
J. Bacteriol., 1957, 74, 461.
- 122 Maaløe O., Hanawalt P.C.
J. Mol. Biol., 1961, 3, 144.
- 123 Makela O., Makela P.H., Soikkeli S.
Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. (Helsinki) 1964, 42, 188.

- 124 Marimus M. G., Adelberz E.A.
J. Bact., 1970, 104, 1266.
- 125 Maruyama Y.
J. Bact. 1956, 72, 821.
- 126 Marvin D.A., Hoffman-Berling H.
Z. Naturforsh, 1963, 18 B, 884.
- 127 Marvin D., Hohn B.
Bact. Rev., 1969, 33, 172.
- 128 Matney T.S., Suit J.C.
J. Bact., 1966, 92, 960.
- 129 Meynell E., Ewins A.
J. Bact., 1973, 113, 71.
- 130 MILLER J. H.
Exp. in Molec. Genet., Cold Spring Harbor Lab., 1972.
- 131 Minkley E.G. Jr., Polen S., Brinion C.C. Jr.,
Ippen-Ihler K.
J. Mol. Biol., 1976, 108, 111.
- 132 Mitchinson J. M., Vincent W.S.
Nature 1965, 205, 987.
- 133 Monner D.A., Jonssons S., Boman H.G.
J. Bact., 1971, 107, 420.
- 134 Moody E.C.M., Lukin A.
J. Mol. Biol., 1970, 48, 217.

- 135 Mycielski R., Kociszewska-Kiljanczyk B., Dowjat W.K.,
Kunicki-Goldfinger W.J.H.
Bull. Acad. Polon. Sci., 1972, 20, 635.
- 136 Mycielski R., Kociszewska-Kiljanczyk B., Kunicki-Goldfinger
W.J.H.
Acta Microbiol. Pol., 1969, 18, 79.
- 137 Nagata T.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1963, 49, 551.
- 138 Novick R. P.
Bact. Rev., 1969, 33, 210.
- 139 Novotny C.P.
Communication à Brinton C.C. Jr.
Crit. Rev. Microbiol. 1971, 1, 105.
- 140 Novotny C.P., Carnahan J., Brinton C.C. Jr.
J. Bacteriol., 1969, 98, 1294.
- 141 Novotny C.P., Fives-Taylor P.
J. Bact., 1974, 117, 1306.
- 142 Novotny C., Knight W.S., Brinton C.C. Jr
J. Bacteriol., 1968, 95, 314.
- 143 Novotny C.P., Lavin K.
J. Bacteriol., 1971, 107, 671.
- 144 Novotny C., Raizen E., Knight W.S., Brinton C.C. Jr
J. Bacteriol., 1969, 98, 1307.

- 145 Ohki H., Tomizawa J. I.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.,
1968, 33, 651.
- 146 Obtsubo E., Nishimura Y., Hirota Y.
Genetics, 1970, 64, 173.
- 147 Okada M., Watanabe T., Miyake T.
J. Gen. Microbiol., 1968, 50, 241.
- 148 Ou J.T.
J. Bact., 1973, 115, 648.
- 149 Ou J.T.
Proc. Nat. Acad. Sci., 1975, 72, 3721.
- 150 Ou J.T., Anderson T.F.
J. Bacteriol., 1970, 102, 648.
- 151 Ou J. T., Anderson T.F.
J. Bact., 1972, 111, 177.
- 152 Ørskov I., Ørskov F.
Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1960, 48, 37.
- 153 Pardee A.B., Jacob F., Monod J.
J. Mol. Biol., 1959, 1, 165.
- 154 Pittard J.
J. Bacteriol, 1964, 87, 1256.
- 155 Pritchard R. H., Chandler M.G., Collins J.
Molec. Gen. Genet., 1975, 138, 143.

- 156 Pritchard R. H., Lark K.G.
J. Mol. Biol., 1964, 9, 288.
- 157 Ptashne M.
J. Mol. Biol., 1965, 11, 829.
- 158 Radman M.
Molecular Mechanisms for Repair of DNA
part A., Hanawalt P.C., Setlow R.B. (Ed.)
1975, 355.
- 159 Rapaport S.A.
Virology, 1964, 22, 125.
- 160 Reiner A.M.
J. Bact., 1974, 119, 183.
- 161 Rupp W.D., Ihler G.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.,
1966, 33, 647.
- 162 Sarathy P.V., Siddiqi O.
J. Mol. Biol., 1973, 78, 443.
- 163 Sarathy P.V., Siddiqi O.
Mol. Gen. Genet., 1973, 125, 133.
- 164 Scaife J.
Ann. Rev. Microbiol., 1967, 21, 601.
- 165 Scaife J., Gross J.
Biochem. Biophys. Res. Commun.
1962, 7, 403.

- 166 Setlow R.B., Boyce R.
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 68, 455.
- 167 Sheely R.J., Clifton O., Curtiss III R.
J. Bact., 1972, 112, 861.
- 168 Silver S.D.
J. Mol. Biol., 1963, 6, 349.
- 169 Silver S., Wendt L.
J. Bacteriol., 1967, 93, 560.
- 170 Skurray R.A., Hancock R.E.W., Reeves P.
J. Bact., 1974, 119, 726.
- 171 Skurray R.A., Nagaishi H., Clard A.J.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1976, 73, 64.
- 172 Skurray R.A., Reeves P.
J. Bact., 1973, 113, 58.
- 173 Skurray R.A., Reeves P.
J. Bact., 1973, 114, 11.
- 174 Skurray R.A., Reeves P.
J. Bact., 1974, 117, 100.
- 175 Spelina V., Starka J.
J. Bact., 1968, 95, 2442.
- 176 Stahl F.W., Grasemann J. M., Okun L., Fox E., Laird C.
Virology, 1961, 13, 98.

- 177 Stallions D.R., Curtiss III R.
J. Bact., 1971, 105, 886.
- 178 Strauss J. H., Sinsheimer R.L.
J. Mol. Biol., 1963, 7, 43.
- 179 Taketo A., Watanabe H.
J. Biochem., 1967, 61, 520.
- 180 Valentine R.C., Silverman P.M., Ippen K.A., Mobach H.
In Adv. in Microbiol. Physiol. Acad. Press.
London and New York, 1969, 3, 1.
- 181 Valentine R.C., Strand M.
Science., 1965, 148, 511.
- 182 Valentine R.C., Wedel H., Ippen K.A.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 21, 277.
- 183 Vapnek D., Rupp W.D.
J. Mol. Biol., 1970, 53, 287.
- 184 Vapnek D., Rupp W.D.
J. Mol. Biol., 1971, 60, 413.
- 185 Vielmetter W., Bonhoeffer F., Schütte A.
J. Mol. Biol., 1968, 37, 81.
- 186 Walmsley R.M.
J. Bacteriol., 1973, 114, 144.
- 187 Walmsley R.M.
J. Bacteriol., 1976, 126, 222.
- 188 Ward C.B., Hane M.W., Glaser D.A.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1970, 66, 365.

- 189 Watanabe T., Okada M.
J. Bact., 1964, 87, 727.
- 190 Werquin M.
Thèse de 3ème cycle, Université de Lille I, Lille 1972.
- 191 Willets N.S.
Nature N.B., 1971, 230, 183.
- 192 Willets N.S.
Ann. Rev. Microbiol., 1972, 6, 257.
- 193 Willets N.S.
J. Mol. Biol., 1977, 112, 141.
- 194 Willets N.S.
Genet. Res. Camb., 1973, 21, 205.
- 195 Winshell E., Rosenkranz H.
J. Bact., 1970, 104, 1168.
- 196 Witkin E.W.
Bact. Rev., 1976, 40, 869.
- 197 Wollman E.L., Jacob F.
Ann. Inst. Pasteur, 1957, 93, 232.
- 198 Wollman E.L., Jacob F.
Ann. Inst. Pasteur., 1958, 95, 641.
- 199 Wollman E.L., Jacob F.
C.R. Acad. Sci., 1958, 247, 536.
- 200 Zinder N.D., Valentine R.C., Rogers., Stoeckenius W.
Virology., 1963, 20, 638.